



THATIANE YOSHIE KANAZAWA

NOVAS CONTRIBUIÇÕES SOBRE A CORRELAÇÃO GENÓTIPO-  
FENÓTIPO DO GRUPO FGFR3 A PARTIR DO ESTUDO DE UMA  
COORTE DE PACIENTES COM FENÓTIPO TÍPICO OU  
SUGESTIVO.

Campinas

2014





Universidade Estadual De Campinas  
Faculdade de Ciências Médicas

THATIANE YOSHIE KANAZAWA

NOVAS CONTRIBUIÇÕES SOBRE A CORRELAÇÃO GENÓTIPO-  
FENÓTIPO DO GRUPO FGFR3 A PARTIR DO ESTUDO DE UMA  
COORTE DE PACIENTES COM FENÓTIPO TÍPICO OU SUGESTIVO.

**ORIENTADORA:** Denise Pontes Cavalcanti

**CO-ORIENTADORA:** Luciana Cardoso Bonadia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA THATIANE YOSHIE  
KANAZAWA E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. DENISE  
PONTES CAVALCANTI.

---

Assinatura do Orientador

Campinas, 2014

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

K131n Kanazawa, Thatiane Yoshie, 1988-  
Novas contribuições sobre a correlação genótipo-fenótipo do grupo FGFR3 a partir do estudo de uma coorte de pacientes com fenótipo típico ou sugestivo / Thatiane Yoshie Kanazawa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Denise Pontes Cavalcanti.

Coorientador: Luciana Cardoso Bonadia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Osteocondrodysplasias. 2. Receptor tipo 3 de fator de crescimento de fibroblastos. 3. Acondroplasia. I. Cavalcanti, Denise Pontes, 1957-. II. Bonadia, Luciana Cardoso, 1977-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** New contributions about the genotype-phenotype correlation of the FGFR3 group from the study of a cohort of patients with typical or suggestive phenotype

**Palavras-chave em inglês:**

Osteochondrodysplasias

Receptor, Fibroblast growth factor, type 3

Achondroplasia

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestra em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Denise Pontes Cavalcanti [Orientador]

Débora Romeo Bertola

Carmen Silvia Bertuzzo

**Data de defesa:** 26-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

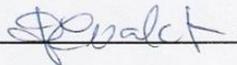
THATIANE YOSHIE KANAZAWA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). DENISE PONTES CAVALCANTI

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). LUCIANA CARDOSO BONADIA

### MEMBROS:

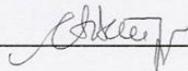
1. PROF(A). DR(A). DENISE PONTES CAVALCANTI



2. PROF(A). DR(A). DÉBORA ROMEO BERTOLA



3. PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 26 de fevereiro de 2014

## **AGRADECIMENTOS**

---

Aos meus irmãos, irmãs e sobrinhos pela presença integral em minha vida, pelo estímulo constante, ajuda no que precisei e principalmente compreensão nos momentos de aperto. E em especial minha mãe, por tudo já citado acima e ser pai e mãe ao mesmo tempo.

À Professora Denise Pontes Cavalcanti, pela orientação, paciência, transmissão de conhecimento e importante presença em minha formação acadêmica.

À Luciana Cardoso Bonadia, pela co-orientação, ajuda fora de hora, conversas, conselhos e estar sempre presente.

Aos membros titulares e suplentes da banca pelos valiosos comentários e sugestões na elaboração da tese.

Aos pacientes e seus familiares pela participação no projeto.

Ao grupo atual da Genética Perinatal e também os que já passaram por ele, pela troca de experiências e conselhos.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular pelo convívio sempre tão agradável, união, profissionalismo e amizade. Em especial ao Fábio, Fernando, Madalena, Alexandre, Marilza, Simoni, Secolin, Marina, Cynthia (que chegou depois, mas contribuiu muito!).

Às amigas de toda hora Karina Silveira e Marcela Baptista sem as quais essa caminhada teria sido menos interessante e divertida.

# RESUMO

Entre as osteocondrodisplasias (OCD) destacam-se as displasias esqueléticas do grupo 1 (FGFR3) devido à sua alta frequência. Nesse grupo, além das displasias com fenótipo característico e considerável correlação genótipo-fenótipo, como a acondroplasia (Ach) e a displasia tanatofórica (DT), está a hipocondroplasia (Hch), cujo fenótipo em geral é mais leve, apresenta grande variabilidade clínico-radiológica e heterogeneidade etiológica. O objetivo desse estudo foi sequenciar o gene *FGFR3* numa coorte de pacientes com fenótipo típico ou sugestivo. A análise molecular foi feita por sequenciamento direto, começando pelos *hot spots* e, seguindo com o sequenciamento completo do gene quando os primeiros foram negativos. Foram incluídos 63 pacientes na casuística: 30 Ach, 7 Hch, 10 Hch?, 13 DT-I e 3 DT-II. Dentre os casos de Ach, todos apresentaram a mutação mais comumente associada à Ach (p.G380R), inclusive um paciente com fenótipo atípico e suspeita de mosaïcismo somático, não comprovado, devido à assimetria corporal. Dentre os casos de Hch, todos os sete apresentaram a mutação mais comum para este fenótipo (p.N540K) inclusive dois pacientes com uma Hch grave com manifestações clínicas e radiológicas no período neonatal e dez pacientes, diagnosticados como uma Hch duvidosa (Hch?) por apresentarem baixa estatura com alguns sinais radiológicos, não foi encontrada mutação, sendo que em cinco casos, o sequenciamento não foi concluído. Três mutações diferentes, que ocorrem com maior frequência, foram identificadas entre os casos de DT-I, a p.R248C em sete pacientes, entre eles um paciente atípico por apresentar maior sobrevida, p.S249C em três e a p.Y373C em dois. Em todos os casos de DT-II, como esperado, foi encontrada a única mutação até então descrita para este fenótipo (p.K650E). Os resultados deste estudo permitiram a identificação de casos interessantes, ressaltaram a ótima correlação genótipo-fenótipo do grupo FGFR3 e reforçaram a importância da investigação molecular do gene *FGFR3* nos casos com fenótipos duvidosos ou atípicos.

# ABSTRACT

Among osteochondrodysplasias (OCD) stand out the skeletal dysplasias group 1 (FGFR3) due to its high frequency. In this group, besides the conditions with considerable characteristic phenotype and genotype-phenotype correlation, such as achondroplasia (Ach) and thanatophoric dysplasia (TD), there is hypochondroplasia (HCH), whose phenotype is generally milder, with a large clinical and radiological variability and etiological heterogeneity. The aim of this study was to sequence the *FGFR3* gene in a cohort of patients with typical or suggestive phenotype. Molecular analysis was performed by direct sequencing, starting with the hot spots, and following with the complete sequencing of the gene when the first were negative. In this sample, 63 patients were included: 30 Ach, 7 Hch, 10 Hch?, 13 DT-I and 3 DT-II. Among the Ach cases, all exhibit the most common mutation associated with Ach (p.G380R), including one patient with an atypical phenotype, with suspicious of somatic mosaicism, not confirmed, due to body asymmetry. Among the Hch cases, all the seven patients showed the most common mutation for this phenotype (p.N540K) including two patients with severe Hch with clinical and radiological manifestations in the neonatal period and ten patients, diagnosed as a doubtful Hch (Hch?), because of their low stature with some radiological signs, no mutation was found, and in five cases, sequencing was not completed. Three different mutations, which occur more frequently, were identified among the DT-I cases, p.R248C in seven patients, including an atypical patient with a long-term survival, p.S249C in three and p.Y373C in two. In all DT-II cases, as expected, the only mutation described so far for this phenotype (p.K650E) was found. The results of this study allowed the identification of interesting cases, emphasized the great genotype-phenotype correlation of FGFR3 group and reinforced the importance of molecular investigation of the *FGFR3* gene in cases with doubtful or atypical phenotypes.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

A	Adenina
Ach	Acondroplasia
Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
C	Citosina
CoSMO-B	Malformações esqueléticas congênitas e osteocondrodisplasia no Brasil
Cys (C)	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT	Displasia tanatofórica
DT-I	Displasia tanatofórica tipo I
DT-II	Displasia tanatofórica tipo II
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
G	Guanina
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido glutâmico
Gly (G)	Glicina
Hch	Hipocondroplasia
His (H)	Histidina
Ig	Imunoglobulina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
OCD	Osteocondrodisplasia
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
SADDAN	<i>Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acantosis Nigricans</i>
Ser (S)	Serina
T	Timina

Thr (T)	Treonina
TK	Tirosina quinase
TM	Transmembrana
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina
X	<i>Stop codon</i>

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Relação de pacientes estudados segundo diagnóstico clínico-radiológico.....	31
<b>Tabela 2.</b> Resumo da casuística estudada agrupada pelo diagnóstico, mutação encontrada e frequência para cada mutação. ....	41
<b>Tabela 3.</b> Resultados obtidos na clonagem após a construção de iniciadores maiores e mais específicos. ....	46
<b>Tabela 4.</b> Resultado do estudo da alteração c.1150T>C em um grupo controle e no grupo de pacientes da casuística. ....	82
<b>Tabela 5.</b> Resultados das análises <i>in silico</i> da patogenicidade da alteração c.1150T>C (40,71–74). ....	82

- Figura 1.** Espectro fenotípico observado nas osteocondrodisplasias do grupo FGFR3 (Arquivo ProGePe). ..... 22
- Figura 2.** Estrutura do receptor codificado pelo gene *FGFR3*. O peptídeo sinal localizado na região N-terminal da proteína possui 22 aminoácidos. O domínio Ig I, Ig II e Ig III correspondem à 353 aminoácidos, o domínio transmembrana (TM) corresponde a 21 aminoácidos e por fim os dois domínios citoplasmáticos da tirosina quinase possuem 410 aminoácidos juntos (15). ..... 24
- Figura 3.** Anatomia da placa de crescimento. O crescimento linear do osso é resultado da proliferação e diferenciação de condrócitos. O *FGFR3* é expresso principalmente em condrócitos da zona proliferativa onde regula precisamente a proliferação e a transição dos mesmos para a fase seguinte, a zona hipertrófica (Adaptado de Laederich e Horton, 2011(21)). ..... 25
- Figura 4.** Representação da estrutura do FGFR3 com a localização das mutações relacionadas a cada fenótipo (Modificado de BAUJAT *et al.*, 2008). ..... 26
- Figura 5.** Estratégia utilizada neste trabalho para o estudo de pacientes com diagnóstico clínico-radiológico do grupo FGFR3. .... 32
- Figura 6.** Paciente 34 apresentando um fenótipo de Ach com face atípica, assimetria corporal, onde o lado direito é maior que o lado esquerdo, desvio medial do terceiro dedo da mão direita, deficiência mental e acantose nigricans. 43
- Figura 7.** Parte do eletroferograma do exon 10 do paciente 34. O nucleotídeo 1138 é o demarcado, onde se nota um pico verde (nucleotídeo A) evidente. .... 44
- Figura 8.** Resultado obtido após clonagem molecular, ilustrando a presença predominante do nucleotídeo mutado (A). ..... 45
- Figura 9.** Análise das clonagens realizadas com o novo par de iniciadores. A sequência padrão é representada pela linha verde. Observa-se uma troca de um C por um T, 17 bases distantes do início do exon 10. Acima, a sequência do iniciador senso utilizado nas clonagens antigas. Quando o iniciador conseguia se anelar, ocorria a amplificação dos alelos portadores do nucleotídeo 1138 mutado. .... 46

<b>Figura 10.</b> Radiografias da coluna de pacientes com Hch. Nota-se que em alguns casos, como no paciente 52 ocorre um estreitamento do canal medular, característica típica de Ach, mas aqui manifestada com menos gravidade, enquanto que outros pacientes, como no 31 isso não é observado.....	48
<b>Figura 11.</b> Achados radiológicos da região de bacia e fêmur em pacientes com Hch. Nota-se um osso longo mais encurtado e metáfises mais alargadas. ....	48
<b>Figura 12.</b> Em pacientes com Hch é comum encontrar a fíbula mais longa que a tíbia, como é o caso do paciente 31.....	49
<b>Figura 13.</b> Na Hch uma característica radiológica que também pode estar presente são as epífises em cone em mãos e/ou em pés. Padrão que pode ser observado no realce do raio X do pé do paciente 31, onde se observa que a estrutura que deveria apresentar um formato achatado e regular tem o formato de cone. ....	49
<b>Figura 14.</b> Raios X típicos encontrados na DT-I (paciente 20) e DT-II (paciente 61).....	50
<b>Figura 15.</b> Paciente 11 com DT-I com a mutação c.742C>T que sobreviveu por 1 ano e 6 meses principalmente por não possuir o tórax tão estreito como a maioria dos casos com DT-I. ....	51
<b>Figura 16.</b> Paciente 23 – fotos clínicas mostrando encurtamento rizomélico dos membros e raios-X mostrando achados típicos do grupo FGFR3 nos quadris e região proximal do fêmur. Uma platispondilia leve e aumento da lordose lombar podem ser observados. ....	52
<b>Figura 17.</b> Paciente 38 – achados clínicos e radiológicos típicos de Ach.....	81
<b>Figura 18.</b> Resultado da clonagem molecular do paciente 38, indicando que no alelo em que está o nucleotídeo selvagem (G) na posição 1138, na posição 1150 tem o nucleotídeo mutado (C). ....	82

## LISTA DE QUADROS

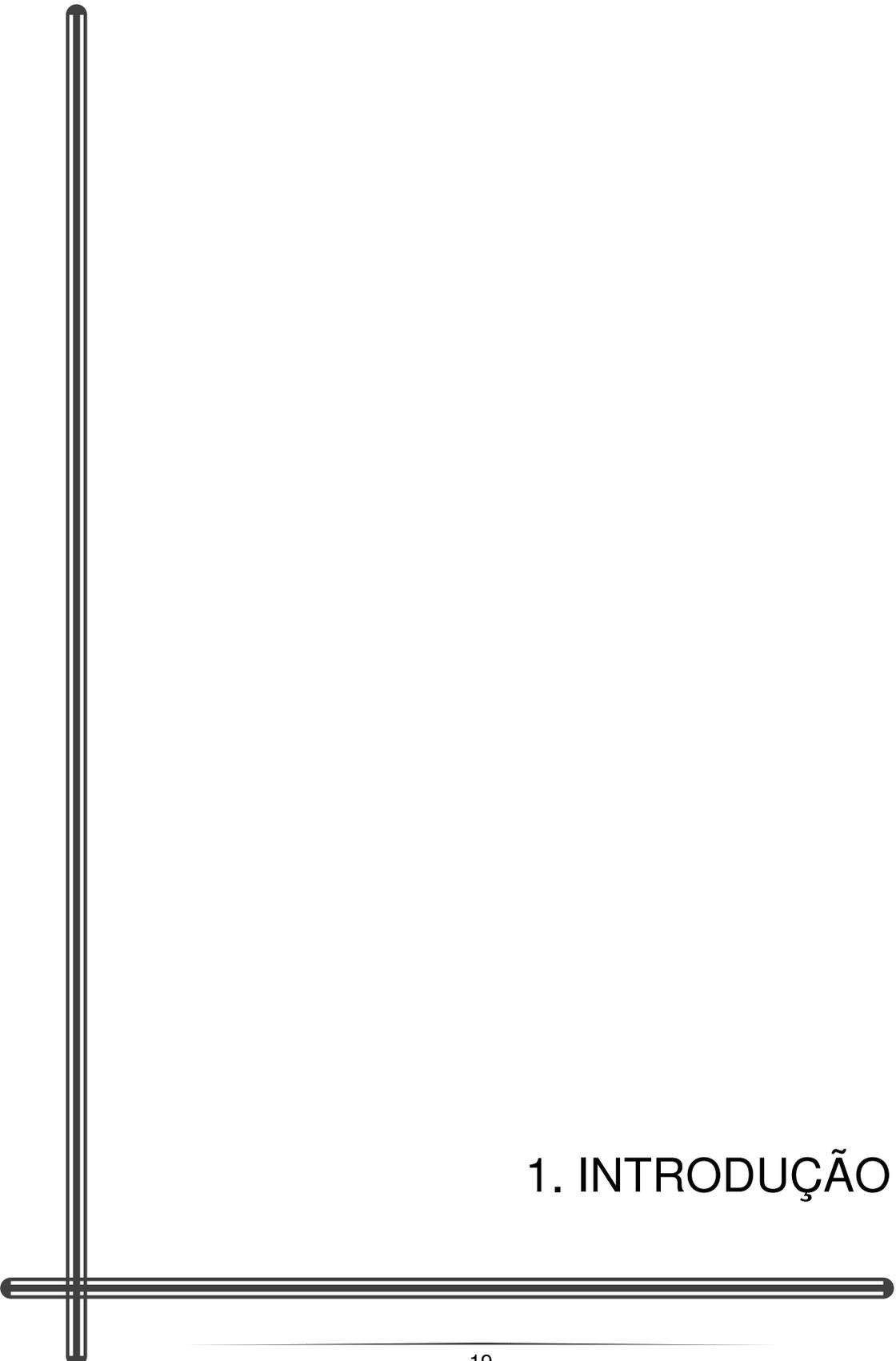
---

<b>Quadro 1.</b> Sequencia dos iniciadores senso (S) e antissenso (AS) do gene <i>FGFR3</i> . .....	34
<b>Quadro 2.</b> Relação dos pacientes incluídos na casuística, diagnóstico e a mutação encontrada. ....	39
<b>Quadro 3.</b> Sequencia do novo iniciador senso (S) e antissenso (AS) do exon 10 do gene <i>FGFR3</i> .....	45

