

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DA DISPLASIA CAMPOMÉLICA
E DE OUTRAS DISPLASIAS ESQUELÉTICAS COM MANIFESTAÇÃO PRÉ-
NATAL NO BRASIL**

Eduardo Preusser de Mattos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Lavinia Schuler-Faccini
Co-orientadora: Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino

Porto Alegre
Março de 2014

O presente trabalho foi desenvolvido nas seguintes Instituições:

- Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Agentes financiadores:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Fundo de Incentivo a Pesquisas e Eventos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

“Le savant n'étudie pas la nature parce que cela est utile; il l'étudie parce qu'il y prend plaisir et il y prend plaisir parce qu'elle est belle.”

Henri Poincaré
Science et méthode, 1908.

Ubi dubium, ibi libertas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lavinia Schuler-Faccini sou imensamente grato pela confiança em ter me aceitado como seu aluno de Mestrado e por todo o apoio durante a realização desse trabalho. Seu exemplo de pesquisadora será sempre para mim uma referência.

À minha co-orientadora, Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino, serei eternamente grato pela acolhida no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelos exemplos de profissionalismo, perseverança e de pessoa que gostaria de me tornar. Suas sugestões e conselhos foram decisivos para o sucesso desse trabalho.

Aos membros da banca avaliadora deste trabalho, Dras. Úrsula da Silveira Matte (PPGBM – UFRGS), Vanessa Rodrigues Paixão Côrtes (PPGBM – UFRGS) e Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA), meu agradecimento especial pela atenção dedicada à leitura e revisão técnica da dissertação.

À Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti, sou extremamente grato pelo auxílio diagnóstico nos casos de displasias esqueléticas aqui relatados e pelas contribuições e sugestões fundamentais nos diferentes manuscritos resultantes desse trabalho.

À Profa. Dra. Temis Maria Felix, agradeço pela disponibilização do espaço em seu laboratório para a realização das análises moleculares aqui apresentadas e pelas revisões críticas dos manuscritos que compõem este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antônio de Azevedo Magalhães e aos Drs. Júlio César Loguercio Leite e Luiz Alberto Todeschini, meu agradecimento pelo auxílio nas diferentes etapas de classificação e diagnóstico dos casos aqui reunidos e pelas importantes sugestões na descrição dos resultados aqui reunidos.

Ao Dr. Juliano Adams Perez, agradeço pelo auxílio indispensável na realização do exame de tomografia computadorizada com reconstrução tridimensional relatado em um dos manuscritos deste trabalho.

Aos demais membros da lista de discussões “Congenital Skeletal Malformations and Osteochondrodysplasias in Brazil (CoSMO-B)” e, especialmente, ao Prof. Dr. Andrea Superti-Furga e à Dra. Ana Belinda Campos-Xavier por todo o aprendizado clínico e laboratorial que me foi proporcionado ao longo da realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira, meu agradecimento pela realização dos sequenciamentos do gene *SOX9* de pacientes com displasia campomélica apresentados em um dos manuscritos desse trabalho.

À Dra. Sandra Leistner-Segal, sou grato pela realização das genotipagens dos genes *SRY* e *ZFX* descritas em um dos manuscritos desse trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho Gabriel Vasata Furtado, André Anjos da Silva, Márcia Polese Bonatto, Karina Carvalho Donis, Luiza Emy Dorfman, Tássia Tonon, Flávia Romariz Ferreira, Cláudia Fernandes Lorea, Fabiano Poswar, Hugo Bock, Marina Siebert, Rafaella Mergener e Mirela Severo Gil, agradeço pelo companheirismo e pelos bons momentos ao longo dos dois últimos anos.

Finalmente, um agradecimento especial à minha família, Christine de Mattos, Marcelo de Mattos e Fernando Preusser de Mattos pela confiança e pelo apoio incondicional em todos os meus projetos. Se cheguei até aqui, certamente foi por causa de vocês.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| Lista de abreviaturas | 8 |
| Resumo | 10 |
| Abstract | 12 |
| 1 - Introdução | 14 |
| 1.1 - Classificação e diagnóstico das osteocondrodisplasias..... | 14 |
| 1.2 - Iniciativa de uma rede brasileira de auxílio no diagnóstico de displasias esqueléticas | 15 |
| 1.3 - Aspectos clínicos da displasia campomélica | 16 |
| 1.4 - O fator de transcrição SOX9: caracterização e associação à displasia campomélica | 19 |
| 1.4.1 - Características e funções da família SOX | 19 |
| 1.4.2 - Associação de SOX9 à displasia campomélica..... | 25 |
| 1.4.3 - SOX9: organização do <i>locus</i> e implicações fisiológicas e patológicas | 25 |
| 1.4.4 - SOX9 e a indução da condrogênese..... | 29 |
| 1.4.4.1 - Aspectos gerais..... | 29 |
| 1.4.4.2 - Genes alvo de SOX9 na condrogênese..... | 30 |
| 1.4.4.3 - Regulação transcricional do SOX9 na condrogênese..... | 33 |
| 1.4.4.4 - Regulação pós-traducional do SOX9 na condrogênese | 36 |
| 1.4.5 - SOX9 e o desenvolvimento sexual masculino..... | 39 |
| 1.5 - Bases moleculares da displasia campomélica..... | 42 |
| 1.5.1 - SOX9: identificação e mecanismo de mutações na região codificante do gene | 42 |
| 1.5.2 - SOX9: identificação de mutações fora da região codificante..... | 53 |

| | |
|--|------------|
| 2 - Objetivos | 56 |
| 3 - Resultados | 57 |
| 3.1 - Caracterização clínica e molecular de uma coorte brasileira de pacientes com displasia campomélica e identificação de sete novas mutações no gene SOX9 | 57 |
| 3.2 - Caracterização de displasias esqueléticas com manifestação pré-natal no Hospital de Clínicas de Porto Alegre..... | 86 |
| 3.3 - Relato de caso: Espectro fenotípico da atelosteogênese tipo 2/ displasia diastrófica - diagnóstico pré-natal e pré-implantacional | 117 |
| 3.4 - Relato de caso: Validação da técnica de tomografia computadorizada com reconstrução tridimensional no diagnóstico pré-natal da hipocondrogênese: relato de um caso ilustrativo | 132 |
| 3.5 - Proposta de um protocolo operacional padrão para o diagnóstico de displasias esqueléticas com foco no período pré-natal..... | 147 |
| 4 - Discussão | 171 |
| 5 - Referências bibliográficas gerais | 178 |
| 6 - Anexos | 186 |
| A1 - Termo de consentimento livre e esclarecido, versão para pacientes | 187 |
| A2 - Termo de consentimento livre e esclarecido, verso para pais e/ou responsáveis de pacientes..... | 189 |
| A3 - Primers utilizados para amplificação do gene SOX9..... | 191 |
| A4 - Condições de PCR utilizadas para amplificação do gene SOX9..... | 192 |
| A5 - Folder de divulgação do projeto, apresentado na edição de 2012 do Curso de Controvérsias em Medicina Fetal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre..... | 193 |

LISTA DE ABREVIATURAS

3D-CT: tomografia computadorizada com reconstrução tridimensional

ACD: displasia acampomérica

ADS: anomalia do desenvolvimento sexual

BMPs: proteínas morfogenéticas ósseas

CaM: calmodulina

cAMP: adenosina monofosfato cíclica

CD: displasia campomérica

dpc: dias pós-coito

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

FGFR: receptor de fator de crescimento de fibroblastos

HAT: histona acetiltransferase

Hh: sinalização via proteína Hedgehog

HMG: 'high-mobility group box'

HOX: genes homeóticos

kb: quilobases (x 1.000 nucleotídeos)

kDa: quiloDaltons

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

Mb: megabases (x 1.000.000 nucleotídeos)

NES: sinal de exporte nuclear

NLSs: sinal de localização nuclear

OCDs: osteocondrodisplasias

OMIM: base de dados do "Online Mendelian Inheritance in Man"

pb: pares de bases

PGDS: prostaglandina D sintase

PKA: proteína quinase A

PQA: motivo rico em prolínas, glutaminas e alaninas

PRS: sequência de Pierre-Robin

PTHrP: peptídeo relacionado ao hormônio paratireoideano

RBDE: Rede Brasileira de Displasias Esqueléticas

SGM-HCPA: Serviço de Genética Médica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

SMADs: pequenas proteínas de interação nuclear

SOX: 'Sry-related HMG box'

SRY: 'sex-determining region Y'

TA: domínio de transativação

TES: 'enhancer' testículo-específico do gene *Sox9*

TESCO: região conservada de TES

TGF- β : fator de crescimento transformador beta

YAC: cromossomo artificial de levedura

RESUMO

O presente trabalho aborda como questão central o estudo do conjunto de doenças genéticas conhecido como displasias esqueléticas. Apesar de individualmente raras, coletivamente as displasias esqueléticas representam uma importante causa de mortalidade perinatal. A maioria das anormalidades nesse grupo é de origem monogênica, podendo ser herdada de forma dominante, recessiva ou ligada ao X. Atualmente, são reconhecidas mais de 450 displasias esqueléticas distintas, com quase metade apresentando manifestações antes do nascimento. Esse é o caso da displasia campomélica, uma doença autossômica dominante grave e geralmente letal do sistema esquelético que ocorre devido a mutações no gene *SOX9*, um importante regulador do desenvolvimento embrionário. Para esse grupo de displasias de identificação pré-natal, o diagnóstico precoce e acurado é fundamental para o correto manejo da gravidez e planejamento clínico pós-natal, além de ser imprescindível para o aconselhamento genético.

O presente estudo relata a caracterização clínica e molecular de uma coorte brasileira de doze pacientes com displasia campomélica. Além de apresentar dados clínicos sobre os pacientes estudados, esse trabalho identificou sete novas mutações no gene *SOX9*, nunca antes descritas, associadas à displasia campomélica.

São apresentados ainda dados referentes à caracterização clínica dos casos de displasia esquelética com detecção pré-natal identificados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre em um período de 20 anos. Foram identificados 33 casos, com frequências de condições específicas de acordo com a literatura médica. Entretanto, não foram detectadas melhorias no diagnóstico pré-natal das displasias esqueléticas em anos mais recentes, como observado em diversas coortes de outros países. Somam-se a esse trabalho dois relatos de casos de pacientes incluídos no estudo que abordam a utilização do diagnóstico genético pré-implantacional e da tomografia computadorizada com reconstrução tridimensional em casos de displasia esquelética.

Por fim, esse estudo é concluído com a apresentação de uma proposta para o melhoramento do diagnóstico de displasias esqueléticas no Brasil. Fundamentado por uma vasta literatura especializada, esse manuscrito final apresenta algoritmos diagnósticos simples que podem ser incorporados na prática clínica de instituições e serviços de medicina fetal visando à identificação pré-natal mais precisa de condições do espectro das displasias esqueléticas.

Em conclusão, espera-se que o presente trabalho possa contribuir para um maior entendimento a respeito do imenso e heterogêneo grupo das displasias esqueléticas. Estudos futuros serão decisivos no estabelecimento de melhores práticas clínicas e laboratoriais no que diz respeito a pacientes diagnosticados com displasias esqueléticas e seus familiares.

ABSTRACT

The present work aims at studying the group of genetic diseases known as skeletal dysplasias. Although individually rare, collectively the skeletal dysplasias represent an important cause of perinatal death. The majority of abnormalities in this group is of monogenic origin, and may be inherited as dominant, recessive, or X-linked conditions. Currently, over 450 skeletal dysplasias are recognized, with almost half of them manifesting antenatally. This is the case for campomelic dysplasia, a severe, usually lethal autosomal dominant skeletal disease that arises from mutations in *SOX9*, a major regulator of embryonic development. For this group of dysplasias with prenatal identification, the early and accurate diagnosis is pivotal for proper management of pregnancy and postnatal clinical planning, besides being invaluable for genetic counseling.

This study reports the clinical and molecular characterization of a Brazilian cohort of 12 campomelic dysplasia patients. Besides the presentation of clinical data, this work has identified seven new *SOX9* mutations, never reported before, and associated to campomelic dysplasia.

Data are also presented here regarding the clinical characterization of skeletal dysplasia cases with prenatal detection identified at Hospital de Clínicas de Porto Alegre during the last 20 years, in order to better understand the local singularities and frequencies of this congenital malformation group. Thirty-three skeletal dysplasia cases with prenatal identification and postnatal radiological confirmation were identified, with frequencies of specific conditions being in agreement with the medical literature. However, improvements in the prenatal diagnosis of skeletal dysplasias in recent years were not observed, as is reported for several cohorts in other countries. Two case-reports of patients included in this study add up to this work, which relate the use of pre-implantation genetic diagnosis and computed tomography with tridimensional reconstruction in cases of skeletal dysplasias.

Finally, this work is concluded with the presentation of a proposal for the improvement of the diagnosis of skeletal dysplasias in Brazil. Based on a vast specialized literature, this final manuscript presents diagnostic algorithms that could be incorporated in the clinical practice of fetal medicine institutions and services, aiming to a more accurate prenatal identification of conditions from the skeletal dysplasia spectrum.

In conclusion, it is expected that this work will contribute to a better understanding towards the vast and heterogeneous group of skeletal dysplasias. Future studies will be decisive to the establishment of better clinical and laboratorial practices regarding patients diagnosed with a skeletal dysplasia and their relatives.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Classificação e diagnóstico das osteocondrodisplasias

Dentre as anomalias congênitas que podem afetar o ser humano, as displasias se caracterizam por alterações na organização primordial de tecidos corporais, enquanto as malformações são definidas como defeitos morfológicos de órgãos, partes de órgãos ou de regiões corporais maiores que acarretam em um processo fisiológico intrinsecamente anormal. No âmbito do sistema esquelético, utiliza-se o termo displasia esquelética para denominar as desordens do desenvolvimento dos tecidos ósseos e cartilagosos. As displasias esqueléticas, ou osteocondrodisplasias (OCDs), diferenciam-se conceitualmente e fisiologicamente das disostoses – anomalias em ossos isolados ou em combinação – e das disrupções, em que se observam alterações ósseas secundárias à ingestão de substâncias teratogênicas ou a agentes infecciosos (Spranger *et al.*, 2002).

O processo de desenvolvimento do sistema esquelético, assim como dos demais componentes corporais, depende da expressão regulada de grupos de genes específicos. Diferentes fatores de transcrição, intermediários de sinalização e proteínas efetoras são expressos em quantidades definidas e em períodos embrionários críticos para a promoção de proliferação, migração e condensação mesenquimal, apoptose, diferenciação e especialização das células componentes de cada tecido. No que concerne ao sistema esquelético, mutações em genes com expressão transitória durante o início da organogênese – por exemplo, em genes homeóticos que definem padrões de desenvolvimento – resultam mais comumente em disostoses, afetando segmentos isolados do embrião. Em contrapartida, defeitos na expressão de genes de sinalização permanente após a organogênese (com início pré-natal e manutenção pós-natal) levam, de forma geral, a quadros de displasia, em que toda a formação de tecidos ósseo-cartilagosos é afetada (Spranger *et al.*, 2002).

As OCDs compreendem um grande grupo de doenças genéticas que produzem alterações no crescimento e/ou nas proporções corporais. Atualmente,

são reconhecidas cerca de 450 OCDs distintas, com aproximadamente metade delas apresentando manifestação ao nascimento; destas, um número considerável é letal (Warman *et al.*, 2011). Embora individualmente raras, as OCDs tem grande relevância como grupo de anomalias congênitas, devido a sua importante morbimortalidade na infância. A prevalência coletiva das OCDs é de aproximadamente um caso para cada 5.000 nascimentos, com uma concentração muito maior entre natimortos. Recentemente, estimou-se uma prevalência de 3,2 para cada 10.000 nascimentos na América do Sul (Barbosa-Buck *et al.*, 2012). Quanto ao padrão de herança, existem OCDs autossômicas dominantes, autossômicas recessivas e ligadas ao sexo. A classificação das OCDs é revisada periodicamente a partir da evolução do conhecimento na área, sendo atualmente dividida em 40 famílias de desordens que afetam o esqueleto. Do ponto de vista etiológico, aproximadamente metade das OCDs descritas já apresentam bases moleculares identificadas, subdivididas em grupos gênicos que melhor orientam o estudo clínico e laboratorial (Warman *et al.*, 2011).

Apesar dos grandes avanços no entendimento molecular de diversas OCDs e da facilidade crescente do sequenciamento de DNA em larga escala, o estudo radiológico do corpo inteiro – um exame simples, de baixo custo e disponível praticamente em qualquer hospital – continua sendo a investigação complementar essencial para a detecção dessas doenças. No período pré-natal, a detecção por ultrassonografia possibilita o reconhecimento de uma OCD entre o segundo e terceiro trimestres de gestação. De fato, aproximadamente 40% das OCDs podem ser diagnosticadas por essa abordagem (Krakow *et al.*, 2009); entretanto, dificilmente se podem detalhar os tipos específicos de alterações presentes, tornando sempre necessária a confirmação pós-natal do diagnóstico por exame radiológico.

1.2 – Iniciativa de uma rede brasileira de auxílio no diagnóstico de displasias esqueléticas

Em função da grande heterogeneidade clínica e radiológica das OCDs, a confirmação do diagnóstico e a classificação adequada dessas doenças

necessitam da atenção de um profissional especialista em displasias ósseas, principalmente quando se leva em conta as OCDs letais, cuja oportunidade de confirmação é muito restrita ao período imediato após o nascimento. Nesse sentido, o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) é referência regional na iniciativa de estabelecimento da Rede Brasileira de Displasias Esqueléticas (RBDE; <http://www.oed.fcm.unicamp.br>). Este grupo colaborativo objetiva a identificação de OCDs através do fornecimento de auxílio no diagnóstico clínico e molecular. A RBDE contará com profissionais de diversas regiões do País especializados em displasias ósseas. Além do suporte clínico, a Rede propõe a caracterização molecular dos casos, uma vez que certos padrões radiológicos são bastante indicativos de mutações em determinados genes. Para tal, cada centro colaborador deverá se dedicar ao sequenciamento de alguns genes candidatos, de modo a tornar o processo de diagnóstico molecular mais ágil e econômico, evitando que os centros colaboradores invistam na caracterização dos mesmos genes de forma redundante.

Essa iniciativa nacional contribuirá de forma significativa para o estabelecimento de protocolos de investigação pré- e pós-natal das OCDs, a fim de que se obtenham dados clínicos e radiológicos que permitam diagnósticos acurados. Além disso, torna-se possível disponibilizar aconselhamento genético para as famílias envolvidas, viabilizar estudos moleculares específicos e avaliar a prevalência local dos diferentes tipos de OCDs.

1.3 – Aspectos clínicos da displasia campomélica

A displasia campomélica (OMIM 114290) foi bem caracterizada pela primeira vez na década de 1970 por Maroteaux e colaboradores, que cunharam o termo campomelia (do grego “membros encurvados”) para se referir ao encurvamento do fêmur e, ocasionalmente, de outros ossos longos, observado na maioria dos pacientes analisados (Maroteaux *et al.*, 1971). Caracteriza-se como uma doença genética de herança autossômica dominante, cujas principais

manifestações clínicas incluem encurvamento dos membros inferiores, fossetas na pele da porção pré- e pós-tibial, insuficiência respiratória associada à malformação da cartilagem traqueobronquial e hipoplasia do tórax (usualmente resultando em morte neonatal), micrognatia, dolicocefalia, fenda palatina, ponte nasal achatada e baixa implantação das orelhas (Spranger *et al.*, 2002). Observa-se ainda luxação de quadril, pés tortos e, em aproximadamente 75% dos pacientes com cariótipo masculino (46,XY), reversão sexual completa ou, pelo menos, algum grau de disgenesia gonadal. Dentre as alterações mais frequentemente observadas ao exame radiológico figuram o encurvamento da tíbia e do fêmur, a hipoplasia escapular e vertebral, a presença de 11 pares de costelas com tórax curto e em forma de sino e a luxação de quadril com hipomineralização do púbis e estreitamento das cristas ilíacas (Figura 1). Uma forma mais branda da doença tem sido descrita como displasia acampomélica, em que o achado característico de fêmures encurvados não está presente (Spranger *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2009). Pacientes com displasia campomélica também podem apresentar outras anomalias, incluindo ausência de bulbo olfatório, defeito de septo ventricular e hipoplasia pancreática (Akiyama *et al.*, 2005).

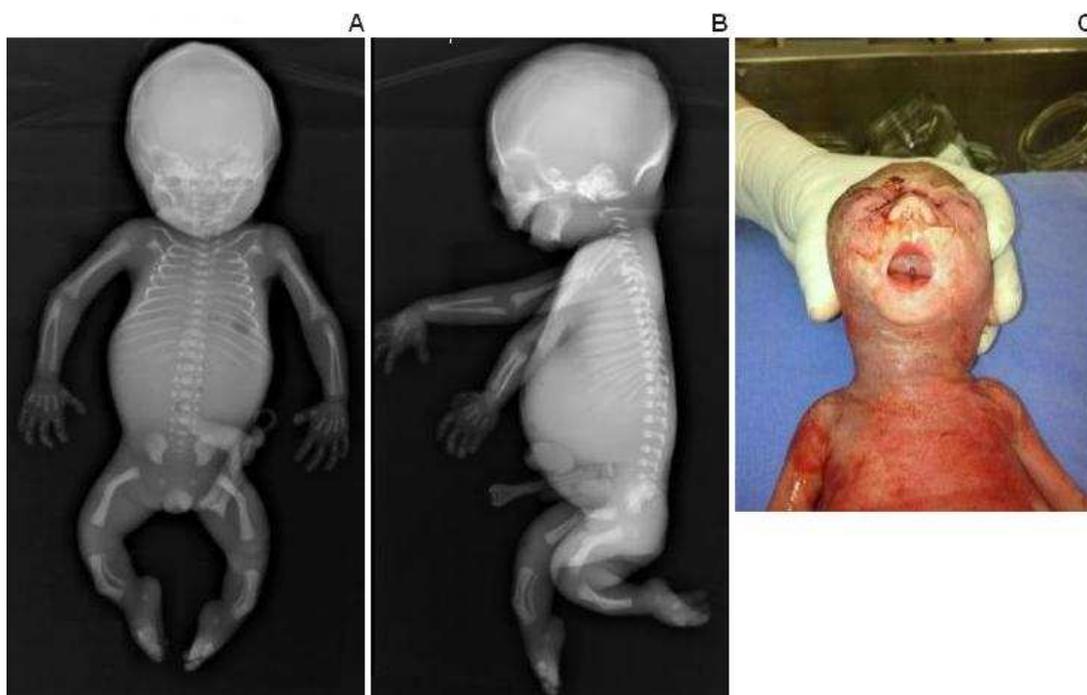


Figura 1: Manifestações clínicas características da displasia campomélica. Radiografias nas posições ântero-posterior (A) e lateral (B) de um feto masculino de 23 semanas com displasia campomélica. As alterações esqueléticas típicas incluem fêmures e tíbias curvados, 11 pares de costelas e escápulas hipoplásicas. C: Fotografia do feto evidenciando face pequena e plana com micrognatia e fenda palatina posterior. Fonte: Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Como explicitado anteriormente, as complicações respiratórias são a causa mais comum de óbito em casos de displasia campomélica, especialmente durante os primeiros dias de vida. Entretanto, um grupo significativo de pacientes apresenta fenótipos mais brandos (displasia acampomélica) e geralmente sobrevive ao período neonatal, podendo chegar à idade adulta sem apresentar intercorrências de maior gravidade (Wagner *et al.*, 1994; Smyk *et al.*, 2007; Lecointre *et al.*, 2009). A quase totalidade dos casos familiares de displasia campomélica está compreendida nesse conjunto de pacientes menos graves, enquanto que a grande maioria dos casos originados por mutação *de novo* não chegam ao primeiro ano de vida (Gordon *et al.*, 2009). Os mecanismos moleculares da displasia campomélica nesses dois grupos fenotípicos também são geralmente distintos (ver discussão adiante). Nos casos de indivíduos acometidos pela displasia campomélica com reversão sexual ou disgenesia gonadal, a literatura especializada tem recomendado a realização de gonadectomia profilática, visto o elevado risco de desenvolvimento de tumores originários da displasia testicular presente (Cost *et al.*, 2009).

1.4 – O fator de transcrição SOX9: caracterização e associação à displasia campomélica

1.4.1 – Características e funções da família SOX

Convencionalmente, genes que codificam proteínas com similaridade de sequência de pelo menos 60% ao domínio HMG (“High-Mobility Group Box”) do fator de transcrição SRY (“Sex-determining Region Y”) são denominados de SOX (“Sry-related HMG Box”) (Schafer *et al.*, 1995). HMG constitui um domínio de ligação ao DNA de cerca de 80 aminoácidos, presente nos membros da superfamília de proteínas HMG. Polipeptídeos das famílias TCF/SOX/MATA têm afinidade a sequências específicas no DNA, enquanto os membros das famílias HMG/UBF ligam ao DNA de forma não-específica (Kiefer, 2007).

Proteínas SOX são fatores de transcrição com afinidade pela sequência consenso de nucleotídeos (A/T)(A/T)CAA(A/T)G e têm o domínio HMG

caracterizado pelo motivo de aminoácidos RPMNAFMVW (exceto SRY, que contém somente o motivo RPMNAF). Em mamíferos, os membros dessa família compreendem SOX1 a 15, SOX17, SOX18, SOX21 e SOX30, divididos em nove subgrupos filogenéticos. SOX9 pertence ao subgrupo SOXE, juntamente com SOX8 e SOX10. Essas proteínas se ligam à curvatura menor do DNA e causam uma angulação na estrutura da dupla-hélice. Acredita-se que essa angulação facilite a aproximação de elementos potencializadores de transcrição (“enhancers”), de promotores e de proteínas acessórias que, coletivamente, promovem ou inibem a transcrição de genes alvo, dependendo do SOX envolvido (Kiefer, 2007).

As funções gerais das proteínas SOX compreendem a regulação da especificação e diferenciação de muitos tipos celulares, sendo que membros de um mesmo subgrupo geralmente têm funções em comum. De fato, diversos genes SOX têm sido associados a doenças monogênicas (Tabela I) e, até mesmo, a alguns tipos de neoplasias (Kiefer, 2007). Um mesmo fator SOX pode mediar processos durante diferentes estágios do desenvolvimento de um tipo celular. SOX9, especificamente, parece ser importante na formação de células especializadas do sistema esquelético, pâncreas, intestino, cérebro, rim, derivados da crista neural, testículos e válvulas cardíacas (Gordon *et al.*, 2009; Pritchett *et al.*, 2011). Essa variedade de papéis atribuídos à proteína SOX9 pode ser apreciada pela grande quantidade de funções e processos já associados a essa proteína por estudos experimentais (Tabela II). Na crista neural, a SOX9 contribui de forma decisiva para a transição epitelial-mesenquimal durante a migração das células na fase de maturação. De forma geral, verifica-se expressão de SOX9 em tipos celulares mais primitivos, antes de se observar diferenciação terminal e aquisição de funções específicas. Apesar da vasta gama de atividades descritas para esse fator de transcrição, há dois eventos fisiológicos nos quais a SOX9 parece ser predominante, atuando como um orquestrador principal de programas genéticos específicos: o desenvolvimento testicular e a condrogênese (Gordon *et al.*, 2009) (ver discussão adiante).

Justamente por atuar em vias de diferenciação celular, a expressão inapropriada do gene SOX9 tem sido associada a certas doenças (Pritchett *et al.*,

2011). Em fibroses, escleroses e outras desordens relacionadas – como fibrose hepática, glomerulosclerose e calcificação vascular – a SOX9 parece promover a deposição patológica de componentes da matriz extracelular. Além disso, evidências recentes sugerem que a SOX9 possa estar envolvida no desenvolvimento de neoplasias. Dentre os tumores investigados, identificou-se correlação entre a atividade do gene SOX9 e cânceres de bexiga, ovário, próstata, intestino, cérebro e pele (Pritchett *et al.*, 2011).

A regulação da localização subcelular é fundamental para a correta atividade de moléculas atuantes em redes gênicas do desenvolvimento embrionário. Em proteínas da família SOX, existem dois motivos de aminoácidos correspondentes a sinais de localização nuclear (NLSs) e que se encontram posicionados em ambas as extremidades do domínio HMG (Sim *et al.*, 2008). Estruturas do tipo NLS são características de proteínas maiores do que 40 kDa transportadas ativamente para o núcleo via complexos dos poros nucleares. Especificamente em SOX9, a NLS C-terminal é caracterizada por uma sequência curta de aminoácidos básicos (PRRR) que se liga com alta afinidade à proteína importina- β . Associada à SOX9, a importina- β interage com a nucleoporina RanBP2, localizada na face citoplasmática dos poros nucleares, que medeia a translocação nuclear (Sim *et al.*, 2008). Por outro lado, a NLS N-terminal da SOX9 é composta de duas regiões altamente básicas, separadas por onze aminoácidos (KRPxxxxxxxxxxRRK) que interagem, ao menos *in vitro*, com a calmodulina (CaM). Quando a concentração citoplasmática de cálcio atinge certo limiar, a CaM é ativada e se liga a proteínas alvo, facilitando a translocação dessas moléculas via poros nucleares por um mecanismo ainda não totalmente elucidado (Sim *et al.*, 2008). De modo análogo, proteínas SOX ainda contam com um sinal de exporte nuclear (NES) pequeno e rico em leucinas, localizado no centro do domínio HMG. Esse sinal interage com o CRM1, um receptor de exporte nuclear que se liga a proteínas alvo e as transloca para o citoplasma, possibilitando, principalmente, a depleção nuclear de fatores de transcrição em momentos críticos do desenvolvimento, quando estes não são mais necessários para a ativação de genes alvo (Sim *et al.*, 2008).

Tabela I: Doenças monogênicas associadas a mutações em genes da família SOX em seres humanos.

| Gene | Doença monogênica | OMIM^a |
|--------------|---|----------------------------|
| <i>SRY</i> | Reversão sexual 46,XX 1 Reversão sexual 46,XY 1 | 400045 400044 |
| <i>SOX1</i> | - | - |
| <i>SOX2</i> | Microftalmia síndrômica 3 | 206900 |
| <i>SOX3</i> | Retardo mental ligado ao X com deficiência isolada de hormônio do crescimento Pan-hipopituitarismo ligado ao X | 300123 312000 |
| <i>SOX4</i> | - | - |
| <i>SOX5</i> | - | - |
| <i>SOX6</i> | - | - |
| <i>SOX7</i> | - | - |
| <i>SOX8</i> | - | - |
| <i>SOX9</i> | Displasia campomélica/ acampomélica | 114290 |
| <i>SOX10</i> | Síndrome de Waardenburg-Shah, variante neurológica (PCWH) Síndrome de Waardenburg, tipo 2E Síndrome de Waardenburg, tipo 4C | 602229 611584 613266 |
| <i>SOX11</i> | - | - |
| <i>SOX12</i> | - | - |
| <i>SOX13</i> | - | - |
| <i>SOX14</i> | - | - |
| <i>SOX15</i> | - | - |
| <i>SOX17</i> | Refluxo vesicoureteral 3 | 613674 |
| <i>SOX18</i> | Síndrome de hipotricose-linfedema-telangectasia | 607823 |
| <i>SOX21</i> | - | - |
| <i>SOX30</i> | - | - |

^aOnline Mendelian Inheritance in Man” (disponível em www.omim.org); acesso em Agosto de 2013.

Tabela II: Classificação do “Gene Ontology Database” para localizações subcelulares, funções moleculares e processos biológicos associados à proteína SOX9 de *Homo sapiens* por evidências experimentais (excluindo-se inferências *in silico* e por homologia com proteínas de outras espécies).

| Registro | Descritor^a | Ontologia |
|-----------------|--|--------------------|
| GO:0019933 | Sinalização mediada por cAMP | Processo biológico |
| GO:0071347 | Resposta celular a interleucina-1 | Processo biológico |
| GO:0071300 | Resposta celular a ácido retinoico | Processo biológico |
| GO:0071560 | Resposta celular a estímulo por TGF- β | Processo biológico |
| GO:0003413 | Diferenciação condrocítica envolvida na formação de ossificação endocondral | Processo biológico |
| GO:0006338 | Remodelação de cromatina | Processo biológico |
| GO:0008584 | Desenvolvimento da gônada masculina | Processo biológico |
| GO:0043066 | Regulação negativa de apoptose | Processo biológico |
| GO:0045892 | Regulação negativa de transcrição dependente de DNA | Processo biológico |
| GO:0006334 | Formação de nucleossomos | Processo biológico |
| GO:0061036 | Regulação positiva do desenvolvimento da cartilagem | Processo biológico |
| GO:0008284 | Regulação positiva da proliferação celular | Processo biológico |
| GO:0032332 | Regulação positiva da diferenciação condrocítica | Processo biológico |
| GO:0010634 | Regulação positiva da migração de células epiteliais | Processo biológico |
| GO:0050679 | Regulação positiva da proliferação de células epiteliais | Processo biológico |
| GO:2000020 | Regulação positiva do desenvolvimento da gônada masculina | Processo biológico |
| GO:2000741 | Regulação positiva da diferenciação de células-tronco mesenquimais | Processo biológico |
| GO:0045944 | Regulação positiva da transcrição a partir de promotores para RNA polimerase tipo II | Processo biológico |
| GO:0045893 | Regulação positiva da transcrição dependente de DNA | Processo biológico |
| GO:0030850 | Desenvolvimento da próstata | Processo biológico |
| GO:0006461 | Formação de complexos proteicos | Processo biológico |
| GO:0010564 | Regulação do ciclo celular | Processo biológico |
| GO:0001501 | Desenvolvimento do sistema esquelético | Processo biológico |

Tabela II (continuação):

| Registro | Descritor^a | Ontologia |
|-----------------|--|--------------------|
| GO:0005634 | Núcleo | Componente celular |
| GO:0043234 | Complexos proteicos | Componente celular |
| GO:0003682 | Ligação à cromatina | Função molecular |
| GO:0001046 | Promotor central de ligação ao DNA sequência-específica | Função molecular |
| GO:0035326 | Ligação de 'enhancers' | Função molecular |
| GO:0005515 | Ligação de proteínas | Função molecular |
| GO:0034236 | Ligação à subunidade catalítica da proteína quinase A | Função molecular |
| GO:0001077 | Atividade de fator de transcrição por ligação sequência-específica à região central promotora da RNA polimerase tipo II, envolvida na regulação positiva da | Função molecular |
| GO:0003705 | Atividade de fator de transcrição por ligação sequência-específica a 'enhancers' distais de RNA polimerase tipo II | Função molecular |
| GO:0003700 | Atividade de fator de transcrição por ligação sequência-específica | Função molecular |

^aDe acordo com o "Gene Ontology Database" (disponível em www.geneontology.org);
acesso em Agosto de 2013.

1.4.2 – Associação do gene SOX9 à displasia campomélica

No início da década de 1990 iniciou-se a investigação molecular de pacientes afetados pela displasia campomélica. Um dos estudos pioneiros nesse tema identificou, pela análise de cariótipos, três pacientes com translocações balanceadas em que segmentos do cromossomo 17 estavam sempre envolvidos (Tommerup *et al.*, 1993). Uma análise mais refinada desses casos propôs a existência de um *locus* para a displasia campomélica na porção terminal do braço longo desse cromossomo, entre as regiões compreendidas entre as bandas 17q24.3 e 17q25.1. Apenas alguns meses após a divulgação desses achados, duas investigações independentes refinaram o mapeamento cromossômico da displasia campomélica, mostrando que mutações no gene SOX9 estavam associadas ao fenótipo observado nos pacientes (Foster *et al.* 1994; Wagner *et al.* 1994). No conjunto, os dois trabalhos evidenciaram alterações na região codificante ou nas fronteiras éxon/intron de SOX9 em seis pacientes com achados típicos de displasia campomélica. Interessantemente, todos os indivíduos 46,XY analisados apresentavam genitália externa feminina. Com isso, parecia sensato supor que essa proteína deveria ser responsável, pelo menos em parte, por aspectos centrais do desenvolvimento das gônadas e dos componentes do sistema esquelético. De fato, linhas de investigação do gene SOX9 durante as últimas duas décadas têm corroborado essa hipótese (ver discussão adiante).