---

1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1. Breve revisão da literatura .....	20
1.1.1. Displasias esqueléticas e o grupo FGFR3 .....	20
1.1.2. Características moleculares do grupo FGFR3 .....	23
1.1.3. Mecanismos que influenciam o fenótipo .....	27
2. OBJETIVOS .....	28
2.1. Objetivo Geral .....	29
2.2. Objetivos Específicos .....	29
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	30
3.1. Casuística .....	31
3.2. Métodos .....	32
3.2.1. Material biológico .....	33
3.2.2. Obtenção dos iniciadores ( <i>primers</i> ) .....	33
3.2.3. Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase .....	35
3.2.4. Sequenciamento por eletroforese em capilar (método de Sanger) .....	36
3.2.5. Análise de dados .....	36
3.2.6. Estudo de controles .....	37
3.2.7. Clonagem molecular .....	37
4. RESULTADOS .....	38
4.1. Acondroplasia .....	42
4.2. Hipocondroplasia .....	47
4.3. Displasia Tanatofórica .....	50
4.4. A alteração c.1150T>C .....	51
4.4.1. Manuscrito submetido à revista <i>Genetics and Molecular Biology</i> .....	53
5. DISCUSSÃO .....	58
5.1. Acondroplasia .....	59
5.2. Hipocondroplasia .....	61
5.3. Displasia Tanatofórica .....	62
6. CONCLUSÕES .....	64

7. REFERÊNCIAS .....	66
8. ANEXOS .....	74
Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética .....	75
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	76
9. APÊNDICES.....	79
Apêndice 1. Levantamento das mutações no gene <i>FGFR3</i> associadas à displasia esqueléticas do grupo FGFR3 e as respectivas frequências, quando disponível.....	80
Apêndice 2. Figuras e tabelas geradas do estudo da alteração c.1150T>C não incluídas no manuscrito submetido à revista <i>Genetics and Molecular Biology</i> . .	81
Apêndice 3. Referências utilizadas no manuscrito submetido à revista <i>Genetics and Molecular Biology</i> .....	83



# 1. INTRODUÇÃO

As displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias (OCD) são doenças genéticas que afetam o crescimento e o desenvolvimento do tecido ósseo e cartilaginoso produzindo, em geral, alterações do crescimento e contribuindo para morbi-mortalidade infantil. Essas condições têm sido classificadas em grupos ou famílias identificados de acordo com a etiologia específica (gene) ou segundo critérios clínicos e radiológicos.

Entre os grupos de OCD, destacam-se as displasias esqueléticas do grupo 1 (FGFR3), pelas suas relativamente altas frequências. Nesse grupo, além das displasias com fenótipo característico e considerável correlação genótipo-fenótipo - acondroplasia (Ach) e displasia tanatofórica (DT), a hipocondroplasia (Hch), cujo fenótipo em geral mais leve, apresenta grande variabilidade fenotípica e heterogeneidade etiológica.

Do ponto de vista clínico-radiológico, embora a maioria das OCD relacionadas ao grupo FGFR3 (Ach, DT-I, DT-II e SADDAN) possa ser reconhecida ao nascimento, ou suspeitada durante o pré-natal por exames de imagem, a Hch normalmente é de reconhecimento mais tardio, embora fenótipos mais graves possam ser detectados ao nascimento.

No presente estudo a investigação molecular de uma coorte de pacientes com fenótipos de OCD do grupo FGFR3 foi avaliada do ponto de vista da correlação genótipo-fenótipo.

## **1.1. Breve revisão da literatura**

### **1.1.1. Displasias esqueléticas e o grupo FGFR3**

As displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias (OCD) podem ser descritas como condições genéticas que alteram o crescimento e o desenvolvimento do esqueleto, afetando principalmente a ossificação endocondral de ossos longos (1,2).

As OCD são classificadas dentro da nosologia das doenças ósseas constitucionais e, atualmente, o agrupamento dessas condições em famílias ou grupos leva em conta não só aspectos clínicos e radiológicos, como também as

suas bases moleculares. Dentre os grupos de displasias esqueléticas destaca-se, pela sua frequência, o grupo FGFR3, que engloba as OCD decorrentes de mutações no gene que codifica o Receptor 3 do Fator de Crescimento de Fibroblastos – *FGFR3*. Fazem parte desse grupo as seguintes condições do espectro, listadas do fenótipo de maior gravidade para o de menor gravidade: displasia tanatofórica tipo 1 (DT-I) (OMIM 187600), displasia tanatofórica tipo 2 (DT-II) (OMIM 187601), SADDAN, do acrônimo inglês *Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans* (OMIM 187600), acondroplasia (Ach) (OMIM 100800) e a hipocondroplasia (Hch) (OMIM 146000) (Figura 1). Todas possuem padrão de herança autossômico dominante.

A acondroplasia (Ach), o protótipo das OCD desse grupo, é a forma de nanismo hereditário mais comumente observada e ocorre com uma frequência estimada de 0,4 casos a cada 10.000 nascimentos (3). As principais características clínicas são o encurtamento de membros, especialmente nas regiões proximais (rizomélico) e distais (braquidactilia), macrocefalia relativa, ponte nasal baixa e disposição dos dedos em forma de tridente. Radiologicamente, os achados são típicos com um estreitamento caudal do canal medular, bacia com formato quadrangular com estreitamento da chanfradura ciática, encurtamento de ossos longos com região proximal do fêmur radioluciente e irregularidades metafisárias com aspecto típico em joelhos. Os membros curtos conferem aos afetados uma baixa estatura desproporcionada, sendo a média para o adulto do sexo masculino  $131 \pm 5,6$  cm e para o sexo feminino  $124 \pm 5,9$  cm (4).

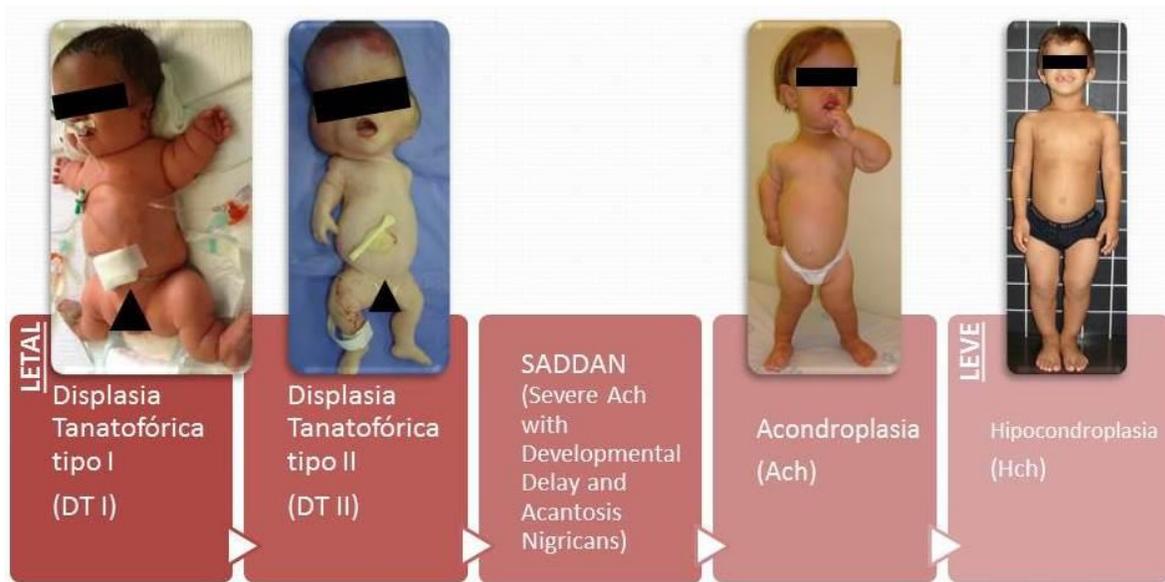
Na displasia tanatofórica (DT) o fenótipo clínico-radiológico é semelhante ao da acondroplasia, porém de muito maior gravidade e considerado letal (4). Segundo Langer e colaboradores (1987) a displasia tanatofórica pode ser dividida em dois tipos. O tipo I (DT-I), mais frequente, é caracterizado por ossos longos curvos (mais evidente nos fêmures) e grave platispondilia. O tipo II (DT-II), no entanto, caracteriza-se por fêmures retificados e platispondilia menos grave. Principalmente na DT-II, pode-se encontrar craniossinostose com crânio em forma

em trevo. A frequência estimada de DT é em torno de 0,45 a cada 10.000 nascimentos (3,5).

Na hipocondroplasia (Hch) o fenótipo também é similar ao da acondroplasia, porém, esta displasia se encontra do outro lado do espectro, e seu quadro clínico-radiológico é mais suave, podendo também apresentar maior variabilidade. Relatos de diagnóstico pré-natal são raros e o diagnóstico clínico muitas vezes é difícil na primeira infância (6).

Finalmente, a displasia denominada SADDAN, à semelhança da DT, compreende um fenótipo mais grave que o da Ach e se caracteriza por ser menos grave que a DT, portanto os pacientes sobrevivem, porém, apresentam deficiência mental e acantose nigricans (7).

As frequências para hipocondroplasia e SADDAN ainda não foram corretamente estabelecidas provavelmente pela dificuldade do diagnóstico ao nascimento e pelos poucos casos descritos na literatura, respectivamente (8).



**Figura 1.** Espectro fenotípico observado nas osteocondrodisplasias do grupo FGFR3 (Arquivo ProGePe).

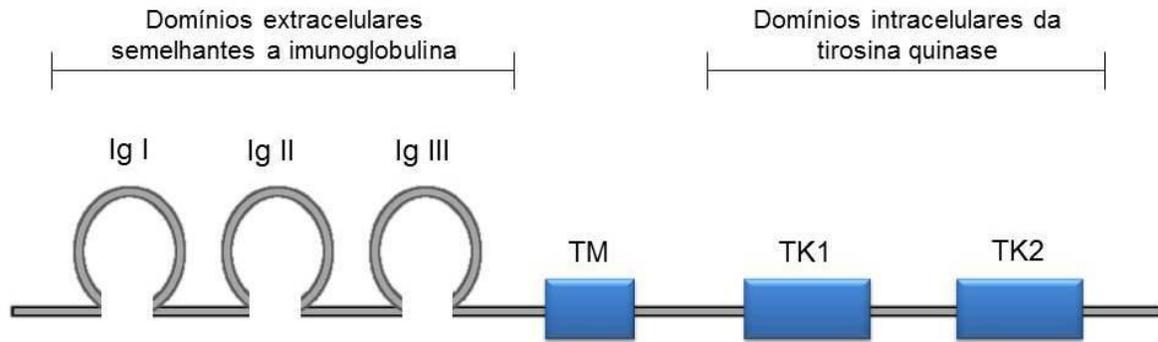
### 1.1.2. Características moleculares do grupo FGFR3

Embora as OCD desse grupo tenham sido, por décadas, reconhecidas como desordens genéticas, o papel do gene *FGFR3* na produção dessas condições começou a ser delineado em 1994 quando três grupos de forma independente mapearam a região 4p16.3 por meio de estudos de ligação (9–11). Aproximadamente seis meses após o delineamento da região candidata, dois grupos descreveram mutações no gene *FGFR3* associadas à acondroplasia (12,13).

O gene Receptor 3 do Fator de Crescimento de Fibroblastos (*FGFR3*) pertence à classe de receptores transmembrana de tirosina quinase, que possui um total de 4 FGFRs (2,14). Esse receptor desempenha um papel essencial na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular. Especificamente, regula a diferenciação, proliferação e apoptose de condrócitos, necessária para um desenvolvimento normal do esqueleto e regulação da osteogênese e mineralização pós-natal do osso através dos osteoblastos (15).

O gene *FGFR3* é expresso principalmente no cérebro, tecidos embrionários, rim, próstata, bexiga e útero, além do tecido ósseo (16).

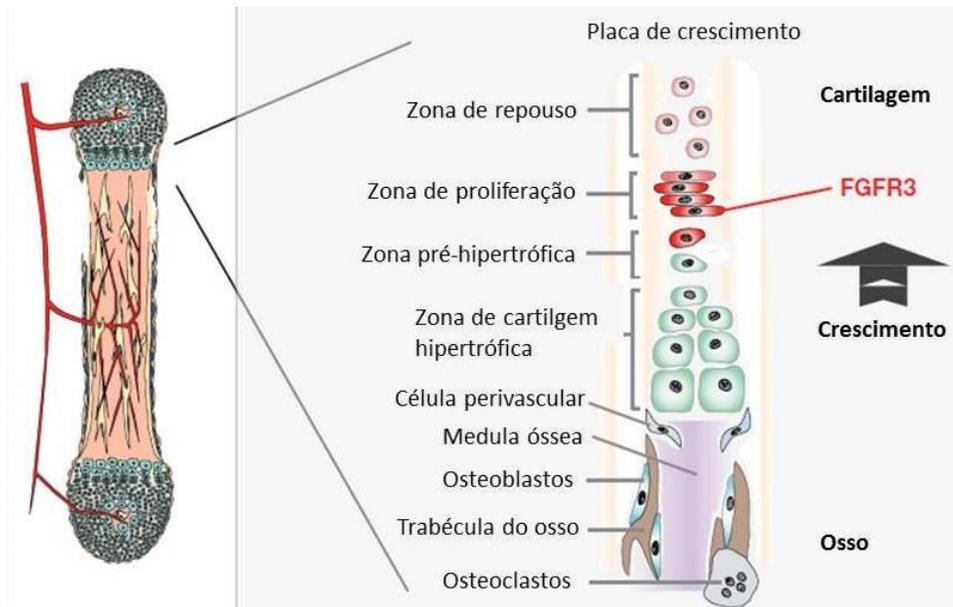
O *FGFR3* possui 17 *exons* transcritos e aproximadamente 4.132 pb (17). A proteína da família de receptores codificada pelo gene *FGFR3* possui três domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina, um domínio transmembrana e dois domínios de tirosina quinase intracelulares (Figura 2) (18).



**Figura 2.** Estrutura do receptor codificado pelo gene *FGFR3*. O peptídeo sinal localizado na região N-terminal da proteína possui 22 aminoácidos. O domínio Ig I, Ig II e Ig III correspondem à 353 aminoácidos, o domínio transmembrana (TM) corresponde a 21 aminoácidos e por fim os dois domínios citoplasmáticos da tirosina quinase possuem 410 aminoácidos juntos (15).

O *FGFR3* possui ligantes específicos que são os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF). Dezoito FGFs são conhecidos em mamíferos e todos estão localizados na matriz extracelular. O padrão de expressão dos FGFs indica sua importância no desenvolvimento embrionário inicial e na organogênese, principalmente no desenvolvimento de membros, pulmão, ossos e cérebro. O *FGFR3* possui mais afinidade com os FGFs 1, 2, 4, 8 e 9 (7,14,19).

A ligação dos FGFs ao domínio extracelular do *FGFR3* ativa o domínio intracelular de tirosina quinase do receptor e inicia uma cascata de sinalização. No osso endocondral, a ativação do *FGFR3* inibe a proliferação dos condrócitos na placa de crescimento, ajudando assim na coordenação do crescimento e na diferenciação dos condrócitos com o crescimento e a diferenciação das células progenitoras do osso (Figura 3) (20).