1.4.3 – SOX9: organização do *locus* e implicações fisiológicas e patológicas

Apesar do SOX9 ser um gene pequeno, composto somente de três éxons, e compreender pouco mais de 5 kb de DNA, cada vez mais estudos têm apontado a existência de uma vasta região regulatória tanto a montante (“upstream”; porção 5’) como a jusante (“downstream”; porção 3’) do gene (Gordon *et al.*, 2009). De fato, diversos elementos regulatórios – em sua maioria “enhancers” que definem expressão tecido-específica – parecem estar distribuídos por cerca de dois milhões de pares de bases (2 Mb) ao redor do SOX9 (Figura 2). Essas observações têm desafiado a definição clássica do que constitui um gene e

elevam *SOX9* à categoria dos genes mais extensamente regulados do genoma humano, como verificado para os importantes genes homeóticos da família *HOX* (Tschopp e Duboule, 2011).

Um dos primeiros estudos a investigar as vizinhanças genômicas do *SOX9* construiu dois cromossomos artificiais de levedura (YACs) contendo diferentes quantidades de DNA localizadas a 5' do gene, a fim de estudar a capacidade regulatória dessas sequências (Wunderle *et al.*, 1998). Especificamente, dois YACs contendo 75 kb (YAC-75) e outro 350 kb (YAC-350) de DNA a montante do *SOX9*, associados a genes repórteres, foram inseridos em camundongos e os padrões de expressão tecidual foram analisados. Desse modo, foi possível determinar que os 350 kb de sequências nucleotídicas imediatamente a montante do *SOX9* são quase totalmente suficientes para se reproduzir o comportamento transcricional do gene de modo similar ao observado em animais do tipo selvagem. Enquanto o YAC-75 não foi capaz de direcionar a expressão gênica do gene repórter para tecidos como o processo mandibular, o segundo arco branquial, as costelas, as vértebras cervicais e os ossos longos, o YAC-350 possibilitou um padrão de expressão completo (similar ao normalmente observado para o *SOX9*), à exceção dos testículos (Wunderle *et al.*, 1998).

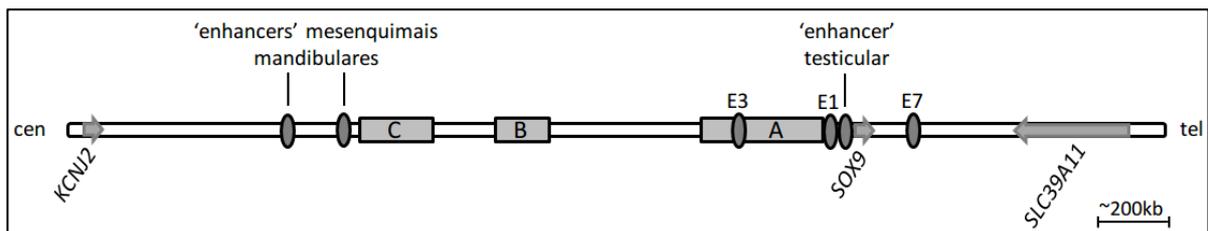


Figura 2: Diagrama do contexto genômico do *locus* do gene *SOX9*. No esquema, estão representados cerca de dois milhões de pares de bases nucleotídicas a montante (5') e a jusante (3') da região codificante do *SOX9*. Os genes adjacentes ao *SOX9* compreendem o *KCNJ2* na extremidade centromérica (cen) e *SLC39A11* na extremidade telomérica (tel). Regiões em cinza denominadas A, B e C representam porções de translocações cromossômicas identificadas em pacientes com displasia campomélica sem mutações na região codificante de *SOX9*, sugerindo que essas regiões provavelmente contêm sequências importantes para a regulação da expressão de *SOX9* em diferentes tecidos. Potencializadores de transcrição ('enhancers') identificados por expressão de gene repórter em camundongos estão representados pelos elementos 'enhancers' mesenquimais mandibulares e testicular, e E1, E3 e E7, caracterizados pela expressão tecido-específica do *SOX9* em camundongos. Modificado de (Gordon *et al.*, 2009).

Elementos regulatórios ainda mais distantes da porção codificante do *SOX9* têm sido sugeridos, como é o caso do possível “enhancer” *SOX9cre1*, localizado a 1,1 Mb a montante do *SOX9* (Bien-Willner *et al.*, 2007). Quando clonado em associação direta com o gene em linhagens celulares de condrossarcoma, o *SOX9cre1* foi capaz de induzir um aumento de duas vezes na expressão do *SOX9*. Por outro lado, não se observou esse efeito em células não-condrocíticas Hela, sugerindo que fatores celulares específicos interagem com essa sequência regulatória. De fato, os autores que primeiro caracterizaram esse elemento mostraram que o *SOX9cre1* interage com o fator de transcrição GLI1 – um dos principais intermediários da via de sinalização HH, importante no desenvolvimento embrionário de diversos tipos celulares – e que essa associação só é observada em células da linhagem condrocítica (Bien-Willner *et al.*, 2007).

SOX9 exerce também papel fundamental sobre a determinação e diferenciação dos testículos (ver seção 1.3.5 – *SOX9* e o desenvolvimento sexual masculino); entretanto, apesar da aparente abundância de elementos regulatórios para a expressão do *SOX9* em muitos tecidos, a identificação de sequências que determinam especificidade de transcrição testicular parece ser bem mais desafiadora. Um dos primeiros estudos a avaliar essa questão analisou uma região de DNA a 10 kb a montante do *Sox9* em camundongos, em que se identificou um “enhancer” de 3,2 kb denominado TES (“*testis-specific enhancer of Sox9*”) (Sekido e Lovell-Badge, 2008). Esse elemento, em especial sua porção central conservada denominada TESCO, foi capaz de interagir com moduladores da diferenciação sexual masculina, estabelecendo altos níveis de expressão de *Sox9* necessários para a conversão das gônadas primordiais em testículos (Sekido e Lovell-Badge, 2008). Ainda que essas evidências em modelos animais sejam bastante promissoras, análises de cariótipos de pacientes com diferentes graus de dismorfismo sexual desafiam a determinação clara de um “enhancer” testicular para o *SOX9* (ver a seção 1.4.2 - *SOX9*: identificação de mutações fora da região codificante) (Gordon *et al.*, 2009). Dentre esses indivíduos, alguns apresentam translocações e deleções cromossômicas que afetam a região putativa TES, mas muitos outros casos de translocação deixam essa região intacta, levando às hipóteses (i) da presença de “enhancers” adicionais

responsáveis pela expressão testicular do SOX9, ou (ii) da associação de outros elementos regulatórios mais globais com TES (Gordon *et al.*, 2009).

1.4.4 – SOX9 e a indução da condrogênese

1.4.4.1 – Aspectos gerais

A formação do esqueleto humano e de outros mamíferos representa a ação conjunta de dois processos de desenvolvimento: ossos chatos do crânio e da clavícula são formados por ossificação intramembranosa (sem molde cartilaginoso), enquanto que os demais ossos sofrem o processo de ossificação endocondral (Kiefer, 2007). Nessa via de ossificação endocondral, células precursoras chamadas de osteocondroprogenitores são geradas a partir de aglomerados densos de células da crista neural ou do mesoderma, conhecidos como condensações mesenquimais (Long e Ornitz, 2013). Através de estímulos do meio extracelular, essas células mais primárias se diferenciam em condrócitos e começam a secretar uma matriz extracelular específica de cartilagem. Nas placas de crescimento, os condrócitos passam por um processo de proliferação unidirecional que culmina na formação de colunas condrocíticas. A seguir, há a promoção da saída do ciclo celular, seguida de uma fase de hipertrofia. Finalmente, um programa de morte celular é acionado, resultando em uma matriz celular cartilaginosa com “moldes”, correspondentes aos espaços antes preenchidos por condrócitos (Kiefer, 2007). Em passos seguintes do desenvolvimento esquelético, essas lacunas são colonizadas por progenitores de osteoblastos, que utilizam a matriz extracelular cartilaginosa como um guia para a deposição da matriz óssea.

Cada uma dessas etapas de diferenciação celular é marcada pela expressão de genes distintos, assim como pela secreção de diferentes componentes da matriz extracelular. Nesse contexto, o SOX9 é o primeiro fator de transcrição a atuar na condrogênese (Long e Ornitz, 2013), com marcada expressão desde os osteocondroprogenitores até a fase de hipertrofia. Em camundongos, o *Sox9* começa a ser expresso – entre outros tecidos – em futuras

estruturas ósseas entre 10 dias pós-coito (dpc) e 13,5 dpc (Wright *et al.*, 1995). Em culturas de brotos de membros em que *Sox9* foi nocauteado (*Sox9*^{-/-}), observa-se que as células mesenquimais não sobrevivem até a diferenciação em condrócitos e são eliminadas por apoptose, resultando em embriões inviáveis com condrodysplasia severa e generalizada (Akiyama *et al.*, 2002). A proteína SOX9 é capaz de garantir a diferenciação de células precursoras em condrócitos por dois mecanismos principais: (i) ativação de genes promotores de cartilagem, e (ii) inibição de genes promotores do desenvolvimento osteoblástico, como o *RUNX2* e a *β-catenin* (Kiefer, 2007).

1.4.4.2 – Genes alvo do SOX9 na condrogênese

O principal componente da matriz extracelular cartilaginosa (cerca de 60%) é o colágeno tipo do II, formado por trimeros de colágeno α1(II). Consistente com seu papel central na condrogênese, o gene do colágeno tipo II (*COL2A1*) é um dos principais alvos transcricionais da SOX9 (Ng *et al.*, 1997). SOX9 é capaz de se ligar à sequência de nucleotídeos consenso SOX/SRY AACAAAT presente em um “enhancer” no primeiro íntron do *COL2A1* e promover sua expressão (Bell *et al.*, 1997). Outros tipos de colágeno característicos da matriz de cartilagem, como os colágenos tipos IX e XI (*COL9A2* e *COL11A2*) também têm sua expressão direcionada por homodímeros da SOX9 que se associam a sequências regulatórias específicas (Bernard, 2003). *COL27A1* (colágeno tipo XXVII), *ACAN* (agrecan), *MATN1* (matrilina 1), *COMP* (proteína oligomérica de matriz cartilaginosa), *S100A1* e *S100B* (proteínas S100 de ligação ao cálcio A1 e B, respectivamente) são também genes importantes para a indução do fenótipo condrocítico e cujas expressões são SOX9-dependentes (Saito *et al.*, 2007; Pritchett *et al.*, 2011). Adicionalmente, a SOX9 é necessária para a expressão do *SOX5* e *SOX6*, dois genes ativos desde o início da condrogênese (Akiyama *et al.*, 2002) e que, coletivamente, são conhecidos como o trio SOX de regulação da maturação da cartilagem. Pertencentes ao subgrupo SOXD, as proteínas L-SOX5 (variante longa de *SOX5*) e *SOX6* apresentam a capacidade de se homo- e/ou heterodimerizar, ligando-se a sequências HMG-específicas no DNA. Nesse

sentido, é possível que L-SOX5 e SOX6 facilitem a ligação da SOX9 a genes alvo, atuando como promotores de mudanças conformacionais locais na estrutura do material genético (Kiefer, 2007) (Figura 3).

Como mencionado anteriormente, a inibição de genes promotores da diferenciação de osteoblastos durante os estágios iniciais da condrogênese também é uma função importante da SOX9 para o correto desenvolvimento do processo de ossificação endocondral. A SOX9 é capaz de exercer essa atividade principalmente pela inibição do RUNX2, fator de transcrição central do programa gênico de maturação de células ósseas. Nesse sentido, o domínio HMG da SOX9 interage fisicamente com a RUNX2, reduzindo sua capacidade de ligar a seus elementos *cis*-responsivos (Zhou *et al.*, 2006), e o direcionando a uma via de degradação lisossomal dependente de fosforilação (Cheng e Genever, 2010).

Em camundongos, verificou-se ainda que a Sox9 ativa a expressão de *Bapx1* (também conhecido como *Nkx3.2*, outro gene codificante de um fator de transcrição relevante na formação do sistema esquelético) resultando na inibição da transcrição de *Runx2* por um complexo proteico organizado por Bapx1 (Yamashita *et al.*, 2009). Modelos nocaute para *Bapx1* reforçaram essa hipótese, já que, na ausência de expressão desse gene, observou-se aumento da atividade de Runx2 e de colágeno tipo X (Col10a1, um dos principais marcadores da osteogênese). SOX9 consegue ainda inibir a transcrição do colágeno tipo I (COL1A1), outra proteína estrutural majoritária no tecido ósseo plenamente desenvolvido (Tew *et al.*, 2007).

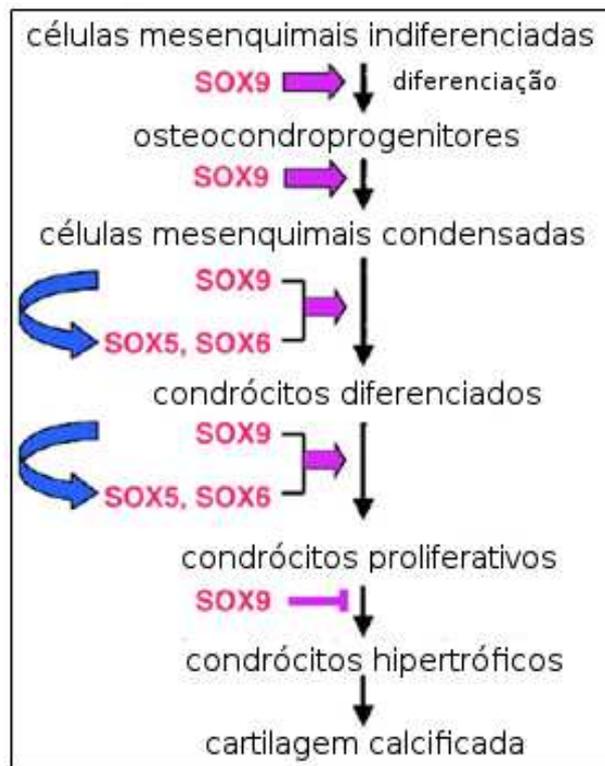


Figura 3: Papel do fator de transcrição SOX9 na determinação da linhagem condrocítica. A SOX9 garante o direcionamento inicial de células mesenquimais indiferenciadas ao desenvolvimento de progenitores osteocondrais. Em passos seguintes da diferenciação, as proteínas SOX5 e SOX6 auxiliam na estabilização e ativação da SOX9. Finalmente, a SOX9 inibe a passagem de condrócitos em proliferação para a condição de hipertrofia e calcificação, garantindo que o tecido adquira um número adequado de células antes do processo de ossificação ser iniciado. Fonte: (Akiyama *et al.*, 2002).

Além dos alvos transcricionais correspondentes a proteínas, recentemente se tem investigado o papel da SOX9 na indução de micro RNAs (miRNAs). Esses pequenos RNAs não-codificantes têm a capacidade de regular a expressão gênica através da degradação de um RNA mensageiro (mRNA) alvo e/ou da repressão da tradução do mRNA por interação com nucleotídeos da sequência 3' não-traduzida do mRNA (Nakamura *et al.*, 2012). A ativação de pelo menos dois miRNAs já foi identificada como sendo SOX9-dependente: *miR-140* (Nakamura *et al.*, 2012) e *miR-675* (Dudek *et al.*, 2010). Ambos são fortemente expressos na cartilagem em desenvolvimento e parecem auxiliar na regulação de genes centrais da maturação condrocítica, como observado na correlação positiva entre *miR-675* e os níveis de COL2A1 (Nakamura *et al.*, 2012).

Por outro lado, a cessação da atividade da SOX9 em estágios finais da maturação condrocítica é fundamental para que os moldes endocondrais de cartilagem sejam substituídos por células ósseas (Long e Ornitz, 2013) (ver Figura 3). Um dos estudos mais relevantes a abordar esse ponto mostrou, em camundongos, que a expressão indevidada do *Sox9* pode levar quase à ausência de medula óssea nos animais, com invasão vascular extremamente retardada (Hattori *et al.*, 2010). Condicionando-se a expressão do *Sox9* ao promotor de *Col10a1* (de modo a induzir a expressão tardia do *Sox9*), os autores verificaram uma alta atividade da *Sox9* em condrócitos hipertróficos; mais do que isso, foi possível mostrar que a *Sox9* é capaz de inibir a expressão do *Vegfa*, um gene essencial para a promoção da invasão vascular, formação da medula óssea e finalização do processo de ossificação endocondral.

1.4.4.3 – Regulação transcricional do SOX9 na condrogênese

Uma vez que a SOX9 influencia a expressão de inúmeros genes da via de ossificação endocondral, não parece surpresa haver tantas descrições de mecanismos moleculares que regulam a atividade desse fator de transcrição (Long e Ornitz, 2013). Durante sua transcrição, o SOX9 sofre ação de diferentes sistemas reguladores do desenvolvimento embrionário, garantindo sua correta expressão tanto espacial- como temporalmente.

Um dos grandes grupos de proteínas que regulam o *SOX9* é aquele correspondente às proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). BMPs são membros da superfamília do fator de crescimento tumoral β (TGF β), essenciais para a formação e manutenção de condensações mesenquimais condrogênicas. Comumente, os BMPs ligam-se a heterodímeros de receptores específicos e ativam, por fosforilação, duas vias principais de sinalização intracelular: (i) a via das SMADs (pequenas proteínas de interação nuclear), e (ii) a via das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) (Pan *et al.*, 2008). Em ambos os casos, a ativação de componentes dessas rotas resulta no desencadeamento de programas gênicos específicos da condrogênese. Nesse contexto, estudos *in vitro* mostraram que BMP-2 parece ser capaz de se associar à região promotora do *SOX9* e regular diretamente – e, indiretamente, via SMADs e a proteína quinase P38 – sua expressão (Pan *et al.*, 2008). A estimulação direta pelo TGF β também é necessária para a diferenciação dos condrócitos a partir de células-tronco mesenquimais. Nessa via, o *SOX9* pode sofrer ação da proteína histona acetiltransferase P300, que possivelmente propicia a formação de um arcabouço molecular para a ligação de outros fatores de transcrição e/ou modula a estrutura local da cromatina, facilitando o acesso de outros fatores ao *locus* do *SOX9* (Furumatsu *et al.*, 2009).

Os fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) e seus receptores de superfície celular (FGFRs) também exercem papel fundamental na regulação da expressão do *SOX9*. Os FGFs atuam na condrogênese principalmente por antagonismo à sinalização dos BMPs, o que resulta em um balanço entre essas duas vias para o correto desenvolvimento da cartilagem (Long e Ornitz, 2013). FGF1 e FGF2 são expressos em condrócitos diferenciados e ativam vias de sinalização de MAPKs através da ligação aos receptores FGFR1 a 4, sendo o FGFR1 o receptor predominantemente expresso no mesênquima dos membros até o estágio de hipertrofia dos condrócitos (Murakami *et al.* 2000a). O FGFR2 e 4 também são localizados em primórdios de cartilagem, enquanto FGFR3 é restrito às áreas de repouso e de proliferação da cartilagem. A importância da sinalização via FGFs na condrogênese se torna evidente pelo grande número de displasias esqueléticas resultantes de mutações principalmente em *FGFR3*, como é o caso

das displasias tanatofóricas I e II e da acondroplasia (Warman *et al.*, 2011). A exposição de linhagens celulares pré-condrocíticas e mesenquimais a certos FGFs é capaz de estimular a expressão de *SOX9* e, conseqüentemente, promover a deposição de matriz extracelular composta de colágeno do tipo II (Murakami *et al.* 2000a).

Citocinas, como a interleucina 1 (IL-1), e o fator de necrose tumoral α (TNF α) também participam das etapas de diferenciação mesenquimal do tecido ósseo-cartilaginoso. Nesse caso, essas moléculas são conhecidas inibidoras do desenvolvimento de condrócitos que estimulam a síntese de enzimas proteolíticas e a ativação da via de sinalização do fator nuclear κ B (NF κ B) (Murakami *et al.* 2000b). NF κ B é um fator de transcrição composto de homo- ou heterodímeros de subunidades de ligação ao DNA. Dentre as subunidades mais bem estudadas estão a P50 e a P65. Em sua forma ativada, NF κ B é translocado para o núcleo e regula a transcrição de genes alvo. Utilizando essa estratégia de sinalização, IL-1 e TNF α são capazes de inibir a expressão do *SOX9*, ainda que os detalhes do mecanismo de ação do NF κ B sobre o gene não sejam bem compreendidos (Murakami *et al.* 2000b). Consistentes com a enorme complexidade das redes regulatórias eucarióticas, muitas outras moléculas já foram implicadas na modulação da condrogênese. Assim, grandes vias de sinalização atuantes no desenvolvimento embrionário, como as rotas WNT/ β -catenina e NOTCH, também estão associadas à aquisição do fenótipo condrocítico via interações com o *SOX9* (Long e Ornitz, 2013).

Mais recentemente, tem-se descoberto elementos regulatórios não-codificantes que podem estar envolvidos na expressão do *SOX9*. Um dos casos mais bem evidenciados é o de miR-145, um miRNA capaz de se ligar a uma sequência especial a jusante da região codificadora do *SOX9* e inibir sua expressão em estágios terminais da diferenciação condrocítica (Martinez-Sanchez *et al.*, 2012). Essa estratégia molecular parece ser específica do genoma humano, uma vez que o sítio de ligação de miR-145 no *SOX9* não é conservado em outras espécies. De modo análogo, além de inibir o *SOX9*, esse RNA não-codificante pode favorecer a expressão de marcadores de hipertrofia condrocítica, como é o caso do *MMP13* (metaloproteinase de matriz 13) e do *RUNX2*, especialmente nas

condições de hipóxia observadas na cartilagem madura (Martinez-Sanchez *et al.*, 2012).

1.4.4.4 – Regulação pós-traducional do SOX9 na condrogênese

Como fator de transcrição, o SOX9 precisa estar localizado no núcleo das células para exercer sua função de direcionar a expressão de genes alvo. Nos últimos anos, diversas linhas de evidência têm identificado mecanismos que atuam na regulação e manutenção da localização subcelular da SOX9. Uma das propostas pioneiras é a de que co-ativadores de transcrição, como o CBP (“cAMP response element binding protein”) e o P300, possam manter a SOX9 restringida ao núcleo (Tsuda *et al.*, 2003). Nesse sentido, a porção C-terminal da SOX9 é capaz de interagir com P300 e CBP, ocasionando um aumento da atividade transcricional da SOX9 sobre o promotor do *COL2A1*. Entretanto, esse estudo não conseguiu determinar uma relação causal direta entre a associação com co-ativadores e o acúmulo nuclear da SOX9 (Tsuda *et al.*, 2003; Sim *et al.*, 2008).

O direcionamento subcelular da SOX9 também parece estar associado a um equilíbrio competitivo entre duas modificações pós-traducionais bem estabelecidas: ubiquitinação e sumoilação (Sim *et al.*, 2008). Na ubiquitinação, uma via de sinalização celular conjuga pequenas cadeias polipeptídicas a proteínas, direcionando-as ao complexo de degradação proteica do proteossomo. Por outro lado, a sumoilação consiste na adição de um pequeno peptídeo chamado SUMO (“small-ubiquitin-related modifier”) a diversas proteínas, fazendo com que interações proteicas sejam alteradas e a localização subcelular da proteína alvo possa ser modulada. Diferentemente da ubiquitinação – estritamente citoplasmática e irreversível – a sumoilação é um processo reversível que pode ocorrer tanto no citoplasma quanto no núcleo (Sim *et al.*, 2008). Um dos estudos a analisar essas vias de sinalização identificou, por ensaio de duplo-híbrido em leveduras, uma interação funcional entre a SOX9 e a PIAS1 [“protein inhibitor of activated STAT-1 (signal transducer and activator of transcription)”] (Hattori *et al.*, 2006). Proteínas da família PIAS interagem com diversas proteínas nucleares, atuando como co-reguladores da transcrição, além de possuir

atividade E3 SUMO-ligase. As rotas clássicas de sumoilação são realizadas por um conjunto de ao menos três enzimas, uma SUMO-ativadora (E1), uma SUMO-conjugadora (E2) e uma SUMO-ligase (E3); nesse sentido, PIAS1 parece ter a capacidade de realizar a última etapa na adição de peptídeos SUMO a proteínas alvo (Hattori *et al.*, 2006). Dos três resíduos de lisina potencialmente alvos de sumoilação (K61, K253 e K398) identificados na SOX9, a lisina na posição 398 parece ser o aminoácido preferido para receber essa alteração. Interessantemente, K398 também é o sítio na SOX9 que mais frequentemente está sujeito a ubiquitinação (Akiyama *et al.*, 2005). Mais do que isso, a sumoilação da SOX9 no citoplasma previne sua ubiquitinação (Sim *et al.*, 2008) sugerindo um modelo de atuação em que essas duas modificações pós-traducionais competem pela regulação da atividade da SOX9: (i) estabilização proteica e aumento da atividade de transativação de genes alvo (sumoilação) e (ii) degradação proteica e consequente diminuição da atividade de transativação de genes alvo (ubiquitinação) (Hattori *et al.*, 2006).

Outra modificação pós-traducional importante é a acetilação, caracterizada pela adição de grupos acetil a resíduos de lisina por proteínas chamadas histona acetiltransferases (HATs). As proteínas mais bem caracterizadas por esse tipo de alteração são as histonas, que de maneira geral, quando acetiladas, promovem a descondensação da cromatina associada e possibilitam a ativação de genes da região genômica em questão (Hattori *et al.*, 2008). Por outro lado, a acetilação de fatores de transcrição pode levar a sua retenção nuclear e a mudanças na ativação gênica por aumento de ligação específica ao DNA alvo (Sim *et al.*, 2008). Em camundongos, identificou-se uma interação entre Sox9 e Tip60, uma HAT que acetila principalmente histonas tipo H4 e cuja haploinsuficiência tem sido associada a câncer, devido a danos ao DNA (Hattori *et al.*, 2008). Tip60 parece promover a acetilação dos mesmos resíduos de aminoácidos que sofrem sumoilação e ubiquitinação em SOX9, promovendo aumento de sua atividade de transativação. Todavia, os autores desse estudo observaram que a interação com Tip60 aumentou a atividade da Sox9 mesmo na ausência de acetilação, sugerindo que esse mecanismo de regulação possa ser mais complexo do que se imagina (Hattori *et al.*, 2008).

A SOX9 também já foi associada à regulação por fosforilação. Especificamente, evidências sugerem que um resíduo de serina na posição 181 da SOX9 é fosforilado pela proteína quinase Rho (ROCK), importante na regulação da dinâmica da actina e do formato celular (Haudenschild *et al.*, 2010). Interessantemente, a Ser181 está localizada adjacente ao sinal de importe nuclear C-terminal da SOX9 e sua fosforilação poderia contribuir com uma carga negativa para o sinal de importe nuclear, o que facilitaria a ligação da SOX9 à proteína translocadora importina- β . Desse modo, haveria um aumento da SOX9 no núcleo independente das taxas de transcrição e tradução da SOX9, o que poderia ser importante para a regulação de suas funções. Dois estímulos extracelulares podem estar implicados na promoção da fosforilação da SOX9 em condrocitos em diferenciação: exposição ao TGF- β e estimulação mecânica, que parecem ser capazes de elevar a expressão da ROCK nesses tipos celulares (Haudenschild *et al.*, 2010). Além desse mecanismo, o peptídeo relacionado ao hormônio paratireoideano (PTHrP), um dos principais fatores parácrinos expressos por condrocitos proliferativos, também pode estar envolvido na fosforilação da SOX9. O PTHrP parece promover um atraso na fase de hipertrofia condrocítica, principalmente por ativação da sinalização dependente de cAMP, aumentando a atividade da SOX9 através da fosforilação da Ser181 (Huang *et al.*, 2001).

Finalmente, tem-se descoberto nos últimos anos que a via de sinalização Wnt, importante reguladora de programas gênicos do desenvolvimento embrionário, está envolvida de forma crucial na regulação da função da SOX9. Um dos estudos pioneiros nessa área identificou uma interação física e funcional entre a SOX9 e a β -catenina, um dos principais efetores da via Wnt (Akiyama *et al.*, 2004). Os autores demonstraram um mecanismo regulatório de antagonismo entre as duas proteínas, com efeitos marcantes no desenvolvimento de células condrocíticas. De fato, tanto a expressão desproporcionalmente aumentada da Sox9, como a inativação da β -catenin, deram origem a camundongos com um fenótipo marcante de nanismo com baixa proliferação de condrocitos e atraso na fase de hipertrofia. Por outro lado, a inativação da SOX9 ou a estabilização pós-traducional da β -catenina contra degradação proteolítica também geraram

animais com condrodisplasia severa. Esses achados sugerem fortemente o estabelecimento de um balanço preciso entre as concentrações de ambas as proteínas para o correto desenvolvimento esquelético. Nesse sentido, observou-se que a SOX9 inibe a β -catenina por desfavorecer sua ativação e estimular sua degradação pelo complexo proteossomo. Contrariamente, β -catenina interage fisicamente, através de repetições polipeptídicas do tipo “armadillo”, com a porção C-terminal da SOX9, diminuindo a habilidade de transativação de genes alvo desse fator de transcrição (Akiyama *et al.*, 2004).

1.4.5 – SOX9 e o desenvolvimento sexual masculino

No desenvolvimento sexual de mamíferos, os embriões inicialmente possuem o que se denomina de gônada bipotente, que pode ser direcionada tanto à diferenciação de estruturas sexuais femininas como masculinas (Kiefer, 2007). O início do desenvolvimento testicular ocorre com a translocação da proteína SRY para o núcleo, o que causa a diferenciação das gônadas primordiais por ativação do programa celular de desenvolvimento testicular e por inibição do programa ovariano (Sim *et al.*, 2008). O gene *SRY* humano é composto de um único éxon que codifica uma proteína de 204 aminoácidos com domínios N-terminal, HMG de ligação ao DNA (79 aminoácidos) e C-terminal (Xu *et al.*, 2012). Em camundongos, a *Sry* contém um domínio C-terminal de ativação de transcrição que é necessário para o desenvolvimento masculino, mas isso não é observado no homólogo humano, sugerindo que *SRY* deve funcionar a partir de interações com co-ativadores transcrpcionais (Xu *et al.*, 2012). Contudo, poucos alvos gênicos da *SRY* já foram identificados, dificultando o estabelecimento de um modelo de programa gênico mais elaborado para a determinação sexual em mamíferos. O *SRY* é expresso pela primeira vez na sétima semana de gestação e mantém-se expresso nas gônadas até a vida adulta, o que sugere funções adicionais além daquela no desenvolvimento testicular (Sim *et al.*, 2008).

O primeiro tipo celular específico masculino a se diferenciar a partir da gônada bipotente são as células de Sertoli, que povoam os cordões testiculares. Estudos recentes identificaram que a SOX9 se comporta como um fator de

transcrição primordial e imprescindível para a formação dos testículos. Nesse sentido, caracterizou-se, em camundongos, uma associação sinérgica de Sry e Sf1 (fator esteroidogênico 1) sobre uma sequência regulatória de Sox9 (Sekido e Lovell-Badge, 2008). Os autores desse estudo demonstraram que a Sry e a Sf1 se ligam a um “enhancer” de Sox9 específico para direcionar sua expressão nas gônadas em desenvolvimento. Quando a expressão transiente de Sry cessa, após alguns dias de vida embrionária dos camundongos, Sf1 se associa à Sox9 e ambas atuam também de modo sinérgico nessa sequência do *locus* do Sox9 para continuar mantendo altos níveis de sua própria expressão (Sekido e Lovell-Badge, 2008). A SOX9 começa a ser expressa no citoplasma das células somáticas de ambos os sexos durante os estágios iniciais da embriogênese humana e de camundongos. Por volta da sétima semana de gestação (ou 11,5 dpc, em camundongos) inicia-se a diferenciação sexual, momento em que a SOX9 é translocada para o núcleo das células de Sertoli em maturação, onde é expressa no sexo masculino até a vida adulta. Contrariamente, nas gônadas femininas, a SOX9 permanece no citoplasma das células primordiais e sua expressão é rapidamente inibida, direcionando o tecido para o desenvolvimento sexual feminino (Malki *et al.*, 2005a).

De modo análogo ao que acontece na cartilagem, a SOX9 se comporta como uma orquestradora da ativação de diversos genes que especificam o fenótipo masculino nos testículos em desenvolvimento. Um dos principais genes alvo de SOX9 durante o desenvolvimento gonadal é o *AMH*, que codifica o hormônio anti-Mülleriano, uma molécula capaz de estimular a regressão dos dutos Müllerianos, estruturas características das gônadas femininas em formação (Sim *et al.*, 2008). Outro alvo testicular importante da SOX9 é o gene codificante para o fator esteroidogênico-1 (*SF1*), necessário para o desenvolvimento das células masculinas de Sertoli e de Leydig (Sim *et al.*, 2008).

Nas gônadas, a localização nuclear da SOX9 também é fundamental para o desenvolvimento sexual masculino, e diversos trabalhos têm relatado mecanismos de regulação do importe e/ou exporte nuclear desse fator de transcrição. Um dos primeiros estudos a avaliar essa questão identificou que a rota enzimática de formação de prostaglandina D sintase/ prostaglandina D2

facilita o importe da SOX9 para o núcleo de células gonadais em desenvolvimento (Malki *et al.*, 2005b). Observou-se que a prostaglandina D2 atua na estimulação da via cAMP – PKA (proteína quinase A), promovendo a fosforilação da SOX9 e facilitando sua translocação para o núcleo via importina- β . A enzima prostaglandina D sintase (PGDS) tem sua expressão elevada especificamente em gônadas masculinas e catalisa o último passo na formação da prostaglandina D2 (PGD2) (Sim *et al.*, 2008). A PGDS é, provavelmente, também regulada por SOX9, já que, pelo menos *in vitro*, a SOX9 consegue ligar no promotor de *PGDS* e ativá-lo (Malki *et al.*, 2005b). Essa observação sugere que a SOX9 pode ativar a transcrição da *PGDS* a fim de estimular a produção da PGD2, que por sua vez funciona de forma parácrina e/ou autócrina para manter altos níveis da SOX9 por mecanismos de retroalimentação (Sim *et al.*, 2008).

Adicionalmente, fatores de transcrição podem ser direcionados ao núcleo via rede de microtúbulos (Sim *et al.*, 2008). Isso também parece ser verdade para a SOX9, uma vez que estudos identificaram, em diferentes linhagens celulares e em gônadas embrionárias, uma associação entre os microtúbulos e a SOX9 presente no citoplasma (Malki *et al.*, 2005a). A ligação da SOX9 aos microtúbulos está correlacionada, ao menos em parte, ao estado hipofosforilado da SOX9, uma vez que a indução de fosforilação via PKA diminui essa interação e facilita a translocação nuclear. Desse modo, é possível que a rede celular de microtúbulos retenha a SOX9 no citoplasma até o momento certo do desenvolvimento para a determinação sexual masculina (Sim *et al.*, 2008).