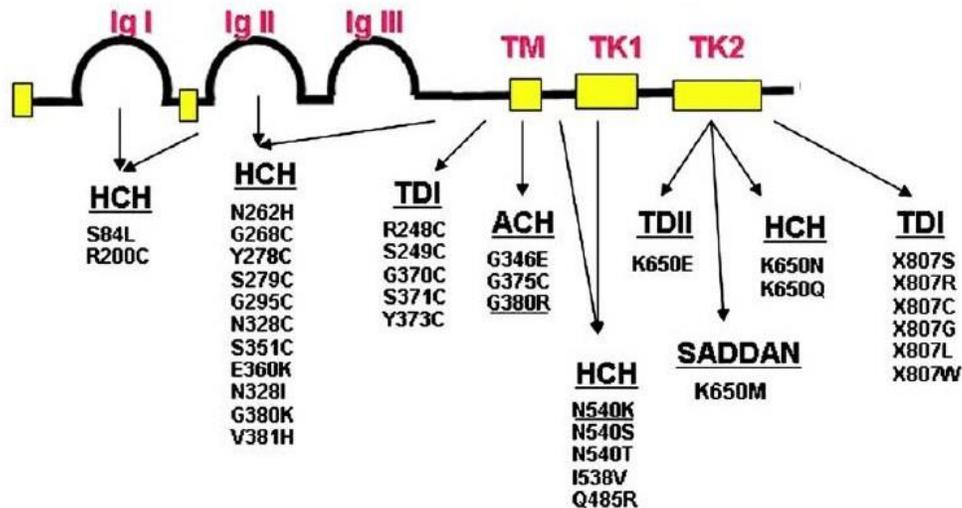
**Figura 3.** Anatomia da placa de crescimento. O crescimento linear do osso é resultado da proliferação e diferenciação de condrócitos. O *FGFR3* é expresso principalmente em condrócitos da zona proliferativa onde regula precisamente a proliferação e a transição dos mesmos para a fase seguinte, a zona hipertrófica (Adaptado de Laederich e Horton, 2011(21)).

Existem atualmente aproximadamente 48 mutações do tipo *missense* (mutações de sentido trocado) e *nonsense* (mutação sem sentido) descritas no gene *FGFR3* e associadas à algum fenótipo alterado (22). As mutações associadas ao grupo de displasias esqueléticas *FGFR3* representam 41 dessas mutações e ocorrem, sobretudo em “*hot spots*”. As mais comuns ocorrem nos *exons* 13 (40-50%), 10 (99%), 6 (56%), e 15 (99%) para Hipocondroplasia, Acondroplasia, Displasia Tanatofórica I e Displasia Tanatofórica II, respectivamente. Os poucos casos descritos de SADDAN, apresentam a mutação c.1949A>T (p.K650M) no *exon* 15 (Figura 4) (23).

Funcionalmente, as mutações associadas às OCDs do grupo *FGFR3* são do tipo ganho de função, causando assim uma ativação do receptor independente de um ligante. A ativação ocorre quando um complexo resulta na dimerização do receptor, autofosforilação e sinalização intracelular. Essa ativação constitutiva decorrente da mutação inibe inadequadamente a proliferação de condrócitos na

placa de crescimento, conseqüentemente levando ao encurtamento dos ossos longos, bem como a diferenciação anormal de outros ossos (20,24,25).

A mutação mais comum no *FGFR3* responsável pelo fenótipo da Ach a p.G380R, introduz um aminoácido arginina no domínio transmembrana hidrofóbico. Este aminoácido normalmente não é encontrado em membranas celulares, e confere atividade ao receptor independente de um ligante (26). De modo similar, a mutação p.R248C também confere atividade ao receptor independente de um ligante, no entanto, nessa mutação a conformação diferencial da proteína leva a uma forte ativação do receptor o que resulta em um fenótipo mais grave, a DT-I. A mutação p.K650E ativa a quinase aproximadamente 100 vezes mais quando comparado ao receptor selvagem, o que representa aproximadamente 20 vezes mais do que a ativação causada pela p.G380R e resulta no fenótipo de DT-II. Enquanto que a p.K650M resulta em SADDAN. Mutações no aminoácido K650 são um exemplo de como diferentes aminoácidos na mesma posição podem determinar o grau de ativação e de gravidade dos fenótipos. (25).



**Figura 4.** Representação da estrutura do *FGFR3* com a localização das mutações relacionadas a cada fenótipo (Modificado de BAUJAT *et al.*, 2008).

### 1.1.3. Mecanismos que influenciam o fenótipo

Apesar dos fenótipos do espectro FGFR3 apresentarem forte correlação genótipo-fenótipo, como é o caso da acondroplasia e da displasia tanatofórica, há relatos de casos atípicos envolvendo principalmente mecanismos moleculares.

Mosaicismo somático é caracterizado quando há a presença de populações de células geneticamente distintas em um determinado organismo. Frequentemente ele não se manifesta, mas também pode resultar em grandes mudanças fenotípicas e revelar de outra forma a expressão de mutações genéticas letais (27).

Mosaicismo germinativo e somático são eventos razoavelmente comuns em doenças genéticas (28). Como a acondroplasia é uma condição associada a uma mutação em uma região do genoma altamente mutável, altas frequências de mosaicismo poderiam ser esperadas (29). Porém, relatos clínicos de mosaicismo somático em acondroplasia são raros (29–31). Por alguma razão, o mosaicismo somático ou germinativo ocorre com menos frequência na acondroplasia do que em outras doenças de caráter dominante. Uma hipótese é de que o nucleotídeo 1138 só é hipermutável na linhagem germinativa masculina ou que poderia haver uma seleção somática contra as células portadoras do alelo mutante (29).

Uma alteração até então não descrita em casos de displasias esqueléticas, a c.1150T>C, foi relatada inicialmente em duas famílias, em pacientes e alguns membros da família (32) e posteriormente, em outro estudo, em material de aborto sendo o pai também portador da mesma alteração sem nenhuma característica clínica importante. Baseado em tais achados, os autores sugeriram que esta alteração age no receptor com um efeito patológico aditivo quando combinado com outras alterações no mesmo receptor ou em outros receptores da família FGF (33).

## 2. OBJETIVOS

## **2.1. Objetivo Geral**

Pesquisar mutações no gene *FGFR3* em uma coorte de pacientes com fenótipo de OCD do grupo FGFR3 de modo a ampliar o conhecimento da relação genótipo-fenótipo.

## **2.2. Objetivos Específicos**

1. Fazer uma análise crítica das correlações genótipo-fenótipo dos casos estudados.
2. Verificar a frequência da alteração c.1150T>C (exon 10) na coorte de pacientes estudados e compará-la com a frequência da mesma em uma população controle;
3. Investigar presença de mosaïcismo em um paciente com fenótipo de Ach associado à deficiência mental e assimetria corporal.

A decorative L-shaped frame composed of two parallel lines, one vertical on the left and one horizontal at the bottom, both with rounded ends.

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas de acordo com o parecer em anexo (Anexo 1) e todos os indivíduos e responsáveis foram orientados quanto à investigação proposta, tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

### 3.1. Casuística

Foram incluídos no estudo 63 pacientes com diagnóstico clínico e radiológico típico de osteocondrodisplasias do grupo FGFR3 e entre eles, dez pacientes com diagnóstico duvidoso de Hch por apresentarem baixa estatura levemente desproporcionada com poucos sinais radiológicos.

A distribuição desses casos, conforme o diagnóstico clínico-radiológico encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação de pacientes estudados segundo diagnóstico clínico-radiológico.

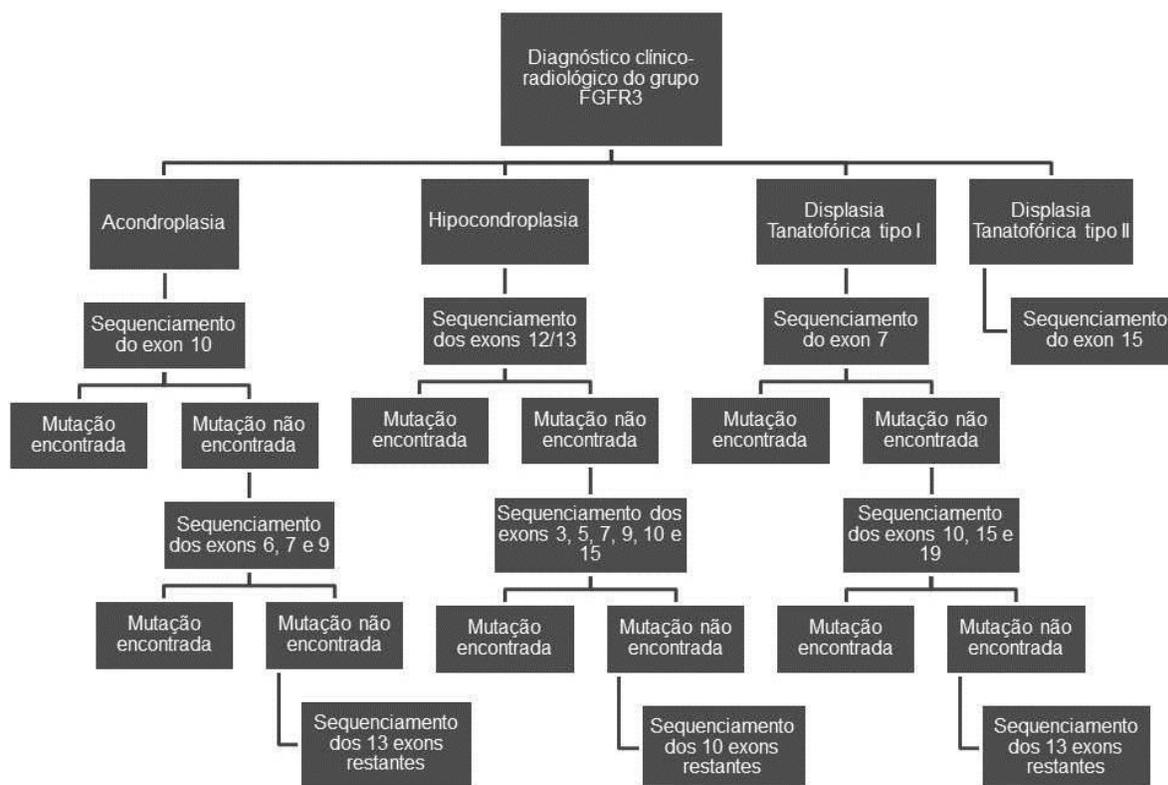
<b>Diagnóstico inicial</b>	<b>Número de pacientes</b>
Ach	29
Hch	5
Hch??	10
Ach/Hch	2
Ach/SADDAN	1
DT-I	13
DT-II	3
Total	63

A casuística do presente projeto foi selecionada a partir da triagem de pacientes com osteocondrodisplasias nos seguintes locais: Programa de Genética Perinatal (Departamento de Genética Médica - CAISM / UNICAMP), Ambulatório de Displasias Esqueléticas (Hospital das Clínicas – UNICAMP), além de pacientes enviados pelos grupos colaborativos de projetos de pesquisa (34) (Projeto “Malformações Esqueléticas Congênitas e Osteocondrodisplasias no Brasil (Cosmo-B): Uma Estratégia Colaborativa para o Manejo Clínico e Pesquisa Básica” [CNPq - 590148/2011-7]).

### 3.2. Métodos

Inicialmente, a pesquisa de mutações foi realizada por meio do sequenciamento dos *hot spots* conhecidos: exon 10 para Ach, exon 12/13 para Hch, exon 7 para DT-I e exon 15 para DT-II.

Todos os pacientes com diagnóstico de Hch com análise molecular negativa no exon 13 foram também testados para os exons 3, 5, 7, 9 e 15, e, se negativos o sequenciamento do gene *FGFR3* era completado (Figura 5).



**Figura 5.** Estratégia utilizada neste trabalho para o estudo de pacientes com diagnóstico clínico-radiológico do grupo *FGFR3*.

### **3.2.1. Material biológico**

O DNA genômico dos pacientes da casuística foi obtido através do protocolo de extração padrão de fenol e clorofórmio do Laboratório de Genética Médica/FCM adaptado de Sambrook & Russel (35) que além de propiciar a obtenção de grande quantidade de DNA possui um baixo custo. Na maioria dos casos utilizou-se DNA de sangue periférico. Em alguns poucos casos, o DNA foi obtido de fibroblastos provenientes de cultivo de pele ou cartilagem. As amostras obtidas foram quantificadas no espectrofotômetro Epoch™ (BioTek Instruments, Inc.©) e, em seguida diluídos para a concentração final de 50ng/μL.

### **3.2.2. Obtenção dos iniciadores (*primers*)**

Para a amplificação dos exons do gene *FGFR3* foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam essas regiões. A sequência dos iniciadores foi gentilmente cedida por Laurence Legeai-Mallet do centro de referência em doenças ósseas constitucionais do Hôpital Necker-Enfants Malades em Paris. As sequências recebidas foram conferidas com o banco de dados Ensembl© (17) e sintetizados em uma escala de 25nmol. A nomenclatura foi adaptada a fim de se manter o consenso com a literatura e as sequências dos iniciadores senso e antissenso podem ser observadas no quadro 1.

**Quadro 1.** Sequencia dos iniciadores senso (S) e antissenso (AS) do gene *FGFR3*.

Exons	Tamanho (pares de bases)	Temperatura (°C)	Sequência	
			S	AS
Exon 2	350pb	62,6	S AS	AGG GGT CGG GAC GCA GGA G CCC AAC GCC TCT GCC CGC AC
Exon 3	331pb	59,1	S AS	GCC CAT CTT CCC CAC AGA CTC GGC TCC TTT CTG TAG
Exon 4	264pb	59,1	S AS	GGT CTC TCT GGT CAT TGG TG CTT GGC GGT GGC AGC GGG
Exon 5	325pb	59,1	S AS	TGG GGA TGG GCA GGG GCA GTG AGC GGA GGC AGC AAC
Exon 6	448pb	61,7	S AS	CTG AAG AAC GGC AGG GAG T CAC TGT ACA CCT TGC AGT GGA
Exon 7	284pb	62,9	S AS	GGT GAG GGA GGG GGT GGC GCC AGC CCA GGA GCC CCA
Exon 9	213pb	59,7	S AS	CCT ATC GCT CTG CTC TCT C CCC CAG ACA GTG CGG AGC
Exon 10	271pb	64,6	S AS	CAG GCC AGG CCT CAA CGC CC AGG CCT GGC GGG CAG GCA GC
Exon 11	241pb	59,1	S AS	CCA CGC CCT GTC GCC CAC CAC CAA GCC CCC TAC AGC C
Exon 12/13	469pb	60,1	S AS	CCG TGG TGG GCT GAG AGT G GAC ACG GGC TCC TCA GAC G
Exon 14	302pb	59,1	S AS	CGG TAG CGG CGG TGG TGC GCC CAG CCT ACT CCA CCC
Exon 15	217pb	60,1	S AS	GGT GGA GAG GCT TCA GCC CT GCC AGG CGT CCT ACT GGC ATG A
Exon 16	163pb	60,4	S AS	TCA TGC CAG TAG GAC GCC CCG CCT CCA CCC CTG AAG
Exon 17	228pb	63,9	S AS	GGT GCC CGC CCA GGT GTC CAG TGG AGG GCC AGG GAT G
Exon 18	187pb	63,9	S AS	GAA GCG GCG GGG CTC ACT C GGG GCA TAG GCG GGT GGC
Exon 19	267pb	63,9	S AS	AGA GGT GGC TGT GCG AAG A GCA CCA GCA GCA GGG TGG

### 3.2.3. Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar os fragmentos de DNA genômico de interesse.

As PCRs foram realizadas com um volume final de 10uL, contendo 50ng de DNA genômico; 10 picomoles de cada iniciador; 1,5U de Taq e concentrações finais de 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 80μM de cada desoxirribonucleotídeo, tampão 1X com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [20mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 75mM de Tris-HCl pH8,4; 0,01% (v/v) de Tween 20]. Para todos os pares de iniciadores, foi necessária a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) em uma porcentagem de 5% para a otimização da reação.

As condições para a realização da PCR foram: desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à temperatura de anelamento específica dos pares de iniciadores e 1 minuto à 72°C; seguida da extensão final à 72°C por 10 minutos.

Para otimizar o processo de amplificação dos *amplicons* e minimizar o surgimento de bandas inespecíficas, foi utilizada a técnica de *Touchdown PCR* para alguns pares de iniciadores (36). A temperatura de anelamento no primeiro ciclo foi programada para 10°C acima da temperatura de anelamento específica do par de iniciador. Em cada ciclo, a temperatura diminui 0,5°C e, após 20 ciclos, atinge a temperatura de anelamento ideal. Os ciclos seguintes seguem a temperatura específica dos iniciadores.

As reações foram realizadas em paralelo com um controle sem DNA (branco) com a finalidade de identificar possíveis contaminações. Após a amplificação, foi realizada eletroforese (~40min-100V) em gel de agarose a 1,5% com a aplicação de 2μl da PCR com 2μl de azul de bromofenol. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pares de base (GeneRuler™ DNA Ladder Thermo Scientific©). O gel de agarose foi corado com o fluoróforo SYBR® Safe (Invitrogen™) e fotografado sob luz ultravioleta a fim de avaliar a qualidade da reação.