Mais recentemente, modificações epigenéticas têm sido descritas na regulação do desenvolvimento sexual via SOX9. Investigações focando na WDR5, uma proteína da família de repetição WD40 com grande expressão nos testículos, se encontram nessa categoria (Xu *et al.*, 2012). A WDR5 faz parte de um complexo de metilação de lisinas na posição 4 de histonas tipo H3 e também regula o desenvolvimento de vertebrados e diferenciação osteoblástica. A WDR5 parece ser um alvo direto da SRY, e essa interação possivelmente ativa a expressão do SOX9. Nesse modelo, a SRY ligar-se-ia ao promotor de *WDR5* e ativaria sua expressão; subsequentemente, a SRY cooperaria com a WDR5 para induzir a expressão do SOX9 e reprimir a β -catenina. De acordo com esses

achados, os autores sugerem que a WDR5 deve interagir com a SRY para regular a atividade do SOX9, talvez facilitando sua expressão através de modificações locais da cromatina no *locus* do SOX9 (Xu *et al.*, 2012).

1.5 – Bases moleculares da displasia campomélica

1.5.1 – SOX9: identificação e mecanismo de mutações na região codificante do gene

As duas últimas décadas de investigação molecular na displasia campomélica têm evidenciado uma vasta gama de mutações na porção codificante do SOX9 (Tabela III), ainda que o sequenciamento de alguns poucos pacientes não revele nenhuma mutação aparente (Wagner *et al.*, 1994; Kwok *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1997). À exceção de dois casos de homozigose para mutações no SOX9 relatados na literatura (Pop *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012), todos os pacientes com displasia campomélica já identificados possuem alterações em um único alelo do gene. Como ocorre em outras doenças genéticas dominantes, a presença de mutações em ambos os alelos do SOX9 parece não ser viável. Nesse sentido, camundongos nocaute para o Sox9 em homozigose (Sox9^{-/-}) são incapazes de formar condensações mesenquimais que dão origem à cartilagem (Bi *et al.*, 1999). Os autores desse estudo mostraram que células Sox9^{-/-} são excluídas da cartilagem (ou seja, não entram no programa de diferenciação condrocítica) e não expressam genes marcadores típicos do fenótipo condrocítico, como o *Col2a1*, o *Col9a2*, o *Col11a2* (colágenos do tipo II, IX e XI, respectivamente) e o *Agc* (agrecan).

O espectro fenotípico dos pacientes portadores de displasia campomélica devido a mutações no SOX9 também é bastante amplo, de modo que o estabelecimento de relações genótipo-fenótipo é difícil e controverso (Meyer *et al.*, 1997). De fato, indivíduos com exatamente a mesma mutação podem apresentar alterações muito diferentes. Um exemplo desse fenômeno fica bastante evidente no relato de três irmãos afetados, dois meninos e uma menina, cujo pai era mosaico germinativo para uma inserção de códon de parada prematuro no SOX9

(Cameron *et al.*, 1996). Os três filhos apresentavam a mesma mutação e sinais radiológicos clássicos de displasia campomélica; contudo, os dois pacientes com cariótipo 46,XY eram discordantes para os achados sexuais: em um havia reversão sexual completa, enquanto no outro se evidenciava disgenesia gonadal sem reversão total. Esse artigo mostrou, pela primeira vez, a presença de dois fenótipos diferentes para a mesma mutação em *SOX9*, evidenciando algum grau de expressividade variável da doença (Cameron *et al.*, 1996). A reversão sexual é comum em pacientes com displasia campomélica geneticamente masculinos (46,XY), manifestando-se em cerca de 75% dos indivíduos nessa categoria (Spranger *et al.*, 2002). No gene *SRY*, quase todas as mutações que dão origem ao fenótipo feminino em pacientes 46,XY ocorrem no domínio HMG de ligação ao DNA e são caracterizadas por trocas de aminoácidos conservados (Kwok *et al.*, 1995). Para o *SOX9* esse não é o caso, visto que a reversão sexual pode ser desencadeada por mutações em praticamente todos os domínios funcionais da proteína e nos sítios aceptores e doadores de “splicing” (junções éxon/intron), independente do mecanismo mutacional (proteínas truncadas, extensões C-terminais, mutações de ponto e deleções em fase; ver Tabela III).

Tabela III: Compêndio das todas as mutações na porção codificante do gene SOX9 já identificadas em pacientes com displasia campomélica/ acampomélica publicadas na literatura.

| SOX9 - mutações por códon de parada prematura | | | | | | | | |
|---|-------------------------------------|--------------|---------|------------------------------|----------|-----------------|------------------------|------------------------------------|
| Éxon | cDNA | Proteína | Domínio | Cariótipo | Fenótipo | Sexo | Sobrevida | Referência |
| 1 | c.82G>T | p.E28Ter | | NE | CD | NE | NE | (Massardier <i>et al.</i> , 2008) |
| 1 | c.257G>A | p.W86Ter | | 46,XX | CD | F | 12 dias | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 1 | c.261_262insG | p.T87fs251* | | 46,XY,del(6) (q23.2-23.3) | CD | (M)/ {M} | Vivo aos 5 anos | (Okamoto <i>et al.</i> , 2010) |
| 1 | c.296delG | p.S99fs109* | | 46,XY | CD | F* | Vivo aos 5 anos | (Ninomiya <i>et al.</i> , 2000) |
| 1 | c.349C>T | p.Q117Ter | HMG | 46,XY | CD | F* | Vivo aos 12 anos | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 2 | c.442G>T | p.E148Ter | HMG | 46,XY | CD | F* | NE (neonatal) | (Wagner <i>et al.</i> , 1994) |
| 2 | c.442G>T | p.E148Ter | HMG | 46,XX | CD | F | 1 ano e 5 meses | (Wada <i>et al.</i> , 2009) |
| 2 | c.448G>T | p.E150Ter | HMG | 46,XX | CD | F | 2 meses | (Shotelersuk <i>et al.</i> , 2006) |
| 2 | c.583C>T | p.Q195Ter | | 46,XX | CD | F | NE | (Foster <i>et al.</i> , 1994) |
| 2 | c.600delC | p.P200fs218* | | 46,XY | CD | F* ^a | Vivo aos 8 anos | (Cost <i>et al.</i> , 2009) |
| 3 | c.714_715insA | p.T239fs250* | | 46,XX | CD | F | 1 mês | (Gentilin <i>et al.</i> , 2010) |
| 3 | c.737_738insC | p.Q246fs251* | | 46,XX | CD | F | Neonatal | (Cameron <i>et al.</i> , 1996) |
| 3 | c.737_738insC | p.Q246fs251* | | 46,XY | CD | F* | Neonatal | (Cameron <i>et al.</i> , 1996) |
| 3 | c.737_738insC | p.Q246fs251* | | 46,XY | CD | F* ^b | Neonatal | (Cameron <i>et al.</i> , 1996) |
| 3 | c.771_772ins5 | p.G257fs296* | | 46,XY | CD | F* | Natimorto (25 semanas) | (Wada <i>et al.</i> , 2009) |
| 3 | c.783_784insG | p.G263fs294* | | 46,XY | CD | F* | NE | (Foster <i>et al.</i> , 1994) |
| 3 | c.788_808del21 ou c.789_809del21 | p.G263fs502* | | 46,XX | CD | F | Aborto (16 semanas) | (Gentilin <i>et al.</i> , 2010) |
| 3 | c.820_829del10 | p.E277fs278* | | 46,XX | CD | F | 2,5 meses | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 3 | c.858_859ins4 | p.286fs294* | | 46,XY | CD | F* | NE | (Foster <i>et al.</i> , 1994) |
| 3 | c.1070_1112del43 | p.Q357fs368* | PQA | 46,XY | CD | F* | 2 dias | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 3 | c.1123C>T | p.Q375TerX | PQA | 46,XY | CD | F* | 7 semanas | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 3 | c.1198G>T | p.E400Ter | | 46,XY | CD | M | 2,5 meses | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 3 | c.1201C>T | p.Q401Ter | | 46,XY | CD | F* | NE | (Stoeva <i>et al.</i> , 2011) |
| 3 | c.1320C>G | p.Y440Ter | TA | 46,XY | CD | F* | NE (neonatal) | (Wagner <i>et al.</i> , 1994) |

SOX9 - mutações por códon de parada prematura (continuação)

| Éxon | cDNA | Proteína | Domínio | Cariótipo | Fenótipo | Sexo | Sobrevida | Referência |
|------|-----------------|------------------------|---------|-----------|----------|------|------------------|------------------------------|
| 3 | c.1320C>G | p.Y440Ter | TA | 46,XX | CD | F | Vivo aos 11 anos | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 3 | c.1320C>A | p.Y440Ter ^d | TA | 46,XY | CD | F* | 3 meses | (Pop <i>et al.</i> , 2005) |
| 3 | c.1330_1333del4 | p.443fs468* | TA | 46,XX | CD | F | Vivo aos 11 anos | (Wada <i>et al.</i> , 2009) |
| 3 | c.1372delC | p.Q458Rfs468* | TA | 46,XY | CD | M | 4 meses | (Kim <i>et al.</i> , 2011) |

SOX9 - mutações de extensões C-terminais

| Éxon | cDNA | Proteína | Domínio | Cariótipo | Fenótipo | Sexo | Sobrevida | Referência |
|------|------------------------------------|-----------------------------------|---------|-----------|----------|-----------------|---------------------|---------------------------------|
| 3 | c.888_889insC | p.P297fs577* | | 46,XX | CD | F | Vivo aos 6 anos | (Okamoto <i>et al.</i> , 2010) |
| 3 | c.984_985insG + c.1061_1069del9 | p.P328fs576* + p.P354_P356del3 | | 46,XY | CD | F* | NE (neonatal) | (Wagner <i>et al.</i> , 1994) |
| 3 | c.1095G>AT | p.A365fs586* | PQA | 46,XY | CD | F* | 4 meses | (Hsiao <i>et al.</i> , 2006) |
| 3 | c.1103_1104insA | p.Q368fs576* | PQA | 46,XY | CD | (M) | Menos de 1 dia | (Kwok <i>et al.</i> , 1995) |
| 3 | c.1103_1104insA | p.Q368fs576* | PQA | 46,XY | CD | F* | Menos de 1 dia | (Kwok <i>et al.</i> , 1995) |
| 3 | c.1216_1217ins16 | p.H406fs574* | TA | 46,XX | CD | F | Aborto (21 semanas) | (Gentilin <i>et al.</i> , 2010) |
| 3 | c.1456_1457insG | p.S484fs576* | TA | 46,XX | CD | F | 5 anos | (Giordano <i>et al.</i> , 2001) |
| 3 | c.1113_1114insG | p.E499fs576* | TA | 46,XY | CD | M | Aborto (23 semanas) | (Gentilin <i>et al.</i> , 2010) |
| 3 | c.1514_1515insC | p.T381fs576* | TA | 46,XY | ACD | F* ^b | Aborto (22 semanas) | (Bergeron <i>et al.</i> , 2009) |
| 3 | c.1519_1520ins4 | p.T507fs558* | TA | 46,XX | CD | F | Menos de 1 dia | (Kwok <i>et al.</i> , 1995) |

SOX9 - mutações de ponto

| Éxon | cDNA | Proteína | Domínio | Cariótipo | Fenótipo | Sexo | Sobrevida | Referência |
|------|----------|----------|---------|-----------|----------|-----------------|---------------------|---------------------------------|
| 1 | c.227C>A | p.A76E | Dímero | 46,XY | CD | M | Vivo aos 6 anos | (Sock <i>et al.</i> , 2003) |
| 1 | c.316A>G | p.K106E | HMG | 46,XX | CD | F | Aborto (21 semanas) | (Gentilin <i>et al.</i> , 2010) |
| 1 | c.323C>T | p.P108L | HMG | 46,XY | CD | F* | 6 meses | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 1 | c.334T>C | p.F112L | HMG | 46,XY | CD | F* ^c | Alguns dias | (Kwok <i>et al.</i> , 1995) |

SOX9 - mutações de ponto (continuação)

| Éxon | cDNA | Proteína | Domínio | Cariótipo | Fenótipo | Sexo | Sobrevida | Referência |
|------|----------|----------|---------|-----------|----------------------|----------|-----------------------|--|
| 1 | c.335T>C | p.F112S | HMG | 46,XY | CD | (M)/ {M} | Vivo aos 8 anos | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 1 | c.337A>G | p.M113V | HMG | 46,XX | ACD | F | Vivo aos 2 anos | (Staffler <i>et al.</i> , 2010) |
| 1 | c.338T>C | p.M113T | HMG | 46,XX | CD | F | 5 meses | (Wada <i>et al.</i> , 2009) |
| 1 | c.356C>T | p.A119V | HMG | 46,XX | CD | F | 12 dias | (Kwok <i>et al.</i> , 1995) |
| 1 | c.427T>C | p.W143R | HMG | 46,XY | CD | F* | 5 meses | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 2 | c.455G>C | p.R152P | HMG | 46,XX | CD | F | 2 dias | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 2 | c.455G>C | p.R152P | HMG | 46,XX | ACD | F | NE | (Friedrich <i>et al.</i> , 2000) |
| 2 | c.462C>G | p.F154L | HMG | 46,XX | CD | F | 1 dia | (Preiss <i>et al.</i> , 2001) |
| 2 | c.472G>A | p.A158T | HMG | 46,XY | CD | F* | Vivo aos 19 anos | (Preiss <i>et al.</i> , 2001) |
| 2 | c.493C>T | p.H165Y | HMG | 46,XY | CD | M | Vivo aos 10 anos | (McDowall <i>et al.</i> , 1999) |
| 2 | c.493C>T | p.H165Y | HMG | 46,XY | ACD | M | Vivo aos 22 meses | (Moog <i>et al.</i> , 2001) |
| 2 | c.494A>C | p.H165P | HMG | 46,XY | CD | {M} | Aborto (20 semanas) | (Tonni <i>et al.</i> , 2013) |
| 2 | c.495C>G | p.H165Q | HMG | 46,XY | ACD | M | Vivo aos 8 anos | (Staffler <i>et al.</i> , 2010) |
| 2 | c.506A>C | p.H169P | HMG | NE | CD | | Aborto (2º trimestre) | (Massardier <i>et al.</i> , 2008) |
| 2 | c.507C>G | p.H169Q | HMG | NE | CD/ SPS ^e | M | Vivo aos 10 anos | (Matsushita <i>et al.</i> , 2013) |
| 2 | c.509C>G | p.P170R | HMG | 46,XY | CD | M | 1 mês | (Meyer <i>et al.</i> , 1997) |
| 2 | c.509C>T | p.P170L | HMG | 46,XY | ACD | M | Vivo aos 11 anos | (Wada <i>et al.</i> , 2009) |
| 2 | c.509C>T | p.P170L | HMG | 46,XX | ACD | F | Vivo aos 10,5 anos | (Corbani <i>et al.</i> , 2011) |
| 2 | c.517A>G | p.K173E | HMG | 46,XY | ACD | (M) | Vivo aos 11 meses | (Thong <i>et al.</i> , 2000) |
| 2 | c.527C>T | p.P176L | HMG | 46,XY | ACD | F* | Aborto (33 semanas) | (Michel-Calemard <i>et al.</i> , 2004) |
| 2 | c.527C>T | p.P176L | HMG | NE | ACD | M | NE | (Gopakumar <i>et al.</i> , 2013) |

| SOX9 - mutações em sítios de "splicing" | | | | | | | | |
|---|-----------|----------|---------|-----------|----------|------|---------------|-------------------------------|
| Éxon | cDNA | Proteína | Domínio | Cariótipo | Fenótipo | Sexo | Sobrevida | Referência |
| | IVS1-2A>C | - | - | 46,XY | CD | F* | NE | (Kwok <i>et al.</i> , 1995) |
| | IVS2+1G>A | - | - | 46,XY | CD | F* | NE (neonatal) | (Wagner <i>et al.</i> , 1994) |

| SOX9 - deleções em fase | | | | | | | | |
|-------------------------|------------------|-------------------------------|---------|-----------|----------|------|-------------------|-----------------------------|
| Éxon | cDNA | Proteína | Domínio | Cariótipo | Fenótipo | Sexo | Sobrevida | Referência |
| 1 | c.196_225del30 | p.E66_E75del10 | Dímero | 46,XX | CD | F | Menos de 1 dia | (Sock <i>et al.</i> , 2003) |
| 3 | c.1047_1130del84 | p.P301_P328del28 ^d | PQA | 46,XY | ACD | F* | Vivo aos 21 meses | (Chen <i>et al.</i> , 2012) |

^aCom disgerminoma. ^bCom hermafroditismo verdadeiro. ^cPaciente caracterizado como 'intersexo'. ^dMutação em homozigose. ^eCD leve/ síndrome de patelas pequenas. M: masculino; (M): masculino com hipospádias; {M}: masculino com pênis pequeno; M*: 46,XX ADS; F: feminino; F*: 46,XY, ADS [como proposto por (Fonseca *et al.* 2013)]. ACD: displasia acampomélica; CD: displasia campomélica clássica; Dímero: domínio de dimerização; HMG: domínio de ligação ao DNA; NE: informação não especificada; PQA: domínio rico em prolinas, glutaminas e alaninas; TA: domínio de transativação.

Contudo, é interessante notar que praticamente todas as mutações de ponto identificadas em *SOX9* até hoje residem no domínio HMG. Alguns autores argumentam que a reversão sexual em indivíduos portadores de displasia campomélica pode ser um fenótipo com penetrância incompleta (Meyer *et al.*, 1997).