### 3.2.4. Sequenciamento por eletroforese em capilar (método de Sanger)

As reações de sequenciamento foram feitas para um volume final de 10µl, contendo 2µl de solução tampão fornecida, 1,0µl de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®), 0,5µl de iniciador senso ou antissenso (10pmol/µl), 1,0µl de PCR e 5,5µl de água. As condições para a realização do sequenciamento foram: 35 ciclos de 20 segundos à 95°C, 15 segundos à 50°C e 1 minuto à 60°C.

A purificação das amostras para o sequenciamento foi realizada com EDTA e etanol de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems®). Após a finalização do processo de purificação as amostras foram solubilizadas em 10 µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems®). Todas as reações foram realizadas em duplicata e sequenciadas utilizando o equipamento ABI 3500XL (Applied Biosystems®).

### 3.2.5. Análise de dados

O resultado do sequenciamento foi obtido em arquivos com extensão “.ab1” e a análise dos mesmos, quando apropriado, foi realizada com o programa Codon Code Aligner versão 4.1.1, um programa que permite a visualização do eletroferograma, alinha e detecta alterações nucleotídicas (37). Os resultados obtidos foram comparados com bancos de dados como *Ensembl* e HGMD® (17,22).

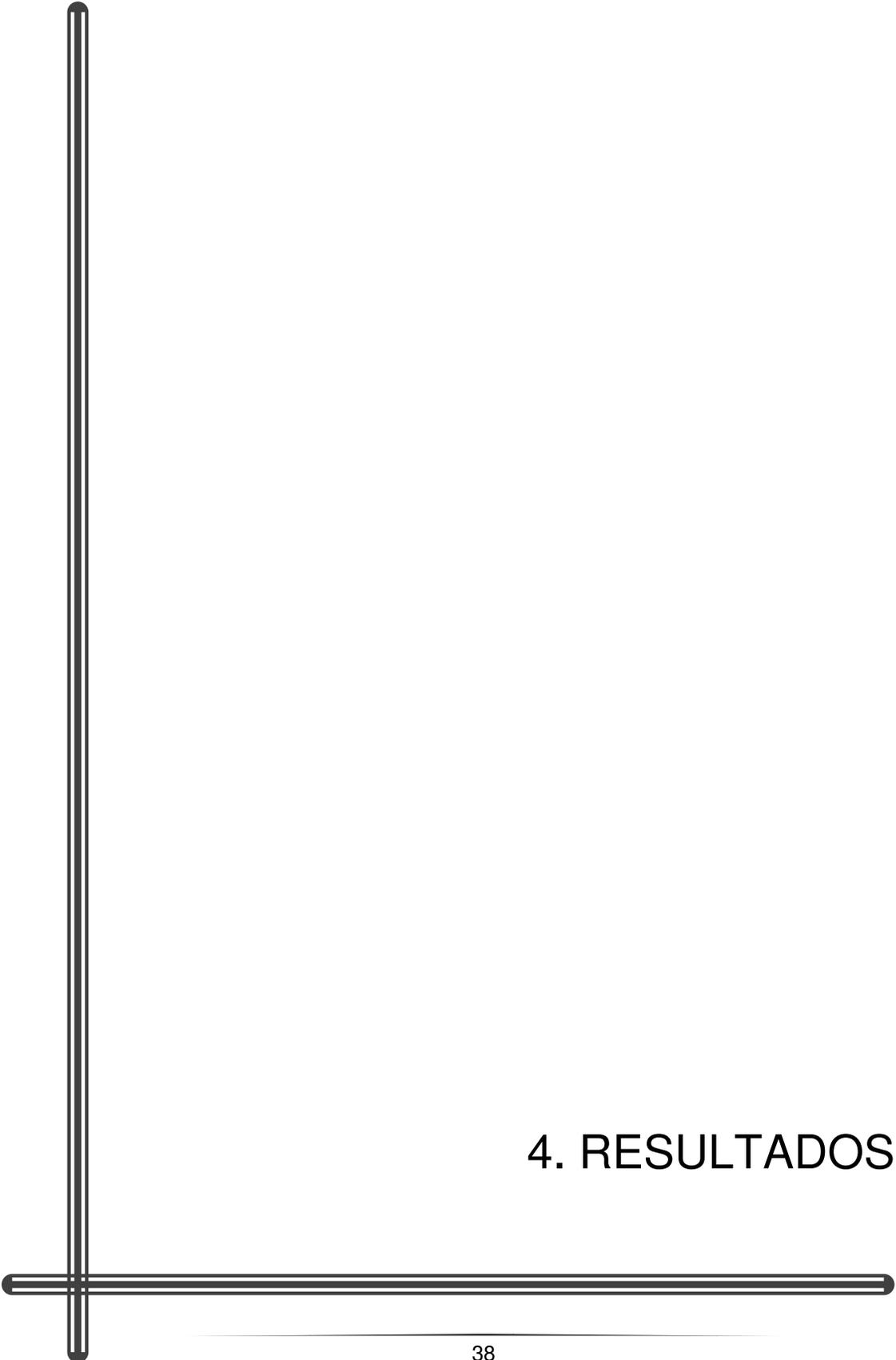
Aqueles que resultaram em troca de aminoácido na proteína codificada foram submetidas à análise *in silico* em diferentes algoritmos, a fim de estimar seu efeito na estrutura e função da proteína. Essas análises levam em consideração as diferenças físico-químicas entre o aminoácido original e o alterado, além de, no caso das análises de bioinformática, a posição da alteração e o nível de conservação entre sequências homólogas. Os *softwares* MutPred®, Polyphen2® e SNPs&GO® avaliam a substituição da base nitrogenada baseando-se numa combinação de parâmetros funcionais e estruturais das proteínas, enquanto o SIFT® e o Panther® consideram informações evolutivas para tal (38)

### **3.2.6. Estudo de controles**

As amostras incluídas no grupo de controles do Programa de Genética Perinatal são de DNA de sangue de cordão de recém-nascidos saudáveis nascidos no CAISM e para os quais se conhecia apenas o estado de saúde e o gênero.

### **3.2.7. Clonagem molecular**

A clonagem molecular consiste em inserir um fragmento desejado em células bacterianas e isolá-las em colônias permitindo a análise molecular dos alelos separados. Uma estratégia bastante fidedigna para o estudo de linhagens celulares em mosaico. Teoricamente, em casos de heterozigose na ausência de mosaicismo, em uma contagem de 100 clones a taxa de distribuição dos alelos deve ser em torno de 50%. A primeira etapa da clonagem consiste na ligação entre o fragmento de DNA de interesse com o vetor, formando uma molécula de DNA recombinante. Na segunda etapa, a molécula de DNA recombinante é inserida em uma célula hospedeira ou competente. No presente estudo, a técnica foi realizada utilizando células competentes DH5 $\alpha$  (*Escherichia coli*) com o vetor pGEM® - T Easy (Promega®) conforme as instruções do fabricante. A célula competente contendo o fragmento de interesse sofreu muitos ciclos de divisão e diferentes clones foram então selecionados, extraiu-se e purificou-se o DNA plasmidial e foram submetidos à sequenciamento, a fim de se obter a sequência nucleotídica de cada alelo isolado.

A decorative graphic consisting of a vertical line on the left and a horizontal line at the bottom, both rendered as double-lined strokes with rounded ends. The vertical line is on the left side of the page, and the horizontal line is at the bottom, meeting at a corner.

## 4. RESULTADOS

Participaram do estudo 63 pacientes com fenótipos do espectro FGFR3, distribuídos de acordo com os seguintes diagnósticos: Ach (30), Hch (07), DT-I (13), DT-II (03) e Hch? (10). Estes últimos classificados como uma Hch duvidosa por apresentarem baixa estatura levemente desproporcionada com poucos sinais radiológicos.

A relação completa dos pacientes incluídos na casuística, sexo, idade, vitalidade, diagnóstico e a mutação, encontra-se abaixo no quadro 2.

**Quadro 2.** Relação dos pacientes incluídos na casuística, diagnóstico e a mutação encontrada.

Paciente	Sexo	Idade	Vitalidade (NV/NM)	Diagnóstico	Mutação		
					Aminoácido	Proteína	Exon
1	F	16a11m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
2	M	14a4m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
3	F	Óbito (25min)	NV	DT-I	746 C>G	S249C	7
4	F	14a3m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
5	F	52a7m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
6	F	11a7m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
7	F	si	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
8	M	Óbito	NM	DT-I	746 C>G	S249C	7
9	M	8a1m	NV	Hch	1620 C>A	N540K	13
10	M	Óbito (min)	NV	DT-I	742 C>T	R248C	7
11	F	Óbito 1a6m	NV	DT-I	742 C>T	R248C	7
12	F	7a4m	NV	Hch?	SM		
13	F	33a7m	NV	Hch?	SM		
14	F	14a	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
15	F	si	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
16	F	30a4m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
17	M	Óbito (32min)	NV	DT-I	1118 A>G	Y373C	10
18	M	4a10m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
19	F	si	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
20	M	Óbito	NM	DT-I	742 C>T	R248C	7
21	F	27a6m	NV	Hch?	SM <sup>2</sup>		
22	F	47a10m	NV	Hch?	SM <sup>2</sup>		
23	M	3a4m	NV	Hch	1620 C>A	N540K	13
24	F	Óbito (1d)	NV	DT-II	1948 A>G	K650E	15
25	F	1a11m	NV	Ach	1138 G>C	G380R	10
26	F	4a3m	NV	Hch	1620 C>A	N540K	13

27	M	37a4m	NV	Hch?	SM <sup>2,5</sup>		
28	M	2a11m	NV	Hch?	SM		
29	F	Óbito	NM	DT-I	1118 A>G	Y373C	10
30	si	si	si	DT-I	746 C>G	S249C	7
31	M	8a6m	NV	Hch	1620 C>A	N540K	13
32	M	5a2m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
33	F	11a8m	NV	Hch	1620 C>G	N540K	13
34	M	18a10m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
35	F	4a	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
36	M	11a4m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
37	F	10a6m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
38	M	6a4m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
39	F	11a8m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
40	F	32a1m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
41	M	14a7m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
42	F	10a1m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
43	F	28a3m	NV	Hch?	SM		
44	F	3a1m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
45	F	15a3m	NV	Hch?	SM <sup>5</sup>		
46	M	1a8m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
47	si	si	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
48	si	si	si	DT-I	742 C>T	R248C	7
49	si	si	si	DT-II	1948 A>G	K650E	15
50	si	si	si	DT-I	742 C>T	R248C	7
51	si	si	si	DT-I	742 C>T	R248C	7
52	F	1a6m	NV	Hch	1620 C>G	N540K	13
53	M	1a	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
54	M	1a	NV	DT-I	742 C>T	R248C	7
55	M	si	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
56	F	7a11m	NV	Hch	1620 C>A	N540K	13
57	M	8a1m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
58	M	1a8m	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
59	M	2a	NV	Ach	1138 G>A	G380R	10
60	si	si	si	DT-I	1138 G>A	G380R	10
61	F	si	si	DT-II	1948 A>G	K650E	15
62	M	10a	NV	Hch?	SM		
63	F	si	NV	Hch?	SM <sup>2</sup>		

Legenda: si: sem informação. min: minutos. d: dias. m: meses. a: anos. NV: Nativivo. NM: Natimorto. F: Feminino. M: Masculino. SM: Sem mutação no *FGFR3*. SM<sup>2</sup>: Sem mutação, exon 2 não analisado. SM<sup>5</sup>: Sem mutação, exon 5 não analisado. SM<sup>2,5</sup>: Sem mutação, exon 2 e 5 não analisados.

O resumo dos resultados encontrados com o estudo da presente casuística pode ser visto na tabela 2.

**Tabela 2.** Resumo da casuística estudada agrupada pelo diagnóstico, mutação encontrada e frequência para cada mutação.

Diagnóstico (total de pacientes)	Mutação no <i>FGFR3</i>		Número de pacientes	Frequência (%)
Acondroplasia (30)	c.1138 G>A	p.G380R	29	96,7
	c.1138 G>C		1	3,3
Hipocondroplasia (07)	c.1620 C>A	p.N540K	5	71,4
	c.1620 C>G		2	28,6
Hipocondroplasia? (10)	SM		5	
	SM*		5	
Displasia Tanatofórica tipo I (13)	c.742 C>T	p.R248C	7	58,3
	c.746 C>G	p.S249C	3	25,0
	c.1118 A>G	p.Y373C	2	16,7
	c.1130 T>C + c.1138 G>A**		1	
Displasia Tanatofórica tipo II (3)	c.1948 A>G	p.K650E	3	100
<b>Total</b>			<b>63</b>	

Legenda: SM: sem mutação. SM\*: sequenciamento incompleto, três casos falta apenas o exon 2, um caso falta apenas o exon 5 e um caso faltam os exons 2 e 5. \*\* alteração ainda necessita confirmação.

Entre os pacientes com Ach, 16 (55,2%) eram do sexo feminino, 13 (44,8%) masculino e de um não se sabia o sexo. Todos foram nativos e a idade dos pacientes variou de um ano a 52 anos e sete meses, de cinco pacientes não se sabia a idade. Entre os pacientes com Hch, 4 (57,1%) eram do sexo feminino e 3 (42,9%) masculinos. Todos pacientes com Hch foram nativos e a idade variou de um ano e seis meses a 33 anos e sete meses. Entre os pacientes com diagnóstico duvidoso de Hch, 7 (70%) eram do sexo feminino e 3 do sexo masculino (30%), sendo que a idade variou de 15 anos e três meses a 47 anos e 10 meses. Para as DT-I, de cinco pacientes não se sabia o sexo, três femininos (37,5%) e cinco (62,5%) masculinos. Em relação à vitalidade, não se tinha a informação de cinco

pacientes, três pacientes são natimortos e os outros cinco morreram, no qual o tempo do óbito variou dos primeiros minutos após o nascimento a um ano e seis meses de idade. Em relação aos pacientes com DT-II sabe-se que dois são do sexo feminino e um deles foi um nativivo que morreu com um dia de vida.

#### **4.1. Acondroplasia**

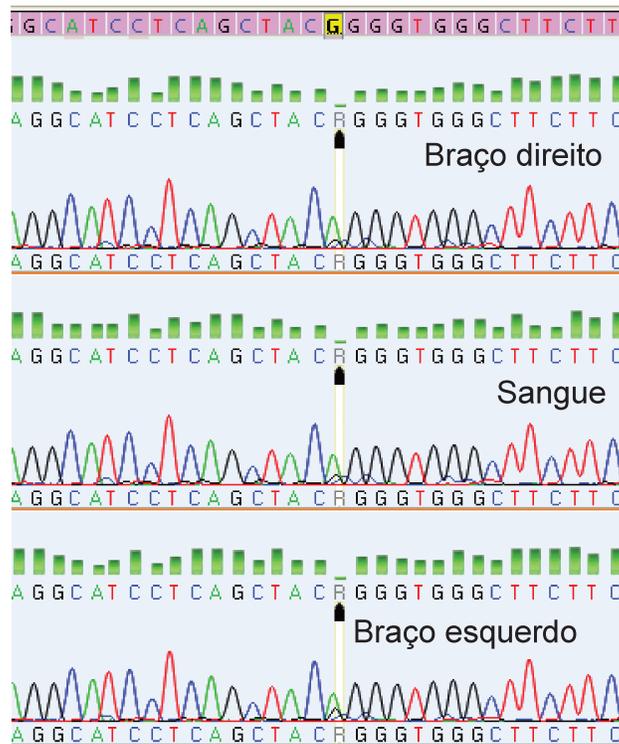
Todos os pacientes com Ach, exceto um, apresentaram quadro clínico radiológico típico.

Entre os casos de Ach, o paciente 34 se destacou dos demais por possuir um fenótipo atípico. Paciente do sexo masculino, 16 anos, estatura de 125cm, filho de casal não consanguíneo e ambos com estatura acima da média brasileira (Pai: 189cm; Mãe: 175cm). Ademais do fenótipo de Ach esse paciente apresenta: assimetria corporal, acantose nigrican e retardo mental (Figura 6).



**Figura 6.** Paciente 34 apresentando um fenótipo de Ach com face atípica, assimetria corporal, onde o lado direito é maior que o lado esquerdo, desvio medial do terceiro dedo da mão direita, deficiência mental e acantose nigricans.

Para afastar a possibilidade de alguma alteração cromossômica, em mosaico, os cariótipos de sangue, pele do braço esquerdo e pele do braço direito foram realizados, todos com resultados normais (46,XY). O estudo molecular desse caso se iniciou a partir dos exons 10 e 15, haja visto o diagnóstico inicial duvidoso entre Ach e SADDAN. O primeiro eletroferograma obtido deste paciente apresentou um padrão atípico para a alteração mais comum para a Ach, a c.1138G>A, sugerindo uma homozigose (Figura 7). Para afastar a presença de uma segunda mutação no gene *FGFR3*, todos os exons foram estudados e nenhuma alteração patogênica foi encontrada nos demais exons.