Uma das classes de mutações mais bem estudadas no *SOX9* é aquela das mutações de ponto que resultam em substituições de aminoácidos no domínio HMG de ligação ao DNA. Diversos trabalhos têm mostrado que alterações em resíduos conservados desse domínio acarretam em menor capacidade de interação com o material genético e, conseqüentemente, menor atividade de transativação de genes alvo. Estruturalmente, o domínio HMG compreende três α -hélices na forma de um L, com as hélices 1 e 2 formando a parte menor do L e a hélice 3 compreendendo a parte maior. Essa estrutura entra em contato com a curvatura menor do DNA através de um núcleo de aminoácidos hidrofóbicos que estabiliza a estrutura em L (Preiss *et al.*, 2001). Algumas substituições de aminoácidos abolem completamente a capacidade de ligação ao DNA, como é o caso das trocas de prolina por leucina na posição 108 (p.P108L) e triptofano por arginina na posição 143 (p.W143R) (Meyer *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria dessas alterações pontuais parece inibir parcialmente a atividade do domínio HMG, como é o caso das mutações p.F112L (fenilalanina 112 \rightarrow leucina), p.M113V (metionina 113 \rightarrow valina), p.R152P (arginina 152 \rightarrow prolina), p.F154L (fenilalanina 154 \rightarrow leucina), p.A158T (alanina 158 \rightarrow treonina), p.H165Y (histidina 165 \rightarrow tirosina), p.H165Q (histidina 165 \rightarrow glutamina) e p.P170R (prolina 170 \rightarrow arginina) (Meyer *et al.*, 1997; McDowall *et al.*, 1999; Preiss *et al.*, 2001; Staffler *et al.*, 2010). Alguns autores argumentam que mutações que resultam em proteínas com função residual levam a fenótipos mais brandos da displasia campomélica, nos quais a campomelia e a reversão sexual podem estar ausentes (Staffler *et al.*, 2010). Ao menos uma troca de aminoácido identificada em um portador de displasia campomélica, a substituição de alanina por valina na posição 119, não parece afetar a afinidade do domínio HMG pelo DNA (McDowall *et al.*, 1999). Contudo, a inibição da interação com o DNA alvo não é o único mecanismo mutacional evidenciado no domínio HMG da *SOX9*. Alterações nessa

porção do polipeptídeo podem também dificultar o trânsito da proteína entre o citoplasma e o núcleo, onde a SOX9 exerce suas funções de ativação de genes alvo. Por exemplo, a substituição de fenilalanina por treonina na posição 158 (p.F158T) faz com que SOX9 seja direcionada para o núcleo com uma eficiência duas vezes menor do que a observada para a proteína do tipo selvagem (Preiss *et al.*, 2001), de modo que a promoção de transcrição de genes alvo fica diminuída. Considerando-se esse mecanismo, um estudo associou a diminuição de importe de SOX9 promovida pela mutação p.F158T com uma menor afinidade pela via de transporte nuclear dependente da calmodulina (Argentaro *et al.*, 2003). Em outro caso, a incorporação da alanina no lugar da leucina na posição 142 da SOX9 modifica o peptídeo sinal de exporte da proteína, o que resulta na acumulação exacerbada do fator de transcrição no núcleo (Gasca *et al.*, 2002). Esse efeito tem consequências importantes, já que a localização nuclear da SOX9 em períodos críticos do desenvolvimento embrionário pode levar à mudança de programas genéticos, como a que se observa ao se inibir o exporte da Sox9 em células primordiais das gônadas em desenvolvimento de camundongos fêmeas (Gasca *et al.*, 2002). Nessas condições, a Sox9 fica constantemente presa no núcleo e, provavelmente, acaba promovendo uma ativação gênica exacerbada, que, em última instância, leva a um fenótipo de reversão sexual e masculinização das gônadas.

Na porção N-terminal da SOX9, há ainda uma pequena sequência polipeptídica localizada entre os resíduos nas posições 64 a 102 que possui a função de promover a formação de homodímeros funcionais desse fator de transcrição. Certos genes alvo, especialmente envolvidos na condrogênese, apresentam regulação transcricional quase que exclusivamente devida à interação com dímeros de SOX9. Por outro lado, estruturas monoméricas da proteína têm a capacidade de ativar a transcrição principalmente de genes envolvidos na diferenciação sexual, ainda que alguns alvos condrocíticos, como o *COL2A1*, possuam também sequências regulatórias para interação com monômeros da SOX9 (Sock *et al.*, 2003). Em um relato emblemático de 2003, reportou-se sobre um paciente com displasia campomélica portador da única mutação de ponto de troca de sentido já identificada fora do domínio HMG de

ligação ao DNA em SOX9 (Sock *et al.*, 2003). No caso desse indivíduo, foi observada uma troca de alanina por glutamato na posição 76 (p.A76E) da SOX9, localizada dentro dos limites do motivo de dimerização da proteína. Observou-se que essa mutação abolia a atividade de dimerização dependente de ligação ao DNA do fator de transcrição a genes importantes para a formação da matriz extracelular colagenosa, como o *COL9A2* (Bernard 2003), e *COL11A2* e *CD-RAP* (gene codificante da proteína derivada da cartilagem sensível a ácido retinoico) (Sock *et al.*, 2003). Interessantemente, quando se utilizou essa versão mutante p.A76E da SOX9 para testar sua habilidade de ativar a expressão do *COL2A1*, foi identificada perda apenas parcial do potencial de transativação. Os autores desse estudo argumentaram que esses achados foram devidos ao fato de que a região regulatória do *COL2A1* contém sítios de ligação tanto para dímeros como para monômeros da SOX9. Essa hipótese é corroborada por observações de que tanto a SOX9 do tipo selvagem quanto sua versão com a mutação p.A76E apresentam afinidade similar pelos promotores dos genes *AMH* e *SF1*, essenciais para o desenvolvimento testicular e que só contêm sítios de ligação para monômeros da SOX9 (Sock *et al.*, 2003; Bernard, 2003). Desse modo, apesar de as proteínas SOX9 mutantes A76E não conseguirem estabelecer homodímeros, elas são capazes de se ligar como monômeros aos promotores de certos genes. Apesar de, à primeira vista, isso parecer apenas um detalhe molecular, esse modelo de ativação de diferentes genes por dímeros e/ou monômeros ajuda a explicar o fenótipo do paciente apresentado por Sock e colaboradores: um menino de seis anos com achados esqueléticos típicos de displasia campomélica, mas sem nenhuma das alterações testiculares presentes em 75% dos pacientes com cariótipo 46,XY (Sock *et al.*, 2003).

A porção C-terminal da SOX9, compreendida entre os aminoácidos de posição 402 a 509, é essencial para a sua atividade de transativação de genes alvo (Südbeck *et al.*, 1996). Adicionalmente, parece haver um segundo motivo de aminoácidos entre os resíduos 339 a 379, denominado PQA (acrônimo para “motivo rico em prolinas, glutaminas e alaninas”), que apresenta atividade residual de controle da transcrição gênica (McDowall *et al.*, 1999). A identificação desses domínios na SOX9 esclarece, pelo menos em parte, a patogenicidade das

mutações que alteram seu domínio C-terminal. Nesse modelo, as proteínas mutantes dessa categoria possuiriam os domínios HMG de ligação ao DNA e de dimerização íntegros e, supostamente, conseguiriam formar dímeros e se associar ao material genético; entretanto, a promoção da transcrição de genes alvo estaria comprometida, a exemplo do que já foi descrito para outros fatores de transcrição, como o PAX6, o P53 e o c-MYC (Südbeck *et al.*, 1996). Nesse tipo de situação, especula-se que as mutações de códon de parada prematura na SOX9 contribuem para a determinação de um alelo de efeito nulo e para o estabelecimento de um cenário de hemizigose para esse gene. A mortalidade entre os pacientes portadores de mutações desse tipo é bastante alta, mas alguns relatos apresentam achados antagônicos. Em um desses estudos, foi apresentada uma paciente com displasia campomélica e reversão sexual completa (sexo cromossômico masculino, 46,XY) (Ninomiya *et al.*, 2000). Apesar de ser heterozigota para uma mutação que resultava em uma versão da SOX9 com apenas 21% do tamanho normal (ou seja, deleção quase completa de um alelo do SOX9), ela sobreviveu por mais de cinco anos. Esse desfecho aponta para uma possível expressividade variável da doença, já que outros pacientes com mutações potencialmente menos graves morrem no período neonatal (ver Tabela III). Alternativamente, argumenta-se que a sobrevivência prolongada de determinados pacientes que são discordantes da relação genótipo-fenótipo mais evidente possa ser devida a melhores condições de acesso a tratamentos e intervenções emergenciais; todavia, a hipótese da expressividade variável para esses casos parece ser mais coerente. Outros trabalhos fazem suposições similares a respeito da mutação p.Y440X (substituição de tirosina por um códon de parada na posição 440), a única alteração identificada no SOX9, até hoje, recorrente em indivíduos não relacionados (Wagner *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1997; Pop *et al.*, 2005). As proteínas geradas a partir dessa mutação contêm o domínio C-terminal truncado e sem os últimos 69 aminoácidos do domínio de transativação. Apesar disso, esses polipeptídios retêm alguma atividade residual de ativação de transcrição, o que tem sido correlacionado com uma maior expectativa de vida, já que o alelo mutante do SOX9 contribui, ainda que minimamente, para a atividade normal da proteína (Meyer *et al.*, 1997; Pop *et al.*,

2005). Complementarmente, um estudo avaliou a afinidade de ligação de diferentes formas truncadas da SOX9 e sugeriu que as versões mutantes poderiam exercer um efeito dominante negativo sobre a proteína tipo selvagem, competindo por sítios de ligação no genoma (Lefebvre *et al.*, 1997).

Não parece ser apenas o encurtamento da porção C-terminal da SOX9 que influencia sua atividade de transativação. De fato, mutações que alteram a fase de leitura da SOX9 e resultam em proteínas maiores do que a versão tipo selvagem (entre 50 a 80 aminoácidos acrescidos) já foram identificadas em ao menos nove pacientes (Wagner *et al.*, 1994; Kwok *et al.*, 1995; Giordano *et al.*, 2001; Hsiao *et al.*, 2006; Gentilin *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2010). Na maioria dos casos, a mutação modifica mais de dois terços da sequência normal da SOX9, claramente interferindo em suas capacidades de (i) ser transportada para o núcleo e (ii) transativar genes alvo (Meyer *et al.*, 1997). Contudo, um caso apresentado por Kwok e colaboradores merece destaque (Kwok *et al.*, 1995). Nesse paciente, foi achada uma mutação no penúltimo códon de SOX9, que modificava apenas os dois últimos resíduos da proteína e adicionava 49 aminoácidos novos após o domínio C-terminal de transativação. Apesar de deixar praticamente toda a sequência proteica intacta, essa pequena extensão C-terminal originou um fenótipo que levou a criança ao óbito logo após o nascimento.

Coletivamente, o sequenciamento do SOX9 em pacientes portadores de displasia campomélica tem revelado uma vasta diversidade de mecanismos mutacionais. Mais do que isso, alterações em praticamente qualquer posição nucleotídica do gene parecem levar às mesmas manifestações ósseas, à exceção de dois indivíduos que apresentaram sintomas mais brandos e receberam o diagnóstico de displasia acampomélica (Friedrich *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2012). Por outro lado, aparentemente não parece haver uma correlação entre a posição de mutações específicas e a sobrevida dos pacientes. Em alguns casos, indivíduos com mutações no mesmo aminoácido da SOX9 sobrevivem por períodos drasticamente diferentes. Esse parece ser o caso, por exemplo, das alterações no resíduo de prolina na posição 170: a substituição por arginina (p.P170R) pode levar à morte neonatal (Meyer *et al.*, 1997), enquanto que a troca

por leucina pode ser compatível com a vida (paciente vivo aos 11 anos no momento da publicação de seu caso) (Wada *et al.*, 2009).

1.5.2 - SOX9: identificação de mutações fora da região codificante

Desde as primeiras investigações de indivíduos com displasia campomélica, foi observado que uma parcela dos pacientes, especialmente aqueles que sobrevivem por mais tempo à doença, não possuem mutações na região codificante do SOX9 (Wagner *et al.*, 1994). A caracterização desse grupo de pacientes foi devida, principalmente, ao mapeamento de uma série de pontos de quebra em translocações que envolvem o *locus* do SOX9 no cromossomo 17. A utilização dessa estratégia em um grande número de pacientes possibilitou a confirmação da hipótese de menor letalidade na displasia campomélica sem mutações em éxons e junções éxon/íntron do SOX9. De fato, translocações que envolvem possíveis elementos regulatórios da transcrição do SOX9 são mais comuns em pacientes com a variante acampomélica, mais branda, da doença (Pfeifer *et al.*, 1999).

Alguns autores sugerem que alterações no *locus* do SOX9 possam levar a um espectro de anormalidades de severidade variável, dependendo, principalmente, da distância da alteração (translocação, deleção ou duplicação) em relação à sequência codificante do SOX9 (Jakobsen *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2009). Nesse sentido, uma translocação com ponto de quebra a 1,13 Mb a montante do SOX9 foi associada ao desenvolvimento de sequência de Pierre-Robin (PRS) isolada, uma malformação caracterizada por palato fendido, micrognatia e dificuldade respiratória neonatal devido à glossoptose (Jakobsen *et al.*, 2007). A paciente descrita por esses autores era do sexo feminino, com cariótipo 46,XX,t(2;17)(q23.3-q24.3) e apresentava crescimento e maturação sexual normais com pequenas dismorfias faciais, sem sinais de displasia campomélica. Baseando-se no conjunto de pacientes relatados na literatura com alterações nas vizinhanças genômicas do SOX9, Jakobsen *et al.* (2007) propuseram a existência de um espectro de malformações envolvendo esse *locus* compreendendo as displasias campomélica, acampomélica, variantes leves de

displasia acampomérica e PRS isolada (em ordem decrescente de severidade) (Jakobsen *et al.*, 2007). As observações relatadas por Sanchez-Castro e colaboradores vão ao encontro dessa hipótese (Sanchez-Castro *et al.*, 2013). Esses autores identificaram grandes deleções no *locus* do SOX9 localizadas a 1 Mb a montante de sua região codificante em duas famílias com PRS isolada e anormalidades cardíacas dos tipos tetralogia de Fallot e cardiopatia valvular. Tais achados corroboram a noção de que, provavelmente, existem sequências regulatórias importantes para o desenvolvimento craniofacial e cardíaco nas vizinhanças genômicas do SOX9.

Estudos mais recentes tentam caracterizar os possíveis elementos regulatórios que devem existir no chamado ‘deserto gênico’ de cerca de dois milhões de pares de bases em que se localiza o SOX9. Por exemplo, um trabalho avaliou a presença de mutações na região homóloga humana de TESCO (hTESCO; possível elemento regulatório da expressão do SOX9 em testículos de camundongos; ver seção 1.4.3 – SOX9: organização do *locus* e implicações fisiológicas e patológicas) em indivíduos com disgenesia gonadal XY (Georg *et al.*, 2010). A hipótese de trabalho dos autores era a de que mutações nessa suposta sequência regulatória da expressão do fator de transcrição SOX9 em testículos poderiam levar a fenótipos de reversão sexual isolada em indivíduos com cariótipo masculino (46,XY). Entretanto, a avaliação de 66 pacientes com essa condição não detectou quaisquer alterações em hTESCO, sugerindo que talvez possam existir outros “enhancers” para a expressão testicular do SOX9 (Georg *et al.*, 2010).

Recentemente, Xiao e colaboradores relataram um caso de anomalia do desenvolvimento sexual (ADS) em um paciente do sexo masculino com cariótipo 46,XX (Xiao *et al.*, 2013). Análises moleculares não identificaram a presença do gene determinante do fenótipo masculino SRY nesse indivíduo, mas foi detectada uma duplicação de 74 kb localizada a 510 kb a montante do SOX9. Essa mutação é similar àquelas identificadas por Benko e colaboradores em casos de ADS 46,XX (Benko *et al.*, 2011). Esses autores propuseram a existência de um ou mais elementos regulatórios da expressão do SOX9 compreendidos na região duplicada de 78 kb comum a todos os casos analisados, denominando-a de

RevSex (em alusão à reversão sexual apresentada por pacientes com variações no número de cópias dessa região). Coletivamente, esses relatos sugerem que a presença de uma cópia adicional de RevSex leva à masculinização de gônadas indiferenciadas em embriões com constituição cromossômica 46,XX.

De forma geral, os resultados aqui discutidos evidenciam a enorme complexidade dos mecanismos regulatórios da expressão coordenada do *SOX9* no desenvolvimento embrionário humano. Certamente, futuras investigações nesse campo irão desvendar muitos mecanismos adicionais pelos quais o gene *SOX9* contribui para a formação dos diferentes tecidos corporais.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral:

- Caracterizar clinicamente os casos de OCDs diagnosticados durante a gestação e atendidos no HCPA, e realizar a investigação molecular de pacientes com displasia campomélica.

2.2 – Objetivos específicos:

- Estabelecer e aplicar um protocolo de diagnóstico pré-natal das OCDs que possa servir como procedimento operacional padrão nas investigações por ultrassom durante a gestação.
- Estabelecer e aplicar um protocolo de diagnóstico pós-natal das OCDs que possa servir como procedimento operacional padrão na investigação radiológica de recém-nascidos.
- Realizar a investigação molecular dos casos identificados clínica- e radiologicamente como displasia campomélica, no âmbito da RBDE.
- Colaborar com a RBDE através do registro e diagnóstico dos casos locais.

3 – RESULTADOS

3.1 – Caracterização clínica e molecular de uma coorte brasileira de pacientes com displasia campomélica e identificação de sete novas mutações no gene SOX9.

Artigo 1: “Clinical and molecular characterization of a Brazilian cohort of campomelic dysplasia patients and identification of seven new SOX9 mutations.”

Manuscrito submetido ao periódico “American Journal of Medical
Genetics Part A”.

Clinical and Molecular Characterization of a Brazilian Cohort of Campomelic Dysplasia Patients and Identification of Seven New SOX9 Mutations.