**Figura 7.** Parte do eletroferograma do exon 10 do paciente 34. O nucleotídeo 1138 é o demarcado, onde se nota um pico verde (nucleotídeo A) evidente.

Para tentar comprovar a hipótese levantada de mosaïcismo, procedeu-se a clonagem molecular, que permitiria a análise de cada alelo isolado, cujos resultados iniciais mostrava em um total de 79 clones analisados, uma porcentagem de 96,2% de alelos com o nucleotídeo mutado (A) e apenas 3,8% de alelos com o nucleotídeo selvagem (Figura 8).

```

GCATCCTCAGCTACAGGGTGGGCTTCTTCC

```

**Figura 8.** Resultado obtido após clonagem molecular, ilustrando a presença predominante do nucleotídeo mutado (A).

Para confirmar esse resultado e afastar a possibilidade de ampliações preferenciais na técnica de PCR, foi construído um novo par de iniciadores para o exon 10, composto por mais pares de base, sendo assim mais específico e com um produto amplificado maior, como pode ser observado no quadro 3.

**Quadro 3.** Sequencia do novo iniciador senso (S) e antissenso (AS) do exon 10 do gene *FGFR3*.

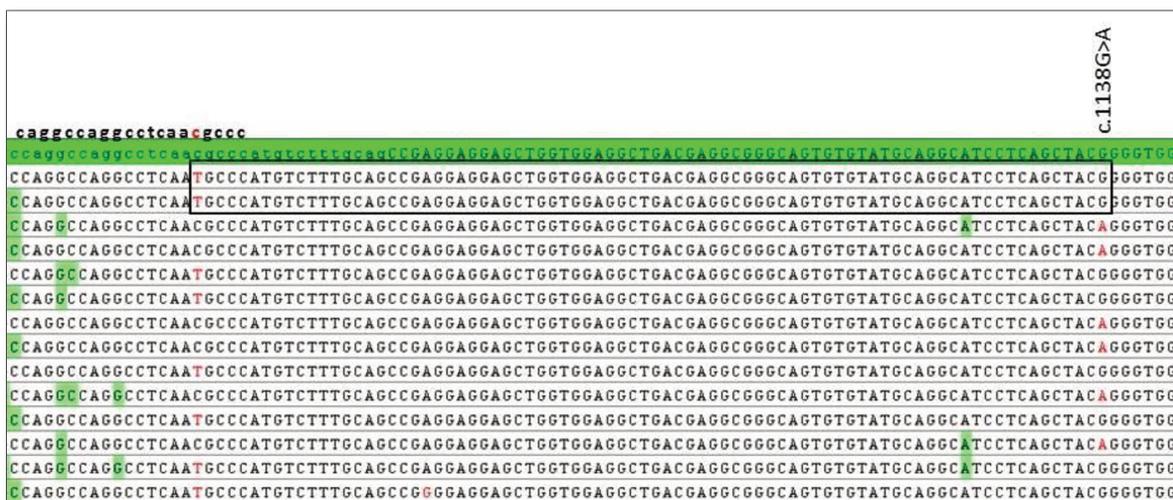
Exon	Tamanho (pares de bases)	Temperatura (°C)	Sequência	
Exon 10	707pb	55°C	S	CTCTAGACTCACTGGCGTACTG
			AS	GTGGTGTGTTGGAGCTCATG

A clonagem utilizando esse novo par de iniciadores mostrou uma proporção de alelos equilibrada (Tabela 3), indicando uma heterozigose comum sem mosaïcismo. A porcentagem que antes era representada por 96% de alelos mutados, agora ocorre com uma distribuição de 48,6% de alelos mutados para 51,4% de alelos selvagens de 138 clones analisados.

**Tabela 3.** Resultados obtidos na clonagem após a construção de iniciadores maiores e mais específicos.

	Sangue Periférico	Braço Direito	Braço Esquerdo
Alelo selvagem (G)	23	24	24
Alelo mutado (A)	23	24	20
Total	46	48	44

Averiguando os resultados conflitantes obtidos com pares de iniciadores distintos, observou-se que o paciente 34 possui um polimorfismo intrônico 17 nucleotídeos distante do início do exon 10. Analisando a sequencia dos antigos iniciadores, verificou-se que a sequencia senso que possui 20 pares de base, foi construída na região que o paciente apresenta uma alteração. Isso pode explicar a amplificação preferencial do alelo mutado, pois a alteração está em *cis* em relação ao nucleotídeo selvagem, ou seja, no mesmo alelo (Figura 9). Assim, na presença da alteração, o iniciador senso não conseguia se anelar à essa região do alelo selvagem, e este por conseguinte, não era amplificado na PCR.



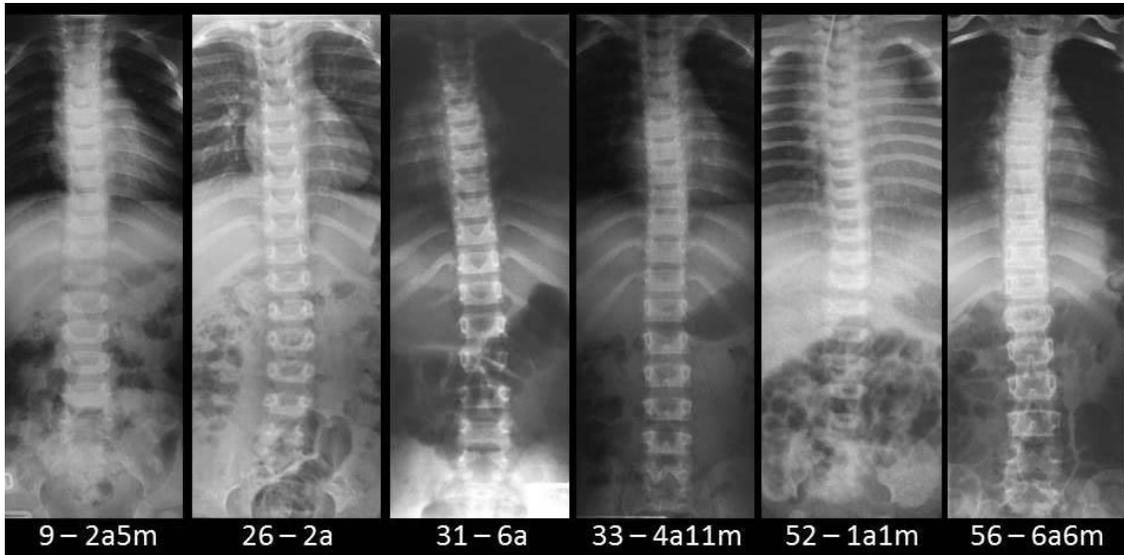
**Figura 9.** Análise das clonagens realizadas com o novo par de iniciadores. A sequencia padrão é representada pela linha verde. Observa-se uma troca de um C por um T, 17 bases distantes do início do exon 10. Acima, a sequencia do iniciador senso utilizado nas clonagens antigas. Quando o iniciador conseguia se anelar, ocorria a amplificação dos alelos portadores do nucleotídeo 1138 mutado.

Tal alteração intrônica não era detectada na análise do sequenciamento do paciente 34, pois o amplificado gerado com os iniciadores antigos não abrangia a região em que este está localizado e o mesmo não foi detectado em outros pacientes que foram estudados com os iniciadores antigos, pois o padrão de picos encontrados nos eletroferogramas foi típico de uma heterozigose, indicando que os demais pacientes não possuem tal alteração intrônica, não prejudicando assim o anelamento do iniciador senso à fita de DNA.

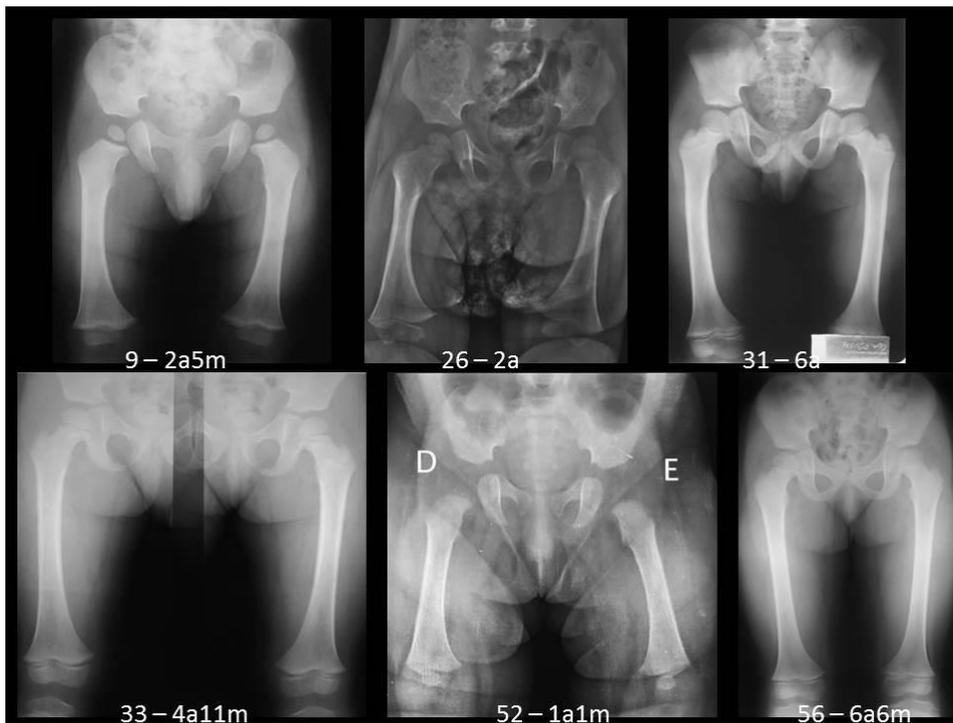
#### **4.2. Hipocondroplasia**

Entre os sete pacientes com diagnóstico de Hch, além de fenótipo clínico sugestivo a avaliação radiológica mostrou os principais achados: ossos longos encurtados e de aspecto alargado, diminuição da distância interpedicular nas últimas vertebrae lombares, alteração de cabeça/colo femoral, porção final de fíbula mais alongada, epífises em cone (pés) (Figuras 10-13). Um desses pacientes merece destaque pela precocidade da manifestação e será apresentado mais adiante.

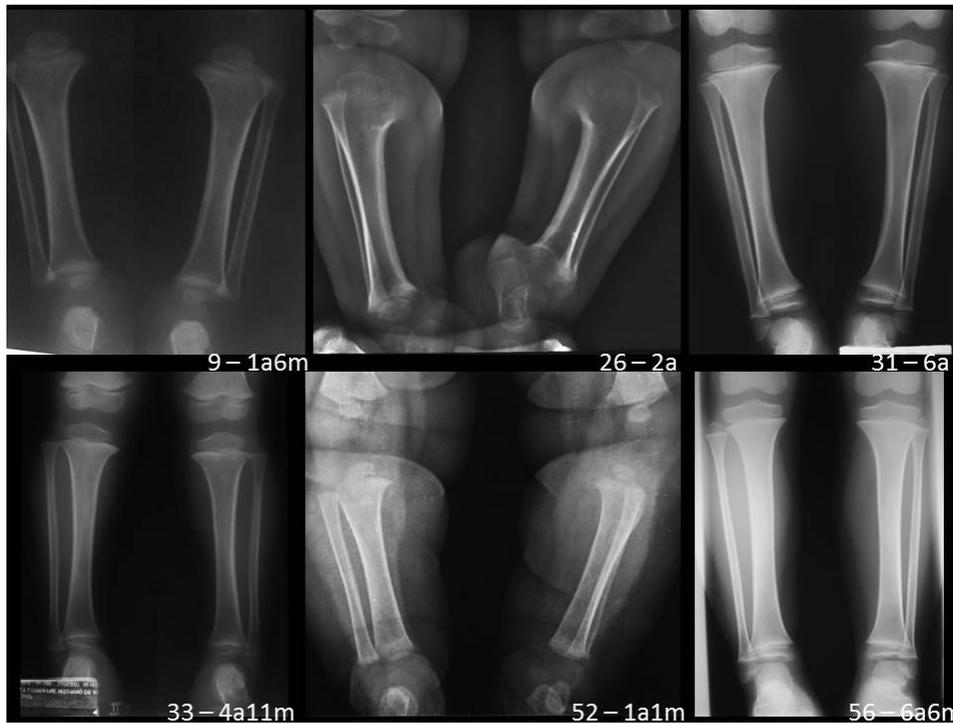
Entre os pacientes com diagnóstico duvidoso de Hch, os achados radiológicos eram poucos e muito discretos e clinicamente os pacientes apresentaram baixa estatura sem ou com leve desproporção.



**Figura 10.** Radiografias da coluna de pacientes com Hch. Nota-se que em alguns casos, como no paciente 52 ocorre um estreitamento do canal medular, característica típica de Ach, mas aqui manifestada com menos gravidade, enquanto que outros pacientes, como no 31 isso não é observado.



**Figura 11.** Achados radiológicos da região de bacia e fêmur em pacientes com Hch. Nota-se um osso longo mais encurtado e metáfises mais alargadas.



**Figura 12.** Em pacientes com Hch é comum encontrar a fíbula mais longa que a tíbia, como é o caso do paciente 31.



**Figura 13.** Na Hch uma característica radiológica que também pode estar presente são as epífises em cone em mãos e/ou em pés. Padrão que pode ser observado no realce do raio X do pé do paciente 31, onde se observa que a estrutura que deveria apresentar um formato achatado e regular tem o formato de cone.

### 4.3. Displasia Tanatofórica

Entre os pacientes com diagnóstico de DT (ambos os tipos), as características clínico-radiológicas foram típicas (Figura 14).



**Figura 14.** Raios X típicos encontrados na DT-I (paciente 20) e DT-II (paciente 61).

Nenhum caso atípico foi observado, exceto a paciente 11 que apesar de possuir quadro clínico-radiológico típico com a mutação mais comum para a DT-I (p.R248C), sobreviveu por um ano e seis meses a maior parte dos quais sem suporte respiratório. Acredita-se que uma anatomia favorável tenha proporcionado um desenvolvimento pulmonar razoável favorecendo sua sobrevivência. Como nos demais casos com maior sobrevivência descritos na literatura, o atraso neuromotor dessa criança era evidente e importante (Figura 15) (39).



**Figura 15.** Paciente 11 com DT-I com a mutação c.742C>T que sobreviveu por 1 ano e 6 meses principalmente por não possuir o tórax tão estreito como a maioria dos casos com DT-I.

O resultado ainda preliminar do paciente 60, um caso de DT-I com fenótipo clínico e radiológico típico, mostrou resultado inesperado. Detectou-se no exon 10 duas alterações em heterozigose, a mutação típica de Ach, c.1138G>A e a transição c.1130T>C que altera aminoácido e é prevista como patogênica de acordo com a análise *in silico* (40). Esse resultado, contudo, ainda necessita de confirmação (reprodução de resultado) visto tratar-se de análise a partir de DNA obtido de material parafinado.

#### **4.4. A alteração c.1150T>C**

Apesar de a maioria dos pacientes apresentarem fenótipos típicos, dois pacientes previamente mencionados, merecem destaque.

O paciente 23, apresentou ao nascimento 44cm, desproporção corporal, encurtamento rizomélico dos membros e padrão radiológico sugestivo de Hch (Figura 16). No entanto, dada a precocidade das manifestações clínico-radiológicas duas possibilidades diagnósticas foram suscitadas: Hch grave ou Ach leve.



**Figura 16.** Paciente 23 – fotos clínicas mostrando encurtamento rizomélico dos membros e raios-X mostrando achados típicos do grupo FGFR3 nos quadris e região proximal do fêmur. Uma platisspondilia leve e aumento da lordose lombar podem ser observados.

A investigação molecular, portanto se iniciou pelos exons 10 e 13 neste paciente. Foram detectadas duas mutações: no exon 13, a mutação mais frequente associada à Hch (c.1620C>A) e a alteração c.1150T>C no exon 10, região transmembrana do gene *FGFR3*. Essa alteração é considerada benigna pela análise *in silico*, porém visto que um possível efeito modulador havia sido levantado, procedeu-se a investigação dessa hipótese. Os resultados dessa investigação deram origem ao trabalho submetido para publicação (Item 4.4.1.). Figuras e resultados não incluídos no artigo podem ser observados no apêndice 2.

#### 4.4.1. Manuscrito submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*.

The frequency of the allelic variant c.1150T>C in exon 10 of the *FGFR3* gene is not increased in patients with pathogenic mutations and related chondrodysplasias phenotypes.

Thatiane Yoshie Kanazawa<sup>1</sup>, Luciana Cardoso Bonadia<sup>1</sup>, Denise Pontes Cavalcanti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Group of Skeletal Dysplasias, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 13083-887, Brazil. E-mail: denisepcavalcanti@gmail.com

#### Abstract

Mutations in the *FGFR3* gene cause the phenotypic spectrum of FGFR3 chondrodysplasia group, ranging from lethal forms to milder phenotype seen in hypochondroplasia (Hch). The p.N540K mutation in the *FGFR3* gene is found in approximately 70% of the individuals with Hch, and nearly 30% of the individuals presenting the Hch phenotype have no mutations in the *FGFR3*, suggesting genetic heterogeneity. The identification of a severe case of Hch associated with the typical mutation (c.1620C>A) and also the c.1150T>C change that leads to a p.F384L in exon10; plus the suspicion that this second change could be a modulator of the phenotype, prompted us to investigate this hypothesis in a cohort of patients. Studying 48 patients with FGFR3 chondrodysplasia phenotypes and 330 control individuals the frequency of the C allele in the c.1150 position was not different (p=0.34). The other patient carrying the combination: pathogenic mutation plus the allelic variant c.1150T>C, had a typical Ach phenotype. In addition, from three other patients with atypical phenotypes none presented the association with the allelic variant. In conclusion, the present results do not support the hypothesis of a modulator effect of the c.1150T>C change in the *FGFR3* gene.

**Keywords:** FGFR3, F384L, hypochondroplasia, skeletal dysplasia

The FGFR3 protein is encoded by a gene with same name widely studied due to its role in the linear bone growth regulation. Mutations in this gene cause the phenotypic spectrum of FGFR3 chondrodysplasia group that classically include hypochondroplasia (Hch), achondroplasia (Ach), thanatophoric dysplasia types I and II (TDI and TDII) and

SADDAN (Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans) (Warman *et al.*, 2011).

Both the mutations, c.1620C>A and c.1620C>G, in the exon 13 of the *FGFR3* gene lead to the p.N540K substitution, mutation found in approximately 50-70% of the individuals with Hch (Bellus *et al.*, 2000). Other mutations in the *FGFR3* gene associated with Hch account for approximately 2% of the cases (Castro-Feijóo *et al.*, 2008). For nearly 30% of the individuals presenting the Hch phenotype no mutations in the *FGFR3* gene have been found, suggesting that this condition is clinically and genetically heterogeneous (Bonaventure *et al.*, 1996). The diagnosis of Hch is usually suspected or established at the school age when short stature plus clinical and radiological changes used to be evident (Spranger *et al.*, 2012). Sometimes, however, the diagnosis can be made in the neonatal period because of a more severe phenotype (Karadimas *et al.*, 2006).

The identification of a severe case of Hch diagnosed in the neonatal period associated with both - the typical mutation (c.1620C>A) in exon 13 and also the c.1150T>C change (p.F384L) in exon 10; plus the suspicion that this change in exon 10 could be a modulator of the phenotype (Trujillo-Tiebas *et al.*, 2009), prompted us to investigate this hypothesis in a cohort of patients with the *FGFR3* chondrodysplasia phenotypes.

We have studied 48 patients within the *FGFR3* chondrodysplasia phenotype. Blood samples were collected after signing the approved consent form, and genomic DNA was extracted by the standard phenol-chloroform method. The molecular diagnosis was performed by direct sequencing after PCR amplification of the exons related to the respective phenotypes. The amplified products were purified and sequenced using the ABI3500XL<sup>®</sup> using the BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) kit. The data were processed using the ABI software and analyzed using CodonCode Aligner 4.1.1 program. Sequencing of the exon 10 was performed for all the cases. In addition exons 13, 7 and 15, related respectively with Hch, TDI and TDII phenotypes were also sequenced in patients presenting the respective phenotypes. Naturally, patients with Ach had no other exon sequenced since the hot spot for this phenotype is also placed in exon 10. Table 1 shows the eight pathogenic mutations identified in the 48 studied patients.

**Table 1** – Mutations related to their respective phenotypes in 48 patients with FGFR3 phenotype.

Clinical diagnosis	N° of Patients	Mutation	
		Nucleotide change	a.a change
Ach	27	c.1138G>A*	G380R
	1	c.1138G>C	
Hch	5	c.1620C>A*	N540K
	2	c.1620C>G	
TDI	7	c. 742C>T	R248C
	2	c. 746C>G	S249C
	2	c.1118A>G	Y373C
TDII	2	c.1948A>G	K650E

\*One patient also carries the c.1150T>C change.

In this cohort two patients presented the c.1150T>C change besides the pathogenic mutation. One patient had Hch due to the c.1620C>A mutation. He was diagnosed in the first months of life because of the severity of his phenotype (male infant presenting birth length of 44 cm plus corporal disproportion with rhizomelic shortening of limbs at birth). As he was initially thought to have a doubtful diagnosis –a mild Ach or a severe Hch, both exons (10 and 13), were initially analyzed. The second patient presented a typical phenotype of Ach (c.1138G>A). In both cases the c.1150T>C change was inherited, but without apparent phenotype consequence in the respective parents. In the patient with Hch a paternal inheritance was confirmed and for the patient with Ach a maternal inheritance was found. To determine if this change was in *cis* or *trans* in relation to the pathogenic mutation, a molecular cloning was performed. In the Ach patient the c.1150T>C change is in *trans* with the c.1138G>A mutation. The haplotype study in the patient with Hch was not possible due to the distance (1447 base pairs) between the two changes in the *FGFR3* gene.

Regarding the phenotype we found four atypical patients: one patient with Ach(c.1138G>A) associated with corporal asymmetry, mental retardation and achanthosis nigricans; two patients with severe Hch (one with c.1620C>A and the second with c.1620C>G, and clinical and radiological manifestations in the neonatal period) and one patient with TD1 (c.742C>T) and a long-term survival. Except for the patient with Hch

already described, no other patient among these three atypical presented the allelic variant c.1150T>C.

For comparison purposes we also sequenced the exon 10 of the *FGFR3* in 330 control subjects. This control sample was represented by DNA cord blood of healthy newborns. The c.1150T>C change was found in four individuals. As Hch is usually not apparent in the newborn period, for all these four controls with the c.1150T>C change the Hch hot spots (exons 3, 5, 7, 9, 12, 13 and 15) were also studied and none mutation was found. Table 2 shows both frequencies – the C allele in both, the control group and in the patients group. The table also shows the p-value related to the comparison between the both groups by the Fischer test.

**Table 2** - Frequency of the c.1150T>C change in both - control individuals and patients with pathogenic mutations in the *FGFR3*.

	c.1150T>C change (p.F384L)		Frequency of the mutated allele (%)	p-value
	positive	negative		
Controls	4	326	0.6	0.34
Patients	2	46	2.2	

In 2004, Trujillo-Tiebas and collaborators reported the presence of c.1150T>C change in two families. In the first family, the change was found in a patient with a severe, but not specified, skeletal dysplasia. His father and his grandmother, although not affected, were reported as displaying subtle symptoms. No other information about the specific mutation of the patient was given. In the second family, the change was found in a patient with Hch, with the most common mutation (c.1620C>A) and in his mother, reported as not affected by the skeletal dysplasia, but presenting some skeletal signs. Studying 194 chromosomes from individuals of the general population, this change was found in one chromosome (0.5%). These authors suggested an additive pathologic effect of this change in the *FGFR3* receptor and also reported another case found in a series of prenatal cases. The father carried out the same change (c.1150T>C in *FGFR3*) of his abortus, but without any suggested clinical sign (Trujillo-Tiebas *et al.*,2009).

In this study, the presence of the change c.1150T>C in two patients in a relatively small sample appears to be a stochastic event. In addition, we demonstrated that the frequency of the C allele does not seem to be different in the two samples –cohort of patients and control subjects ( $p = 0.34$ ). The frequency of the C allele in the control group here reported (0.6%) is the same to the frequency found in a British population (0.6% - one C allele in 178 chromosomes) according to the 1000 Genomes Project (Abecasis *et al.*, 2012). Interestingly, the frequency of the C allele was found to be 3% (three C allele in 100 chromosomes) among Turkish descents but it seems uncommon among German descents (none C allele in 100 chromosomes) (Golla *et al.*, 1997).

Although the c.1150T>C mutation leads to a phenylalanine for a leucine substitution in the 384 amino acid, this change does not seem to affect the receptor function. Both molecules, the wild and the mutant type are nonpolar and does not change the molecular characteristic of the transmembrane domain, neither the hydrophobicity of this structure (Adzhubei *et al.*, 2010). Moreover, leucine aminoacid, is present in the bovine *FGFR3* homologue, which points to a normal *FGFR3* protein function (Golla *et al.*, 1997).

In conclusion, the data here presented do not support the hypothesis of a modulator effect of the c.1150T>C change in the *FGFR3* gene. The more severe phenotype of the patient with Hch here reported seems rather related to the known phenotypic heterogeneity of this condition, than a hypothetic modulator effect of the c.1150T>C change. We suggest that this phenotypic heterogeneity should occur by chance or due to another, unknown, modulator effect.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

We would like to thank patients and families for participation. This paper was supported by grants of CNPq – 402008/2010-3 / 590148/2011-7 / 132270/2012-9.

### **References**

Vide Apêndice 3.

## 5. DISCUSSÃO

O grupo ou família FGFR3 engloba as displasias esqueléticas associadas às mutações no gene homônimo e inclui um espectro de condições que varia do fenótipo mais leve (Hch) à fenótipos inevitavelmente letais (DT). Também se encontra nesse grupo a Ach, primeira condição na qual se identificou mutação no gene *FGFR3*, e que é produzida, na maioria dos casos, por uma única mutação situada em um dos nucleotídeos mais altamente mutáveis do genoma humano (41).

No presente trabalho, foram investigados 63 pacientes com quadro clínico-radiológico típico ou sugestivo de displasia do grupo FGFR3. Foi encontrada mutação no gene *FGFR3* em 53 pacientes, todas elas já descritas e condizentes com o diagnóstico inicial, exceto para quatro casos atípicos, onde a sobreposição fenotípica gerou dúvida no diagnóstico ou a gravidade não foi condizente com o fenótipo.

Dez pacientes foram incluídos na casuística por apresentarem baixa estatura associada a poucos sinais radiológicos (42). Esse subgrupo foi chamado de Hch duvidosos (Hch?). Para estes pacientes, a análise molecular seguiu a estratégia proposta por alguns autores (43) que culminou na análise completa do gene *FGFR3*.

### **5.1. Acondroplasia**

Os casos de Ach representaram 47,6% da casuística total, uma alta frequência já esperada tendo em vista a Ach ser a forma de nanismo mais comum (44).

Devido à forte correlação genótipo-fenótipo, todos os casos dessa casuística tiveram a confirmação molecular do diagnóstico clínico-radiológico inicial de Ach. Resultado que se assemelha à literatura onde 99% dos pacientes acondroplásicos possuem a mutação c.1138G>A ou G>C, que resultam na troca p.G380R (41). Ainda ressaltando a correlação genótipo-fenótipo nessa condição, todos os pacientes apresentaram os sinais clínicos mais comuns, como ponte

nasal baixa, macrocefalia relativa com fronte proeminente, importante encurtamento rizomélico de membros, mãos em “tridente” e braquidactilia.

Dentre estes, foi identificado um paciente com um fenótipo atípico (SADDAN / Ach atípica) para o qual a hipótese inicial de mosaicismo envolvendo mutações no *FGFR3* foi afastada. O sequenciamento completo do *FGFR3* mostrou apenas a mutação típica de Ach (p.G380R) e, portanto, afastou também a possibilidade da presença de duas mutações em heterozigose.

Até onde conhecemos, não há na literatura relatos de mosaicismo envolvendo a mutação mais comum para a acondroplasia c.1138G>A em homozigose. Em 1969, Rimoin e McKusick (45) relataram um paciente com características clínicas e radiológicas de uma Ach comum, porém dois dedos da mão esquerda apresentavam tamanho e padrões radiológicos normais. Os autores descrevem o paciente como exemplo de mosaicismo somático, mas infelizmente o estudo dos mecanismos moleculares naquela época não era ainda disponível. Em 2000, Henderson e colaboradores (29) estudaram um casal de estatura normal com dois filhos acondroplásicos com a mutação c.1138G>C, o pai não possuía a mutação, mas a mãe sim e com uma proporção de alelos mutados de aproximadamente 28% no sangue periférico, evidenciando um mosaicismo somático e germinativo.

Mosaicismos somáticos e germinativos são eventos razoavelmente comuns em doenças genéticas. Por exemplo, na distrofia muscular de Duchene e na osteogênese imperfeita, aproximadamente 15% e 6% dos casos, respectivamente, herdaram a condição de um genitor portador de mosaicismo (29). Porém, relatos clínicos de mosaicismo somático em acondroplasia são extremamente raros e por alguma razão ainda não conhecida, ocorrem mais raramente do que em outras condições dominantes (29).

A mutação p.R248C de DT-I foi descrita em pacientes com mosaicismo somático que apresentavam fenótipos semelhantes à Ach (30,46).

Apesar de comprovada a presença da mutação em heterozigose, o paciente 34 ainda possui acantose nigricans, assimetria corporal e deficiência

mental, nenhuma dessas alterações faz parte do quadro da Ach. A assimetria corporal corrobora com um quadro de mosaicismo ou a ocorrência da Ach com um quadro de hemihiperplasia. Esse paciente necessita de avaliações adicionais, pois seu quadro ainda permanece inconclusivo (31,45).

## 5.2. Hipocondroplasia

O diagnóstico de hipocondroplasia pode ser difícil e alguns pacientes podem ser avaliados com baixa estatura idiopática. Um grande número de casos é subdiagnosticado e por essa razão não recebem a devida atenção em relação à análise molecular, aconselhamento genético, severidade da displasia e prognóstico (47).

De uma coorte de sete pacientes com diagnóstico clínico-radiológico compatível com Hch, cinco apresentaram a mutação mais comum c.1620C>A (p.N540K) e dois apresentaram a mutação c.1620C>G, uma transversão que leva à mesma troca de aminoácidos que a anterior. Todos os pacientes diagnosticados com Hch tiveram a mutação encontrada no *FGFR3*, reforçando a importância de se associar previamente um bom diagnóstico clínico-radiológico ao estudo molecular (43).

Dez pacientes foram incluídos na casuística como casos de Hch duvidosos, por apresentarem como principal achado a baixa estatura com poucos sinais radiológicos, mas que são associados à Hch. A inclusão de pacientes com diagnóstico duvidoso se dá principalmente à grande heterogeneidade clínica observada na Hch (23,43,48,49). Cinco desses pacientes não apresentaram mutação nos *hot spots* para Hch e o sequenciamento do gene *FGFR3* completo foi realizado. Nenhuma alteração patogênica foi encontrada no restante do gene.

Os outros cinco pacientes com diagnóstico duvidoso de Hch foram submetidos ao sequenciamento completo do gene *FGFR3*, mas para estes casos, um ou dois exons não foram analisados, são eles os exons 2 e 5. No exon 2 não há relatos de alterações patogênicas em displasias esqueléticas ou qualquer outra doença genética. No exon 5, se encontra uma mutação descrita até hoje, ao nosso

conhecimento, em apenas dois pacientes com Hch, a c.598C>T (p.R200C) (23,43). Sendo o nucleotídeo c.1620 o *hot spot* para Hch e outras mutações no gene *FGFR3* em Hch contabilizarem menos de 2% espera-se que estes pacientes sejam negativos para qualquer alteração patogênica no *FGFR3*.

### 5.3. Displasia Tanatofórica

As frequências de mutações encontradas nos casos de DT-I neste estudo se assemelham àquelas encontradas na literatura, onde a mutação p.R248C ocorre mais frequentemente (58,3%), seguida da alteração no exon sete, a p.S249C (25%) e por fim a p.Y373C (16,7%) (50,51). Nenhuma das mutações que alteram o códon de parada (p.X807G, p.X807R e p.X807C), originalmente descritas por Rousseau e colaboradores (1995), que possuem frequências de ocorrência relativamente altas (~10%) foram encontrada nessa casuística.

Os padrões radiológicos apresentados pelos pacientes da casuística se assemelham àqueles descritos na literatura, como costelas curtas com tórax estreito (1,52). A principal diferença entre a DT-I e a DT-II é que enquanto na primeira, o encurvamento de ossos longos, principalmente o fêmur, é bastante pronunciado na DT-II tais ossos são mais retificados. A platispondilia se apresenta de maneira mais grave na DT-I e é comum encontrar crânio em forma trevo em pacientes com DT-II (41). Exceto em um caso de longa sobrevida, todos os demais tiveram, como esperado, óbito perinatal.