Eduardo P. Mattos^{a,b}, Maria Teresa V. Sanseverino^{a,*}, José Antônio A. Magalhães^c, Júlio César L. Leite^a, Temis Maria Félix^a, Luiz Alberto Todeschini^c, Denise P. Cavalcanti^d, Lavinia Schüler-Faccini^{a,b}

^aMedical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^bDepartment of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^cSchool of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^dSkeletal Dysplasia Group, Medical Genetics Department, Faculty of of Medicine, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Running title: New SOX9 mutations in campomelic dysplasia.

*Corresponding author:

Maria Teresa Vieira Sanseverino

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS – Brazil | CEP 90035-903

E-mail: msanseverino@hcpa.ufrgs.br | Phone: +55 51 3359-8011 | Fax: +55 51 3359-8010

ABSTRACT

Campomelic dysplasia (CD) is an autosomal dominantly inherited skeletal abnormality belonging to the subgroup of the bent bones dysplasias. In addition to bowed lower limbs, CD typically includes disproportionate short stature, flat face, micrognathia, cleft palate, bell-shaped thorax, and club feet. Up to $\frac{3}{4}$ of 46,XY individuals may be sex-reversed.

Radiological signs comprise scapular and pubic hypoplasia, narrow iliac wings, spaced ischia and bowed femora and tibiae. Lethal CD is usually due to heterozygous mutations in *SOX9*, a major regulator of chondrocytic development. We present a detailed clinical characterization of twelve Brazilian CD patients, plus the molecular investigation of nine of these cases. Infants were either stillborn (n=2) or died shortly after birth and presented similar phenotypes. Sex-reversal was observed in one of four chromosomally male patients. Sequencing of *SOX9* revealed new heterozygous mutations in seven individuals. Six patients presented encoded mutations that result in transcriptional premature termination, while one infant had a single-nucleotide substitution at the conserved splice-site acceptor of intron 1. No clear genotype-phenotype correlations were observed. This study highlights the diversity of *SOX9* mutations leading to lethal CD and expands the group of known genetic alterations associated to this skeletal dysplasia.

KEYWORDS

campomelic dysplasia; skeletal dysplasia; osteochondrodysplasias; *SOX9*; prenatal diagnosis

INTRODUCTION

Campomelic dysplasia (CD) is an autosomal dominant condition classified among the bent bones skeletal dysplasias [Warman et al., 2011]. In addition to the shortening and bowing of the long bones of the lower limbs, hypoplasia of the scapulae, absence of ossification of the dorsal vertebral pedicles and the pattern of the hips with narrow iliac wings, spaced ischia and hypoplastic/absent pubis bones are discriminative radiological signals for diagnosis in both the prenatal life, by prenatal ultrasonographic evaluation, and the postnatal period, by radiological studies.

Clinically, CD is characterized by a disproportionally short stature, short and bowed limbs, pretibial skin dimples, club feet, hip dislocation, thoracic constriction, cleft palate, micro- and/or retrognathia, and midface hypoplasia [Maroteaux et al., 1971; Spranger et al., 2002]. Additionally, up to ¾ of karyotypically male (46,XY) patients are sex-reversed, with a phenotypically normal female external genitalia [Massardier et al., 2008]. Most infants with typical CD die shortly after birth due to respiratory arrest secondary to pulmonary hypoplasia. However, patients diagnosed with a CD variant known as acampomelic campomelic dysplasia (ACD) usually survive the neonatal period and may reach adult life without major disabilities and give rise to familial ACD cases [Lecointre et al., 2009; Gordon et al., 2009].

Here, we present twelve Brazilian CD patients diagnosed either prenatally or shortly after birth. Major clinical and radiologic findings are detailed for all cases. From nine infants for whom sequencing of *SOX9* was performed, mutations were detected in seven of them, all of which were not previously described. This work reports one of the largest cohorts of CD patients ever characterized and highlights the mutational diversity of *SOX9* mutations that contribute to lethal CD cases.

MATERIALS AND METHODS

From April, 2012 to November, 2013 clinical data from patients with a suspicion of CD were either retrospectively (patients 1-3 and 5-10) or prospectively (patients 4, 11, and 12)

referred to our Institution from different Brazilian medical genetics services and evaluated by two clinical geneticists (MTVS or DPC). Photographs, radiographs and medical records were used to characterize the findings of each patient, both clinically and radiologically. Standard growth curves were utilized to determine percentiles of birth length (BL), weight (BW), and occipitofrontal circumference (OFC).

DNA was extracted from peripheral blood and used to amplify all exons and exon-intron boundaries of *SOX9* by polymerase chain reaction (PCR) in nine patients. Attempts to obtain DNA from paraffin embedded tissues from patients 2, 3 and 10 were not successful. For patient 12 only, DNA from both parents was also obtained. Amplification products were purified by treatment with exonuclease I/ shrimp alkaline phosphatase protocol and subjected to conventional Sanger sequencing using the ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). CodonCode Aligner software version 4.2.1 demo (CodonCode Corporation) was used to align sequences and analyze electropherograms. *SOX9* reference sequences ENSG00000125398.5 (genomic) and ENSP00000245479.2 (protein) from ENSEMBL were used as wild type references. Nucleotide numbering of mutations followed the base positions of *SOX9* cDNA reference sequence CCDS_11689.1 from NCBI.

When karyotype was not available, the genotypic sex of patients was inferred from the amplification of X and Y chromosome-specific sequences in *zinc finger protein, X-linked (ZFX)* and *sex determining region Y (SRY)* genes, respectively. Primer sequences and PCR conditions are available upon request. Spliceman Web Server [Lim and Fairbrother, 2012] was used to estimate the pathogenicity of the splice-site mutation identified in patient 5. Ethical approval for this study was obtained from both the Institutional Review Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the Brazilian National Committee for Ethics in Research (project number 07044212.3.0000.5327).

RESULTS

Medical data from 12 CD patients were evaluated and the main clinical data are summarized in Table 1. Observed clinical and radiological findings are also illustrated in Figure 1. All infants displayed the typical CD phenotype, and were either stillborn or died shortly after birth. Nine phenotypically female (75%) and three male (25%) individuals were identified. Karyotype was available for six patients (50%): four chromosomally female (46,XX) and two male (46,XY) infants. One of these genetically male patients (patient 9) was sex-reversed with normal female external genitalia (Table 1). For the remaining five patients without karyotype analysis, and for whom DNA was available (patient 10 excluded), we inferred the chromosomal sex by the amplification of X and Y-specific sequences on *ZFX* and *SRY* genes, respectively. Three *SRY*-negative (*ZFX*⁺/*SRY*⁻) and two *SRY*-positive (*ZFX*⁺/*SRY*⁺) patients were identified, all in agreement with the observed external genitalia phenotypes.

Mean gestational age (GA) at birth, considering live births only, was 36.5 ± 1.9 weeks. BW tended to be within the normal range for the majority of patients (mean = $2,661.5 \pm 606.7$ g); however, as expected, BL was below the 10th percentile for all measured individuals (mean = 40.4 ± 3.0 cm). Most infants had macrocephaly, with OFCs above the 90th percentile for the GA (mean 36.8 ± 2.0 cm). Among live born infants, none survived the neonatal period (up to 3 months of life).

Shortened and bowed limbs were a consistent finding in all patients (detailed in Supplementary Table 1). Additional dysmorphic features, especially the craniofacial ones (micro/retrognathia, flat face, flat nasal bridge), were highly prevalent in this cohort. Micro/retrognathia was observed in 9 cases. Cleft palate was reported in four infants (one with complete Pierre-Robin sequence), while a high and/or arched palate was noted in two additional patients. Post-natal radiographies were obtained for all patients, which allowed us a detailed assessment of skeletal abnormalities (see Supplementary Table 2). As expected, the most consistent findings were the bowed femora and tibiae, while all but one infant also

had scapular and pubic hypoplasia. Additional pelvic findings, such as vertically oriented ilia and ischia were also highly prevalent (n=9; 75%).

DNA was available for molecular analysis for 9 patients and SOX9 putative pathogenic heterozygous mutations were found in 7 individuals, which corresponded to a mutational detection rate of 78% (Table 2). Mutations in patients 1, 4, 7, 8, 11, and 12 result in the insertion of a premature termination codon either by directly changing a functional amino acid codon for a stop codon (patients 4, 7, and 8), or by causing a shift in the translation reading frame (patients 1, 11, and 12). An A-to-G substitution was identified in the conserved 3' splice-site of intron 1 of patient 5. *In silico* analysis using the Spliceman Web Server, which ranks putative donor and acceptor splice-site mutations based on exon/intron sequence conservation among different species, predicted a pathogenic consequence for this mutation with a probability of 67%. Representative sequencing results for each patient with an identified mutation are shown in Figure 2. Because of the absence of DNA from parents in most cases, molecular confirmation of a *de novo* mutation was only possible for patient 12, although parents from all patients were phenotypically normal.

DISCUSSION

Here, we sought to characterize a large cohort of CD patients in Brazil at the clinical, radiological and molecular levels. Skeletal abnormalities, as well as specific dysmorphic features, such as micro/ retrognathia were highly prevalent in this group, which illustrates a striking degree of homogeneity among CD patients considering clinical and radiological findings. Additionally, the high lethality frequency reported for CD patients was also evidenced in our study.

Molecularly, CD has been subject of intense investigation for over 20 years, since the its original genetic linkage to human chromosome 17 [Tommerup et al., 1993] and the following characterization of SOX9 as the implicated *locus* [Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994]. These early reports were also pivotal in the initial establishment of two molecularly

distinct groups of CD/ACD patients: (i) those more severely affected individuals with typical findings of lethal CD, encoding heterozygous mutations in the coding region of *SOX9*; and (ii) those individuals with milder phenotypes, like ACD, that survive the neonatal period and often harbor pathogenic deletions in the gene desert genomic region that surrounds *SOX9* [Gordon et al., 2009]. Although *SOX9* is a small gene, spanning little over than 5 kb and three exons, a plethora of studies have characterized regulatory DNA elements, located both upstream and downstream of the gene [Gordon et al., 2009]. These observations challenge the classical definition of what constitutes a gene and attribute to *SOX9* one of the largest regulatory landscapes ever identified, similar to what has been observed for homeotic *HOX* genes [Tschopp and Duboule, 2011].

The vast majority of CD cases (as well as some ACD cases) arise from haploinsufficiency due to *de novo* mutations in the coding region of *SOX9*, a master regulator of chondrogenesis and SRY-mediated testicular development [Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994; Gordon et al., 2009]. Conversely, a greater proportion of ACD patients is characterized by genomic imbalances in the vicinity of *SOX9*, a gene-desert region that encompasses approximately 2 Mb in chromosome 19q24.3-25 [Gordon et al., 2009]. DNA sequences both upstream and downstream of *SOX9* have been characterized as enhancers that regulate its expression both temporal and tissue-specifically [Bagheri-Fam et al., 2006]. For instance, cumulative evidence has suggested that a 78 kb genomic region upstream of *SOX9* seems to play a role in testicular expression, given that deletion of this putative regulatory element has been observed in some 46,XY sex-reversed individuals [Pop et al., 2004]. Likewise, isolated Pierre-Robin [Fukami et al., 2012], brachydactyly-anonychia [Kurth et al., 2009], and congenital heart defects [Sanchez-Castro et al., 2013] have already been linked to pathological copy number variations of putative regulators of *SOX9* expression in this chromosomal region.

Different studies have tried to establish genotype-phenotype correlations in CD/ACD, but these have mostly remained elusive [Wagner et al., 1994; Meyer et al., 1997; Ninomiya

et al., 2000; Pop et al., 2005]. The only well-established exception is the observation that mutations outside the open reading frame (ORF) of *SOX9* usually lead to milder phenotypes, such as ACD [Gordon et al., 2009]. Mutations in the ORF of *SOX9* appear to display a great degree of variable expressivity, as exemplified by familial cases in which affected siblings present with markedly distinct phenotypes [Cameron et al., 1996]. Moreover, it has been demonstrated that patients with the same *SOX9* mutation may develop CD or ACD, as well as different degrees of sexual development disorders, or even stark differences in survival [Wagner et al., 1994; Meyer et al., 1997; McDowall et al., 1999; Friedrich et al., 2000; Moog et al., 2001; Wada et al., 2009].

As expected, given the poor prognosis of all patients reported here, we were able to identify different heterozygous mutations in the coding region of *SOX9* in seven infants. Not differently from others [Wagner et al., 1994; Meyer et al., 1997; Kwok et al., 1995], a portion of our screened patients (2/9) did not encode any visible alteration in the coding region of *SOX9*. Of course, given the limitations of conventional Sanger sequencing, a heterozygous deletion encompassing the whole gene or at least some portions of *SOX9* in these individuals cannot be overruled. Alternatively, although less common, these patients may have deletions of other regulatory elements in the vicinity of *SOX9* that could be evidenced by array comparative genomic hybridization techniques. These hypotheses shall be further investigated for patients 6 and 9.

As changes in *SOX9* associated with CD are in its vast majority private mutations, the alterations identified here expand the spectrum of *SOX9* pathogenic variations to about 70 (Supplementary Table 3). Mechanistically, *SOX9* mutations can be largely divided in 5 distinct groups: (i) insertion of premature termination codons (PTCs), (ii) C-terminal extensions (CTEs), (iii) missense mutations, (iv) in-phase deletions, and (v) splice-site mutations. PTCs are the most prevalent mutational class in CD, comprising approximately 45% of all alterations identified. Consistently, among the nine patients screened for *SOX9* mutations, six (67%) had PTC mutations. In these cases, non-sense mediated mRNA decay

(NMD) is potentially employed to prevent translation of truncated peptides [Chang et al., 2007]. Even if expression from the mutated alleles escaped NMD, these would generate SOX9 proteins lacking all or at least some of the essential domains for proper protein activity, as illustrated in Supplementary Figure 1. Since truncated SOX9 polypeptides were demonstrated to retain some residual activity [Cameron et al., 1996], different authors have associated larger protein truncations with greater life expectancy of CD patients [Meyer et al., 1997; Pop et al., 2005]. In this cohort, patient 1 would, theoretically, retain the largest portion of SOX9, with approximately 54% of the wild type peptide. However, this observation did not translate in less severity, since we did not identify any correlation between the identified mutations and survival of patients. Several reports of CD patients in which a PTC was found reinforce this notion; for instance, Ninomiya and colleagues (2000) identified a sex-reversed CD patient with a heterozygous mutation predicted to encode a polypeptide with only 21% of the normal protein length [Ninomiya et al., 2000]. Although having virtually no activity from the mutant allele, this infant survived for more than five years, suggesting that the distinct phenotypes of CD patients result from some degree of variable expressivity [Wagner et al., 1994; Meyer et al., 1997; Ninomiya et al., 2000; Pop et al., 2005]. Alternatively, larger truncated versions of SOX9 could be more deleterious to its global activity, given the demonstration that these polypeptides could exert a dominant negative effect over the wild type sequences, competing for DNA binding sites [Lefebvre et al., 1997].

The splice-site mutation observed in patient 5 changes the adenine at nucleotide position -2 from the acceptor splice-site of intron 1 to a guanine residue (IVS1-2A>G), which was predicted *in silico* to affect splicing with a probability of 67%. This type of mutation is very rarely identified in *SOX9* and accounts for approximately only 4% of CD mutations reported to date (see Supplementary Table 3). Kwok *et al.* (1995) identified an A-to-C substitution at the same nucleotide position -2 in a female infant with typical CD findings and 46,XY karyotype [Kwok et al., 1995]. Our patient also had normal female external genitalia; however, the karyotype evidenced a 46,XX chromosomal constitution.

Interestingly, while many studies report mutations in the coding sequence of SOX9 in 46,XY sex-reversed CD individuals, we did not identify any nucleotide alteration in patient 9, the only case presenting sex-reversal. Although missense mutations in the HMG domain of SOX9 are the second most common type of alteration observed in its coding region, 46,XY sex-reversed CD patients were observed to encode mutations of any of the mutational classes already described (see Supplementary Table 3). Some researchers argue that sex reversal may be a phenotype with incomplete penetrance [Meyer et al., 1997], but this proposition needs further support.

In summary, we presented a comprehensive clinical characterization of twelve Brazilian CD patients. Moreover, for nine patients DNA was available and sequencing of exons and exon/intron junctions SOX9 identified seven distinct mutations not previously reported elsewhere, to the best of our knowledge. Clinical and radiological findings were very consistent among patients, as well as the short survival after birth for the live born infants. SOX9 sequencing in CD/ACD patients has revealed a vast diversity of mutations that may lead to disease due to different mechanisms. Further investigations on the molecular basis of CD and related disorders are likely to contribute to a better understanding of the physiological roles of SOX9, a key transcription factor in the early embryonic development of several tissues.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the patients and their families for participating in this study. The technical assistance of Dr. Sandra Leistner Segal (Medical Genetics Service, HCPA) for *ZFX/SRY* genotyping is greatly appreciated. Financial support was partially provided by the Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (grant 12-0467 to EPM, MTVS and LS-F) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grants 402008/2010-3 and 590148/2011-7 to DPC).