Relatos de casos de DT-I que sobrevivem além do período neonatal são relativamente raros. Stensvold e colaboradores (1986) relataram um paciente que sobreviveu por 169 dias (53), Tonoki (1987) descreveu uma criança que sobreviveu por 212 dias (54) e MacDonald e colaboradores (1989) relataram dois sobreviventes com 4,75 e 4 anos (55). Que se tem conhecimento, o paciente com a mutação mais comum para a DT-I (R248C) que apresentou maior sobrevida foi relatado em 1997 por Baker e colaboradores, onde até o momento da publicação, apresentava 9 anos (39).

Por se tratar de uma condição que apresenta homogeneidade clínica e genética, como esperado, os três pacientes com diagnóstico de DT-II foi encontrada a única mutação relatada para esta condição, no segundo domínio da tirosina quinase, a transição c.1948A>G (50,56).

## 6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente projeto permitiu as seguintes conclusões:

1. O estudo do gene *FGFR3* utilizando a técnica de sequenciamento direto possibilitou:

- a confirmação do diagnóstico clínico e radiológico de 30 pacientes com Ach;
- a confirmação molecular do diagnóstico de 7 pacientes com Hch, inclusive de um caso atípico;
- a exclusão de cinco pacientes do grupo FGFR3, cujo sequenciamento do gene foi negativo;
- a confirmação de 3 pacientes com DT-II
- a confirmação de 12 pacientes com DT-I.

2. Um possível efeito modulador da alteração c.1150T>C foi afastado de acordo com os resultados, pois:

- com o estudo de 330 controles de uma população local, pode-se averiguar que apesar dessa alteração estar presente em dois pacientes de uma casuística relativamente pequena, não há diferença entre os dois grupos estudados, pacientes e controles ( $p=0,50$ ).
- análises *in silico* e o levantamento bibliográfico corroboram para uma função normal da proteína na presença do aminoácido mutado.
- o paciente 38, que também apresenta tal alteração possui um fenótipo típico de Ach.

3. Embora o paciente 34 tenha achados clínicos e radiológicos de mosaïcismo somático, as técnicas empregadas neste estudo não demonstraram a presença dessa condição.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Spranger JW, Brill PW, Poznanski A. Bone Dysplasias – An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development. 2ª edição. New York: Oxford University Press; 2002.
2. Swallow DM, Edwards YH. Protein Dysfunction in Human Genetic Disease. United Kingdom: BIOS Scientific Publishers Limited; 1997.
3. Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti DP. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am J of Med Genet A*. 2012;158A(5):1038–45.
4. Jones KL. Smith's - Padrões Reconhecíveis de Malformações Congênitas. 5ª edição. São Paulo: Editora Manole Ltda; 1998.
5. Stevenson DA, Carey JC, Byrne JLB, Srisukhumbowornchai S, Feldkamp ML. Analysis of skeletal dysplasias in the Utah population. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(5):1046–54.
6. Karadimas C, Sifakis S, Valsamopoulos P, Makatsoris C, Velissariou V, Nasioulas G, *et al*. Prenatal Diagnosis of Hypochondroplasia : Report of Two Cases. *Am J Med Genet*. 2006;1003:998 – 1003.
7. Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ. The Molecular and Genetic Basis of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Disorders : The Achondroplasia Family of Skeletal Dysplasias, Muenke Craniosynostosis. *Hum Genet*. 2000;23–39.
8. Martínez-Frías ML, de Frutos CA, Bermejo E, ECEMC Working Group, Nieto MA. Review of the Recently Defined Molecular Mechanisms Underlying Thanatophoric Dysplasia and Their Potential Therapeutic Implications for Achondroplasia. *Am J Med Genet A*. 2009;152A:245-255
9. Le Merrer M, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Landais J-C, Pelet A, Bonaventure J, *et al*. A gene for achondroplasia--hypochondroplasia maps to chromosome 4p. *Nat Genet*. 1994;6:314–7.
10. Velinov M, Slaugenhaupt SA, Stoilov I, Scott, C. I. J, Gusella JF, Tsipouras P. The gene for achondroplasia maps to the telomeric region of chromosome 4p. *Nat Genet*. 1994;6:318–21.

11. Francomano CA, Ortiz de Luna RI, Hefferon TW, Bellus GA, Turner CE, Taylor E, *et al.* Localization of the achondroplasia gene to the distal 2.5 Mb of human chromosome 4p. *Hum Mol Genet.* 1994;3:787–92.
12. Shiang R, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, Winokur ST, Wasmuth JJ. Mutations in the Transmembrane Domain of FGFR3 Cause the Most Common Genetic Form of Dwarfism , Achondroplasia. *Cell.* 1994;79:335–42.
13. Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet J-M, Maroteaux P, *et al.* Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature.* 1994;371:252–4.
14. Belov A, Mohammadi M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(6).
15. UniProt Consortium. 2013. Disponível em: <http://www.uniprot.org/>
16. UniGene. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>
17. Ensembl Genome Browser. 2013. Disponível em: [www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/)
18. Legeai-mallet L, Finidori G, Merrer M Le. Achondroplasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(1):3–18.
19. Passarge E. *Genética - texto e atlas.* São Paulo: Artmed; 2004.
20. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson - Genética Médica.* 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Inc.; 2008.
21. Laederich MB, Horton W a. FGFR3 targeting strategies for achondroplasia. *Expert Rev Mol Med.* 2012;14-11.
22. The Human Gene Mutation Database. 2013. Disponível em: <http://www.hgmd.org/>
23. Heuertz S, Merrer M Le, Zabel B, Wright M, Gibbs L, Bonaventure J, *et al.* Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *Eur J Hum Genet.* 2006;1240–7.

24. Pannier S, Mugniery E, Jonquoy A, Benoist-Iasselín C, Odent T, Jais J, *et al.* Delayed bone age due to a dual effect of FGFR3 mutation in Achondroplasia. *Bone*. 2010;47(5):905–15.
25. Epstein C, Erickson R, Wynshaw-Boris A. Inborn errors of development: the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis. Oxford University Press; 2004.
26. Turnpenny PD, Ellard S. Emery, genética médica. 13ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Inc.; 2009.
27. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet*. 2002;3(10):748–58.
28. Zlotogora J. Germ line mosaicism. *Hum Genet*. 1998;102(4):381–6.
29. Henderson S, Sillence D, Loughlin J, Bennetts B, Sykes B. Germline and somatic mosaicism in achondroplasia. *J Med Genet*. 2000;37(12):956–8.
30. Takagi M, Kaneko-Schmitt S, Suzumori N, Nishimura G, Hasegawa T. Atypical achondroplasia due to somatic mosaicism for the common thanatophoric dysplasia mutation R248C. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(1):247–50.
31. Hyland VJ, Robertson SP, Flanagan S, Savarirayan R, Roscioli T, Masel J, *et al.* Somatic and Germline Mosaicism for a R248C Missense Mutation in FGFR3 , Resulting in a Skeletal Dysplasia Distinct From Thanatophoric Dysplasia. *Am J Med Genet*. 2003;168:157– 168.
32. Trujillo-Tiebas M, Riveiro R, Queipo A, Vallespin E, Cantalapiedra D, Lorda-Sánchez I, *et al.* Human Gene Mutations. *Hum Genet*. 2004;115:347–56.
33. Trujillo-Tiebas MJ, Fenollar-Cortés M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Carrillo Redondo a, Ramos-Corrales C, *et al.* Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia due to FGFR3 gene mutations: a 9-year experience: prenatal diagnosis in FGFR3 gene. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(8):455–60.
34. Cavalcanti DP. Displasias Esqueléticas: Uma proposta para auxiliar o diagnóstico. 2014. Disponível em: <http://ocd.med.br/>

35. Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
36. Don R, Cox P, Wainwright B, Baker K, Mattick J. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(14):4008.
37. Codon Code Aligner 4.1.1. 2013. Disponível em: <http://www.codoncode.com/aligner/>
38. Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat*. 2011;32(4):358–68.
39. Baker KM, Olson DS, Harding CO, Pauli RM. Long-term survival in typical thanatophoric dysplasia type 1. *Am J Med Genet*. 1997 27;70(4):427–36.
40. PolyPhen-2. 2013. Disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
41. Vajo Z, Francomano C a, Wilkin DJ. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev*. 2000;21(1):23–39.
42. Saito T, Nagasaki K, Nishimura G, Takagi M, Hasegawa T, Uchiyama M. Radiological clues to the early diagnosis of hypochondroplasia in the neonatal period: report of two patients. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(3):630–4.
43. Almeida MR, Campos-Xavier a B, Medeira a, Cordeiro I, Sousa a B, Lima M, *et al*. Clinical and molecular diagnosis of the skeletal dysplasias associated with mutations in the gene encoding Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) in Portugal. *Clin Genet*. 2009;75(2):150–6.
44. Richette P, Bardin T, Stheneur C. Achondroplasia: From genotype to phenotype. *Joint Bone Spine*. 2008;75:125–30.
45. Rimoin DL, Mckusick VA. Somatic Mosaicism in an Achondroplastic Dwarf. *Birth Defects*. 1969;V(4):17–9.

46. Hyland VJ, Robertson SP, Flanagan S, Savarirayan R, Roscioli T, Masel J, *et al.* Somatic and germline mosaicism for a R248C missense mutation in FGFR3, resulting in a skeletal dysplasia distinct from thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2003;120A(2):157–68.
47. Korkmaz HA, Hazan F, Dizdarer C, Tükün A. Hypochondroplasia in a child with 1620C>G (Asn540Lys) Mutation in FGFR3. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2012;4(4):220–2.
48. Santos G, Almeida M, Fernandes H, Wilkie A. Clinical Hypochondroplasia in a Family Caused by a Heterozygous Double Mutation in FGFR3 Encoding GLY380LYS. *Am J Med Genet A.* 2007;359:355–9.
49. Song S-H, Balce GCE, Agashe MV, Lee H, Hong S-J, Park Y-E, *et al.* New proposed clinico-radiologic and molecular criteria in hypochondroplasia: FGFR 3 gene mutations are not the only cause of hypochondroplasia. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(10):2456–62.
50. Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu Y-Z, Wilkin DJ, Lachman RS, *et al.* Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.* 1995;9:321-328.
51. Rousseau F, el Ghouzzi V, Delezoide a L, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich a, *et al.* Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). *Hum Mol Genet.* 1996;5(4):509–12.
52. Wilcox WR, Tavormina PL, Krakow D, Kitoh H, Lachman RS, Wasmuth JJ, *et al.* Correlations in Thanatophoric Dysplasia. *Am J Med Genet.* 1998;281:274–81.
53. Stensvold K, Ek J, Hovland a R. An infant with thanatophoric dwarfism surviving 169 days. *Clin Genet.* 1986;29(2):157–9.
54. Tonoki H. A boy with thanatophoric dysplasia surviving 212 days. *Clin Genet.* 1987;32(6):415–6.
55. MacDonald IM, Hunter a G, MacLeod PM, MacMurray SB. Growth and development in thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet.* 1989;33(4):508–12.

56. Bonaventure J, Gibbs L, Horne WC, Baron R. The localization of FGFR3 mutations causing thanatophoric dysplasia type I differentially affects phosphorylation, processing and ubiquitylation of the receptor. *FEBS J.* 2007;274:3078–93.
57. Baujat G, Legeai-Mallet L, Finidori G, Cormier-Daire V, Le Merrer M. Achondroplasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(1):3–18.
58. Winterpacht A, Hilbert K, Stelzer C, Schweikardt T, Decker H, Segerer H, *et al.* A novel mutation in FGFR-3 disrupts a putative N-glycosylation site and results in hypochondroplasia. *Physiol Genomics.* 2000;24(2):9–12.
59. Grigelionienė G, Hagenäs L, Eklöf O, Neumeyer L, Haereid PE, Anvret M. A novel missense mutation Ile538Val in the fibroblast growth factor receptor 3 in hypochondroplasia. *Hum Mutat.* 1998;122:2–8.
60. Mortier G, Nuytinck L, Craen M, Renard JP, Leroy JG, de Paepe a. Clinical and radiographic features of a family with hypochondroplasia owing to a novel Asn540Ser mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *J Med Genet.* 2000;37(3):220–4.
61. Deutz-Terlouw P, Losekoot M, Aalfs CM, Hennekarn RCM, Bakker E. Asn540Thr substitution in the fibroblast growth factor receptor 3 tyrosine kinase domain causing hypochondroplasia. *Hum Mutat.* 1998;65:62–5.
62. Bellus G a, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, Hecht JT, Horton W a, Machado M, *et al.* Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet.* 1995;56(2):368–73.
63. Prinos P, Costa T, Sommer A, Kilpatrick M, Tsipouras P. A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum Mol Genet.* 1995;4(11):2097–101.
64. Bellus G a, Spector EB, Speiser PW, Weaver C a, Garber a T, Bryke CR, *et al.* Distinct missense mutations of the FGFR3 lys650 codon modulate receptor kinase activation and the severity of the skeletal dysplasia phenotype. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1411–21.
65. Zhang S, Zhou X, Ren X, Wang T, Yuan M, Wang Q, *et al.* Ser217Cys mutation in the Ig II domain of FGFR3 in a Chinese family with autosomal dominant achondroplasia. *Chin Med J.* 2007;120(11):1017–9.

66. Chen C, Chern S, Shih J, Wang W, Yeh L, Chang T, *et al.* Prenatal diagnosis and genetic analysis of type I and type II thanatophoric dysplasia. *Prenat Diagn.* 2001;21(2):89–95.
67. Ikegawa S, Fukushima Y, Isomura M, Takada F, Nakamura Y. Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in one familial and six sporadic cases of achondroplasia in Japanese patients. *Hum Genet.* 1995;96(3):309–11.
68. Bonaventure J, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Maroteaux P. Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dwarfism. *Am J Med Genet.* 1996 3;63(1):148–54.
69. Rousseau F, Saugier P, Le Merrer M, Munnich A, Delezoide A, Maroteaux P, *et al.* Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nat Genet.* 1995;10(1):11–2.
70. Tavormina PL, Bellus GA, Webster MK, Bamshad MJ, Fraley AE, McIntosh I, *et al.* A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am J Hum Genet.* 1999;64(3):722–31.
71. Panther. 2013. Disponible em: [www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp](http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp)
72. PhD-SNP. 2013. Disponible em: <http://snps.uib.es/phd-snp/phd-snp.html>
73. MutPred. 2013. Disponible em: <http://mutpred.mutdb.org/>
74. SNPs&GO. 2013. Disponible em: <http://snps.uib.es/snps-and-go/snps-and-go.html>

## 8. ANEXOS

## Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética



CEP, 20/12/11.  
(PARECER CEP: N° 992/2007)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa)

### PARECER

#### I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DAS DISPLASIAS ESQUELÉTICAS NO BRASIL - CRIAÇÃO DE UMA REDE NACIONAL PARA AVALIAÇÃO CLÍNICO-RADIOLÓGICA, ORIENTAÇÃO E ESTUDO DAS DISPLASIAS ESQUELÉTICAS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cecília Oliveira Barbosa Buck

#### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a adendo que inclui o projeto “ESTUDO DO *FGFR3* EM UMA COORTE DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS DE HIPOCONDROPLASIA A FIM DE SELECIONAR OS CASOS SEM MUTAÇÃO NESSE GENE E TENTAR ESTABELECEER AS BASES MOLECULARES NESSES CASOS”, com a finalidade de mestrado da aluna Thatiane Yoshie Kanazawa, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de dezembro de 2011.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

## Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Genética Médica

### Folha de Informação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto de investigação clínico-molecular sobre as displasias esqueléticas

**Pesquisador principal:**

Denise P Cavalcanti  
Departamento de Genética Médica  
FCM – UNICAMP

Tel/Fax: (19) 3521-0385

E-mail: [denisepc@unicamp.br](mailto:denisepc@unicamp.br) / [denisepcavalcanti@gmail.com](mailto:denisepcavalcanti@gmail.com)

#### **INTRODUÇÃO / OBJETIVO DA PESQUISA:**

A pesquisa médica, em geral, ajuda no entendimento sobre as causas das doenças bem como na tentativa de encontrar terapias para melhorar a vida das pessoas afetadas. Nós estamos lhe convidando para participar desse estudo porque você ou algum membro de sua família tem problemas com seus ossos e/ou suas articulações. Acreditamos que a doença óssea na sua família pode ser causada por alteração de algum gene (pequeno erro na sua informação genética) relacionado com a formação/desenvolvimento do esqueleto.

O objetivo desta investigação é o de identificar a origem da displasia esquelética em questão e aprofundar no estudo dos mecanismos envolvidos com a mesma. As radiografias, fotos e amostras de sangue do paciente, bem como as informações médicas a respeito da família, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com displasias esqueléticas.

#### **PROCEDIMENTO:**

Concordando em participar deste estudo, os pesquisadores terão necessidade de obter alguns dados da história clínica e familiar do paciente, assim como haverá necessidade de dados do exame clínico, fotos clínicas e radiografias para o estabelecimento ou confirmação do diagnóstico clínico. O sangue para extração de DNA poderá ser coletado em qualquer momento e, normalmente a coleta é feita a partir de punção de uma veia periférica. Em várias situações DNA dos pais, e eventualmente de outros familiares, também será necessário para conclusão dos estudos. Normalmente se coleta de 4 a 10 ml de sangue (quantidade equivalente a uma ou duas colheres de sopa).

#### **RISCOS:**

A participação na presente pesquisa não acarreta riscos adicionais aos que eventualmente um paciente está exposto quando consulta um médico (ex: ser submetido a exames de raio X, coleta de sangue para exames de sangue). Com a coleta de sangue o paciente pode sentir um breve desconforto e o procedimento pode deixar uma pequena marca no local da punção. Esse procedimento dura uns poucos segundos.

#### **VANTAGENS / RESULTADOS:**

Os resultados desta pesquisa devem fornecer um maior conhecimento sobre a doença em questão, embora não seja esperado nenhum benefício direto além do resultado do(s) exame(s) realizado(s). A participação nesta pesquisa não deverá acarretar mudanças no atendimento médico nem no aconselhamento genético imediato. Os resultados da pesquisa serão fornecidos a você e à sua família pelo seu médico assistente ou pelos pesquisadores responsáveis e estarão também referidos no prontuário médico hospitalar.

#### **SIGILO:**

Todas as informações médicas, assim como os resultados dos exames e dos testes genéticos realizados nessa pesquisa, farão parte do prontuário médico e dos bancos de dados do projeto de displasias esqueléticas e serão submetidos aos regulamentos do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP.

O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos que possam advir dessa pesquisa por meio da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Os resultados ou informações fornecidos devem ser utilizados para fins de publicação científica, no entanto, nenhum nome será utilizado.

#### **FORNecendo INFORMAÇÃO ADICIONAL:**

A qualquer momento é possível obter informações adicionais relativas à presente pesquisa. A Dra. Denise P Cavalcanti ou os seus colaboradores estarão disponíveis para responder às suas questões e/ou preocupações (Tel.: 019 3521-8908). Em caso de recurso, dúvida ou reclamações relacionadas aos aspectos éticos da pesquisa você poderá contactar a secretaria do Comitê de Ética da FCM-UNICAMP (Tel.: 019 3521-7232).

#### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

A sua participação, bem como dos seus familiares, na presente pesquisa é voluntária. Sendo assim, a qualquer momento você e/ou os seus familiares poderá(ão) se recusar a participar ou retirar o consentimento e interromper a participação na presente pesquisa sem comprometimento dos cuidados médicos que recebe(m) atualmente ou receberá(ão) no futuro.

De forma semelhante, os pesquisadores responsáveis podem interromper a participação de qualquer indivíduo da família nessa pesquisa a qualquer momento em que julgarem apropriado.

#### **COLETA, FUTURAS PESQUISAS E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO:**

O DNA, material genético obtido a partir de uma amostra de sangue [seu e/ou de outro(s) membro(s) de sua família] será(ão) usado(s) para esse estudo, se você concordar. Nenhum outro teste ou estudo poderá ser feito com as amostras de DNA, a menos que você concorde com isso. Você pode concordar com o uso da sua amostra de sangue apenas para esse estudo (opção 1 do termo de consentimento), ou também para outros estudos (opção 2 e 3). Você pode escolher ser consultado no futuro sobre sua permissão para uso de sua amostra em um outro estudo (opção 2) ou você pode dar sua permissão agora, sem ter que ser solicitado novamente (opção 3). Em qualquer caso, seu nome será conhecido apenas pelo investigador do estudo e ninguém mais. O que os médicos fazem em pesquisa médicas deve sempre ser aceito pelo Comitê de Ética, um grupo de pessoas (médicos, advogados e outros) que assegurará que o estudo tenha um bom propósito e seja realizado para atender o interesse das pessoas doentes.

Você tem o direito de se retirar desse estudo a qualquer momento. Se você escolher se retirar, nenhum outro estudo será conduzido com sua amostra.

Se você concordar em participar desse estudo, sua amostra será armazenada no Laboratório de Genética Molecular do Depto. de Genética Médica, FCM, UNICAMP sob a responsabilidade do investigador principal. Essas amostras serão usadas exclusivamente para os propósitos científicos descritos aqui. Você pode requerer a destruição da amostra em qualquer momento.

Uma cópia dessa folha de informação será fornecida a você.



Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Genética Médica

### **Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

**Projeto de investigação clínico-molecular sobre displasias esqueléticas**  
**Pesquisador Principal: Denise P Cavalcanti**

A assinatura do(s) item(ns) abaixo indica que você foi informado tanto oralmente como pela folha de Informação sobre a pesquisa mencionada acima. Dessa forma, você confirma que leu e entendeu o conteúdo da folha de Informação e que voluntariamente concorda em participar desse estudo. Você também entendeu que pode questionar qualquer coisa sobre a pesquisa ao seu médico e/ou ao pesquisador e que a informação que lhe foi fornecida permitiu-lhe tomar uma decisão livre e completamente informada sobre a sua participação nesse estudo. Você tem o direito de sair desse estudo em qualquer momento sem qualquer consequência para você. Uma cópia desse termo de consentimento será providenciada para você.

I. Escolhendo um dos itens abaixo você estará concordando, ou não, com a utilização do seu DNA e/ou o de seu(ua) filho(a) em outras pesquisas ou apenas na atual pesquisa. Em quaisquer das opções abaixo sua identidade será mantida confidencial (ASSINALE APENAS UM DOS ITENS ABAIXO):

- Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada apenas nesse projeto de pesquisa. Essas amostras não podem ser usadas em nenhum outro projeto. Você não quer ser conatctado para outras permissões no futuro.
- Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada apenas nesse projeto, e, para outros projetos com sua permissão. Se essas amostras puderem ser usadas em um outro projeto, você quer ser contactado para que solicitem sua permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para usar sua amostra em um outro estudo.
- Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada para qualquer outro propósito científico envolvendo este ou qualquer outro projeto. Você não quer ser contactado para permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para que a sua amostra seja utilizada em um outro estudo.

II. Assinalando os itens abaixo você estará concordando, ou não, com a utilização de fotos clínicas.

- Utilização de fotos clínicas apenas para estudo
- Utilização de fotos clínicas para eventuais apresentações em publicações científicas

Nome:

Data de nascimento:

Assinatura:

**Se o participante for menor de idade ou um adulto legalmente incapaz:  
Assinatura do(s) pai(s) ou responsável legal:**

**Relação com o participante:**

**Local e data:**

---

**Médico que encaminha**

A assinatura abaixo indica que o médico que encaminhou forneceu uma explicação apropriada sobre a pesquisa, chamou atenção sobre as limitações assinaladas na folha de informação e respondeu as questões dos participantes.

**Nome completo:**

**Assinatura:**

**Local e data:**

**Carimbo médico**

---

**Pesquisador principal:**

Denise P Cavalcanti  
Departamento de Genética Médica  
FCM – UNICAMP  
R. Tessália V. De Camargo, 126  
13083-887 Campinas, SP

**Assinatura:**

**Local e data:**

## 9. APÊNDICES

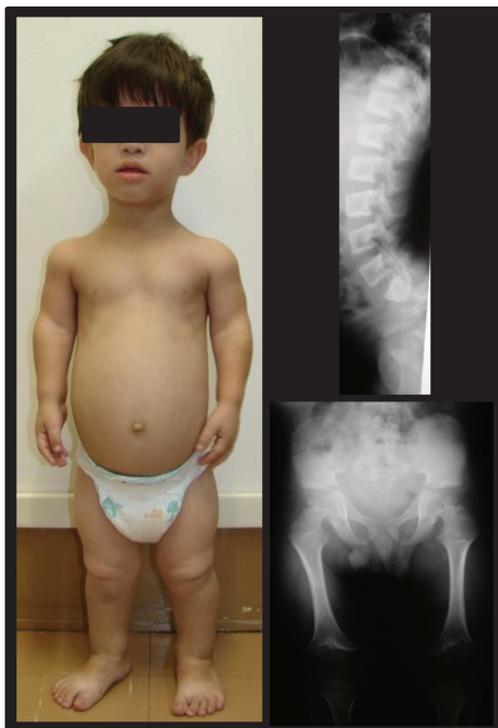
**Apêndice 1.** Levantamento das mutações no gene *FGFR3* associadas à displasia esqueléticas do grupo FGFR3 e as respectivas frequências, quando disponível.

Exon	Nucleotídeo (cDNA)	Códon	Aminoácido	OCD	Freq (%)	Referência
3	251 C > T	TCG	Ser 84 Leu	Hipocondroplasia		Heuertz, 2006 (23)
5	598 C > T	CGC	Arg 200 Cys			
7	784 A > C	AAC	Asn 262 His			
7	802 G > T	GGC	Gly 268 Cys			
7	833 A > G	TAC	Tyr 278 Cys			
7	883 G > T	GGC	Gly 295 Cys			Baujat, 2008 (57)
9	983 A > T	AAC	Asn 328 Ile			Winterpacht, 2000 (58)
9	1052 C > G	TCT	Ser 351 Cys			Baujat, 2008 (57)
10	1078 G > A	GAG	Glu 360 Lys			Heuertz, 2006 (23)
10	1142 T > A	GTG	Val 381 Glu			Baujat, 2008 (57)
12	1454 A > G	CAG	Gln 485 Arg			Grigelioniené, 1997 (59)
13	1612 A > G	ATC	Ile 538 Val			Mortier, 2000 (60)
13	1619 A > G	AAC	Asn 540 Ser			Deutz-Terlouw, 1998 (61)
13	1619 A > C		Asn 540 Thr			Bellus, 1995 (62)
<b>13</b>	<b>1620 C &gt; A</b>		<b>Asn 540 Lys</b>		<b>40-50</b>	Prinos, 1995 (63)
<b>13</b>	<b>1620 C &gt; G</b>					
15	1948 A > C		AAG		Lys 650 Gln	
15	1950 G > C	Lys 650 Asn				
15	1950 G > T					
6	649 A > T	AGC	Ser 217 Cys		Acondroplasia	
7	835 A > T	AGT	Ser 279 Cys			Heuertz, 2006 (23)
9	1037 G > A	GGG	Gly 346 Glu			Chen, 2001 (66)
10	1123 G > T	GGC	Gly 375 Cys			Ikegawa, 1995 (67)
<b>10</b>	<b>1138 G &gt; A</b>	<b>GGG</b>	<b>Gly 380 Arg</b>	<b>99</b>		Shiang, 1994 (12)
<b>7</b>	<b>742 C &gt; T</b>	<b>CGC</b>	<b>Arg 248 Cys</b>	TD I	<b>56</b>	Tavormina, 1995 (50)
7	746 C > G	TCC	Ser 249 Cys		6	
10	1108 G > T	GGC	Gly 370 Cys		2	Rousseau, 1996 (68)
10	1111 A > T	AGT	Ser 371 Cys		1	Tavormina, 1995 (50)
10	1118 A > G	TAT	Tyr 373 Cys		24	Rousseau, 1996 (68)
19	2419 T > G	TGA	X 807 Gly		10	Rousseau, 1995 (69)
19	2419 T > A		X 807 Arg			
19	2421 A > T		X 807 Cys			
15	1948 A > G	AAG	Lys 650 Glu	TD II	99	Tavormina, 1995 (50)
15	1949 A > T	AAG	Lys 650 Met	SADDAN		Tavormina, 1999 (70)

**Apêndice 2.** Figuras e tabelas geradas do estudo da alteração c.1150T>C não incluídas no manuscrito submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*.

Todos os pacientes da presente casuística foram submetidos ao sequenciamento do exon 10 para avaliar a frequência dessa alteração.

A alteração c.1150T>C também foi encontrada no paciente 38, portador de uma Ach típica com a mutação mais comum (c.1138G>A) (Figura 17).



**Figura 17.** Paciente 38 – achados clínicos e radiológicos típicos de Ach.

A tabela submetida à apreciação da revista *Genetics and Molecular Biology* contém valores da casuística da época da composição do artigo. A tabela 4 contém os valores com a casuística apresentada neste estudo.

**Tabela 4.** Resultado do estudo da alteração c.1150T>C em um grupo controle e no grupo de pacientes da casuística.

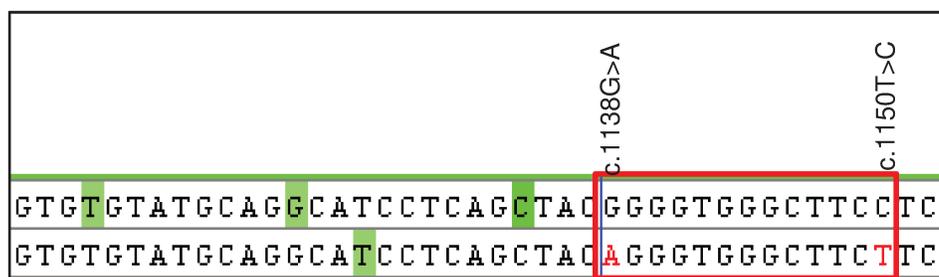
	c.1150T>C (p.F384L)		Frequência do alelo mutado (%)	Valor de p
	positivo	negativo		
Controles	4	326	0,6	0,50
Pacientes	2	61	1,6	

Estudos de predição apontam que a troca de uma timina por uma citosina na posição 1150 do gene *FGFR3* é considerada benigna (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultados das análises *in silico* da patogenicidade da alteração c.1150T>C (40,71–74).

	Panther	PolyPhen-2	PhD-SNP	MutPred	SNPs&GO
c.1150T>C (p.F384L)	0.18824	Benign (0,003)	Neutral	0,182	Neutral (0,288)

A alteração c.1150T>C foi herdada do pai no caso do paciente 23 e da mãe no paciente 38. Para determinar se essa alteração está em *cis* ou *trans* em relação à c.1138G>A e a c.1620C>A foi realizada a clonagem molecular. No paciente 38 as alterações se apresentam em *trans* (Figura 18). O estudo do haplótipo para o paciente 23 não foi possível devido à distância de 1447 pares de base entre as alterações.



**Figura 18.** Resultado da clonagem molecular do paciente 38, indicando que no alelo em que está o nucleotídeo selvagem (G) na posição 1138, na posição 1150 tem o nucleotídeo mutado (C).

### **Apêndice 3.** Referências utilizadas no manuscrito submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*

- Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, *et al.* (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491:56–65.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248–9.
- Bellus GA, Spector EB, Speiser PW, Weaver CA, Garber AT, Bryke CR, Israel J, Rosengren SS, Webster MK, Donoghue DJ *et al.* (2000) Distinct missense mutations of the *FGFR3* lys650 codon modulate receptor kinase activation and the severity of the skeletal dysplasia phenotype. *Am J Hum Genet* 67:1411–21.
- Bonaventure J, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Maroteaux P (1996) Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dwarfism. *Am J Med Genet* 63:148–54.
- Castro-Feijóo L, Loidi L, Vidal A, Parajes S, Rosón E, Álvarez A, Cabanas P, Barreiro J, Alonso A, Domínguez F *et al.* (2008) Hypochondroplasia and Acanthosis nigricans: a new syndrome due to the p.Lys650Thr mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene? *Eur J Endocrinol* 159:243–9.
- Golla A, Lichtner P, von Gernet S, Winterpacht A, Fairley J, Murken J, Schuffenhauer S (1997) Phenotypic expression of the fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) mutation P250R in a large craniosynostosis family. *J Med Genet* 34:683–684.
- Karadimas C, Sifakis S, Valsamopoulos P, Makatsoris C, Velissariou V, Nasioulas G, Petersen MB, Koumantakis E, Hatzaki A (2006) Prenatal Diagnosis of Hypochondroplasia: Report of Two Cases. *Am J Med Genet* 1003:998–1003.
- Spranger JW, Brill PW, Nishimura G, Superti-Furga A, Unger S (2012) Bone Dysplasias - An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development. Oxford New York, 11pp.
- Trujillo-Tiebas MJ, Riveiro R, Queipo A, Vallespin E, Cantalapiedra D, Lorda-Sanchez I, Ayuso C (2004) *Hum Genet* 115:347–356.

Trujillo-Tiebas MJ, Fenollar-Cortés M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Redondo AC, Ramos-Corrales C, Ayuso C (2009) Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia due to *FGFR3* gene mutations: a 9-year experience: prenatal diagnosis in *FGFR3* gene. *J Assist Reprod Genet* 26:455–60.

Warman M, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin D *et al.* (2011) Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A* 155A:943–68.