REFERENCES

- [1] Bagheri-Fam S, Barrionuevo F, Dohrmann U, Günther T, Schüle R, Kemler R, Mallo M, Kanzler B, Scherer G. 2006. Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal Sox9 expression pattern. *Dev Biol* 291:382–397.
- [2] Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, Kwok C, Goodwin LL, Sillence DO, Sinclair AH. 1996. A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum Mol Genet* 5:1625–1630.
- [3] Chang Y-F, Imam JS, Wilkinson MF. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76:51–74.
- [4] Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525–530.
- [5] Friedrich U, Schaefer E, Meinecke P, Scherer G. 2000. SOX9 mutation in a previously published case of campomelic dysplasia without overt campomelia. *Clin Dysmorphol* 9:233.
- [6] Fukami M, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T. 2012. Complex genomic rearrangement in the SOX9 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A* 158A:1529–1534.
- [7] Gordon CT, Tan TY, Benko S, Fitzpatrick D, Lyonnet S, Farlie PG. 2009. Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease. *J Med Genet* 46:649–656.
- [8] Kurth I, Klopocki E, Stricker S, van Oosterwijk J, Vanek S, Altmann J, Santos HG, van Harssel JJT, de Ravel T, Wilkie AOM, Gal A, Mundlos S. 2009. Duplications of noncoding elements 5' of SOX9 are associated with brachydactyly-anonychia. *Nat Genet* 41:862–863.
- [9] Kwok C, Weller PA, Guioli S, Foster JW, Mansour S, Zuffardi O, Punnett HH, Dominguez-Steglich MA, Brook JD, Young ID. 1995. Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am J Hum Genet* 57:1028–1036.
- [10] Lecointre C, Pichon O, Hamel A, Heloury Y, Michel-Calemard L, Morel Y, David A, Le Caignec C. 2009. Familial acampomelic form of campomelic dysplasia caused by a 960 kb deletion upstream of SOX9. *Am J Med Genet A* 149A:1183–1189.
- [11] Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17:2336–2346.
- [12] Lim KH, Fairbrother WG. 2012. Spliceman—a computational web server that predicts sequence variations in pre-mRNA splicing. *Bioinformatics* 28:1031–1032.
- [13] Maroteaux P, Spranger J, Opitz JM, Kucera J, Lowry RB, Schimke RN, Kagan SM. 1971. [The campomelic syndrome]. *Presse Med* 79:1157–1162.
- [14] Massardier J, Roth P, Michel-Calemard L, Rudigoz RC, Bouvier R, Dijoud F, Arnould P, Combourieu D, Gaucherand P. 2008. Campomelic dysplasia:

- echographic suspicion in the first trimester of pregnancy and final diagnosis of two cases. *Fetal Diagn Ther* 24:452–457.
- [15] McDowall S, Argentaro A, Ranganathan S, Weller P, Mertin S, Mansour S, Tolmie J, Harley V. 1999. Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J Biol Chem* 274:24023–24030.
- [16] Meyer J, Südbeck P, Held M, Wagner T, Schmitz ML, Bricarelli FD, Eggermont E, Friedrich U, Haas OA, Kobelt A, Leroy JG, Van Maldergem L, Michel E, Mitulla B, Pfeiffer RA, Schinzel A, Schmidt H, Scherer G. 1997. Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 6:91–98.
- [17] Moog U, Jansen NJ, Scherer G, Schrandt-Stumpel CT. 2001. Acampomelic campomelic syndrome. *Am J Med Genet* 104:239–245.
- [18] Ninomiya S, Yokoyama Y, Teraoka M, Mori R, Inoue C, Yamashita S, Tamai H, Funato M, Seino Y. 2000. A novel mutation (296 del G) of the SOX9 gene in a patient with campomelic syndrome and sex reversal. *Clin Genet* 58: 224–227.
- [19] Pop R, Conz C, Lindenberg KS, Blesson S, Schmalenberger B, Briault S, Pfeifer D, Scherer G. 2004. Screening of the 1 Mb SOX9 5' control region by array CGH identifies a large deletion in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal. *J Med Genet* 41:e47.
- [20] Pop R, Zaragoza MV, Gaudette M, Dohrmann U, Scherer G. 2005. A homozygous nonsense mutation in SOX9 in the dominant disorder campomelic dysplasia: a case of mitotic gene conversion. *Hum Genet* 117:43–53.
- [21] Sanchez-Castro M, Gordon CT, Petit F, Nord AS, Callier P, Andrieux J, Guérin P, Pichon O, David A, Abadie V, Bonnet D, Visel A, Pennacchio LA, Amiel J, Lyonnet S, Le Caignec C. 2013. Congenital Heart Defects in Patients with Deletions Upstream of SOX9. *Hum Mutat* 34:1628–1631.
- [22] Spranger JW, Brill PW, Poznanski A. 2002. *Bone Dysplasias - An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development*, 2e. New York: Oxford University Press. 613 p.
- [23] Tommerup N, Schempp W, Meinecke P, Pedersen S, Bolund L, Brandt C, Goodpasture C, Guldberg P, Held KR, Reinwein H. 1993. Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat. Genet.* 4:170–174.
- [24] Tschopp P, Duboule D. 2011. A genetic approach to the transcriptional regulation of Hox gene clusters. *Annu Rev Genet* 45:145–166.
- [25] Wada Y, Nishimura G, Nagai T, Sawai H, Yoshikata M, Miyagawa S, Hanita T, Sato S, Hasegawa T, Ishikawa S, Ogata T. 2009. Mutation analysis of SOX9 and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with campomelic dysplasia and acampomelic campomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* 149A:2882–2885.
- [26] Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111–1120.
- [27] Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin DL, Robertson S, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. 2011. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A* 155A:943–968.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Typical CD findings observed in the patients included in the study. A: Antero-posterior (AP) radiography of patient 3, evidencing short long bones with bowed femora and tibiae, a short thorax with eleven pairs of ribs, and hypoplastic pubic bones. B: Lateral radiography of patient 4. Bowing of the femora and tibiae, and thoracic constriction are also identifiable. C: AP radiography of patient 12. In addition to the skeletal abnormalities already described in patients 3 and 4, hypoplastic scapulae are present. D: Clinical picture of patient 4 at necropsy. A small, flat face can be observed, as well as micro- and retrognathia and cleft palate. E: Clinical picture of patient 1 at necropsy, illustrating the club feet and the pre- and post-tibial skin dimples characteristic of CD.

Figure 2: *SOX9* mutations identified in six CD patients included in the study. For each image, a fragment of the wild type allele (wt) with the corresponding codified amino acids is shown (except for C, where the junction between the first exon and intron is depicted). Altered nucleotides in the mutant allele (mt) are depicted in red. A: frame shift mutation of patient 1 due to a 1-bp deletion. B-E: Single-nucleotide change observed in patients 4, 5, 7, and 8, respectively. E: frame shift mutation in patient 11 due to a 1-bp deletion. F: frame shift mutation in patient 12 due to a 7-bp deletion.

TABLES

Table 1: Clinical characteristics of CD patients.

| Patient | Phenotypic sex | Karyotype | SRY status | Sex reversal | GA | BW(p ^a) | BL (p ^a) | OFC (p ^a) | Survival time | SOX9 Mutation |
|---------|----------------|-----------|------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| 1 | Female | NS | SRY - | No | 32 | 1260 (p10) | NS | NS | 1 day | p.Gly263fs277* |
| 2 | Male | 46,XY | NA | No ^b | 37 | 2765 (p50) | 42 (<p10) | 39.5 (>p90) | 24 days | Not screened |
| 3 | Female | 46,XX | NA | No | 37 | 2990 (p50-75) | NS | NS | NS | Not screened |
| 4 | Male | NS | SRY + | No | 23 ^c | 632 | 29 | 22.5 | NA | p.Lys151Ter |
| 5 | Female | 46,XX | NA | No | NS | 2740 (p50) | 41 (<p10) | 33 (p50) | NS | IVS1-2A>G |
| 6 | Female | NS | SRY - | No | 40 ^c | 2740 (p10-25) | 43 (<p10) | NS | NA | None |
| 7 | Male | NS | SRY + | No | 37 | 2770 (p50) | 44 (p10) | 35 (p90) | Neonatal ^d | p.Ser41Ter |
| 8 | Female | 46,XX | NA | No | 37 | 2830 (p50) | 37 (<p10) | 37 (>p90) | 11 days | p.Gln232Ter |
| 9 | Female | 46,XY | NA | Yes | NS | 3150 (p75) | 42 (<p10) | 38 (>p90) | 7 days | None |
| 10 | Female | NS | NA | NS | 36 | 2150 (p25) | 37 (<p10) | 38 (>p90) | 1 day | Not screened |
| 11 | Female | 46,XX | NA | No | 38 | 3470 (p75-90) | 43.5 (<p10) | 37 (>p90) | Neonatal ^d | p.His131fs248* |
| 12 | Female | NS | SRY - | No | 38 | 2490 (p10-25) | 37 (<p10) | 36.5 (>p90) | 82 days | p.Phe204fs218* |

^aPercentile distribution according to gestational age at birth; ^bmicropenis and marked bilateral hydrocele; ^cstillbirth; ^ddeath within first 3 months, not detailed; BL: birth length (cm); BW: birth weight (g); GA: gestational age (weeks); NA: not applicable; NS: not specified; OFC: birth occipitofrontal circumference. Patients were referred from medical institutions from Rio Grande do Sul (1-4), São Paulo (5-11), and Pernambuco (12) Federative States. Retrospective cases (n=9; 75%) corresponded to patients evaluated from years 2000 to 2011, while three patients were diagnosed prospectively.

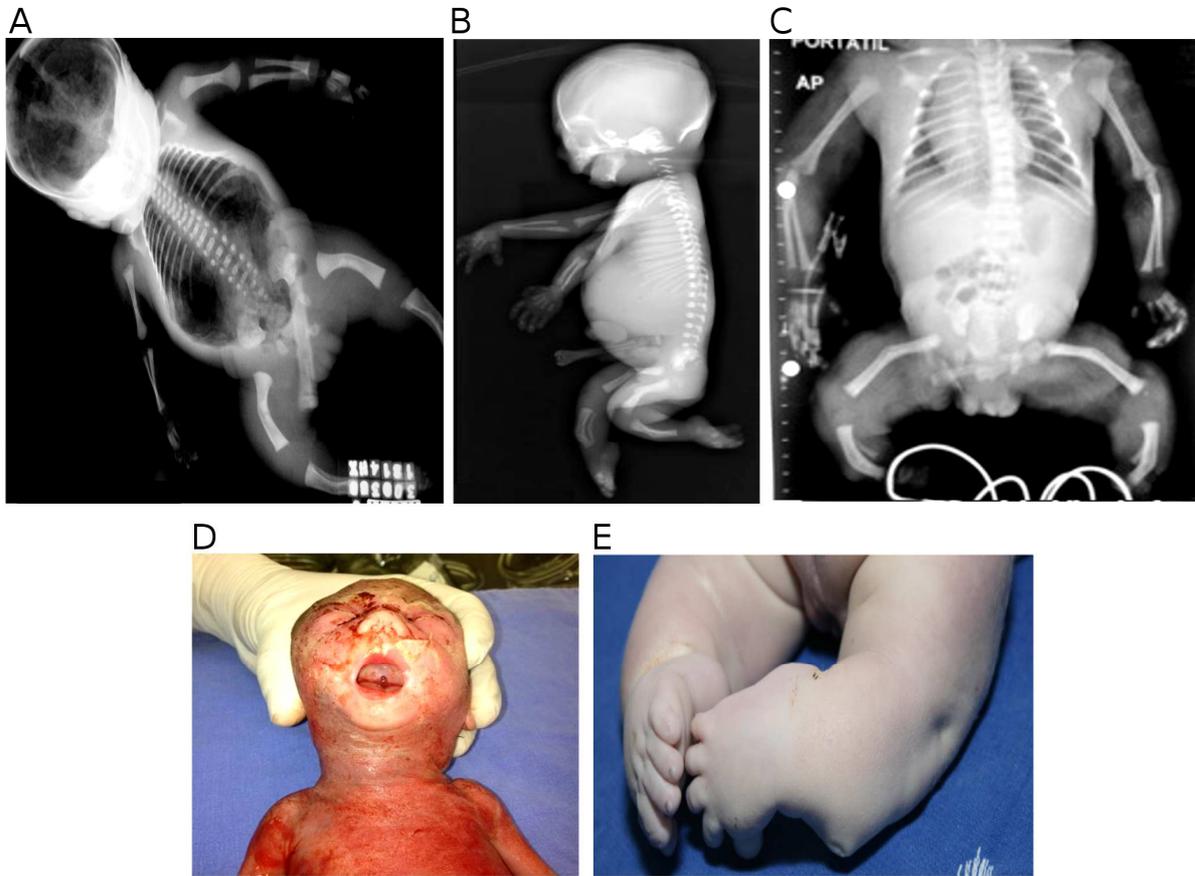
Table 2: New SOX9 mutations identified in CD patients included in the study.

| Patient | Mutation found | | |
|---------|-------------------------------|----------------|-------------|
| | cDNA | Protein | Type |
| 1 | c.(783-788)delG | p.Gly263fs277* | PTC |
| 2 | No DNA available ^a | | |
| 3 | No DNA available ^a | | |
| 4 | c.451A>T | p.Lys151Ter | PTC |
| 5 | IVS1-2A>G | - | Splice-site |
| 6 | WT | WT | - |
| 7 | c.122C>A | p.Ser41Ter | PTC |
| 8 | c.694C>T | p.Gln232Ter | PTC |
| 9 | WT | WT | - |
| 10 | No DNA available ^a | | |
| 11 | c.390del7 | p.His131fs248* | PTC |
| 12 | c.611delT | p.Phe204fs218* | PTC |

^aIn these cases, DNA extraction from paraffin-embedded tissues was attempted, but proved unsuccessful. PTC: premature termination codon; WT: wild type sequence.

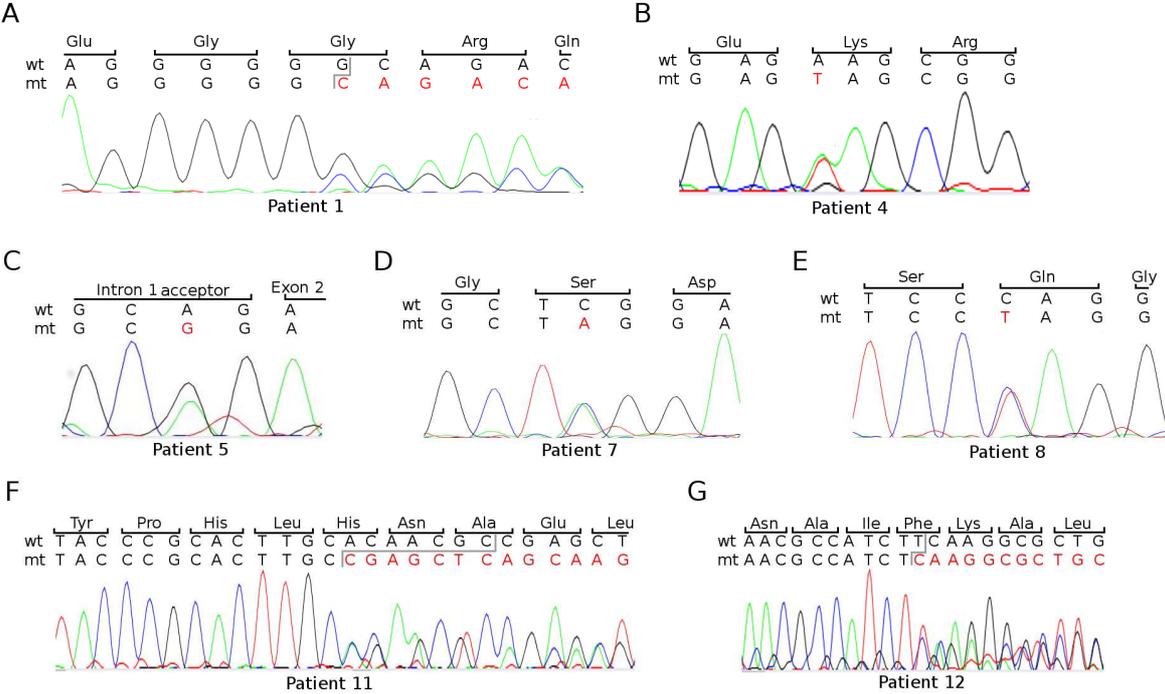
FIGURES

Figure 1



Typical CD findings observed in the patients included in the study. A: Antero-posterior (AP) radiography of patient 3, evidencing short long bones with bowed femora and tibiae, a short thorax with eleven pairs of ribs, and hypoplastic pubic bones. B: Lateral radiography of patient 4. Bowing of the femora and tibiae, and thoracic constriction are also identifiable. C: AP radiography of patient 12. In addition to the skeletal abnormalities already described in patients 3 and 4, hypoplastic scapulae are present. D: Clinical picture of patient 4 at necropsy. A small, flat face can be observed, as well as micro- and retrognathia and cleft palate. E: Clinical picture of patient 1 at necropsy, illustrating the club feet and the pre- and post-tibial skin dimples characteristic of CD.

Figure 2



SOX9 mutations identified in six CD patients included in the study. For each image, a fragment of the wild type allele (wt) with the corresponding codified amino acids is shown (except for C, where the junction between the first exon and intron is depicted). Altered nucleotides in the mutant allele (mt) are depicted in red. A: frame shift mutation of patient 1 due to a 1-bp deletion. B-E: Single-nucleotide change observed in patients 4, 5, 7, and 8, respectively. E: frame shift mutation in patient 11 due to a 1-bp deletion. F: frame shift mutation in patient 12 due to a 7-bp deletion.

Supporting information

Table S1: Clinical evaluation of CD patients included in the study.

| Clinical findings | Patients | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Prominent frontal bone | + | | | | | + | | | | | | |
| Prominent occipital bone | | | | | + | + | + | + | | + | + | |
| Flat face | | | | | | + | + | | + | + | + | + |
| Low-set ears | + | | | | | + | + | | | | | |
| Epicanthal folds | | | | | + | + | | | | | | |
| Midface hypoplasia | + | | | | | | | | + | + | | |
| Arched/high palate | | | | | + | + | | | | | | |
| Cleft palate | | | | + | | | + | + | | | + | |
| Bulbous nose | | | | | + | + | | | | | | |
| Flat nasal bridge | + | + | | + | + | | | | | | | |
| Inverted nares | + | | | | | | | + | + | | | |
| Long philtrum | | | | | + | + | + | | | | | |
| Micro/retrognathia | + | | | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Pierre-Robin sequence | | | | | | | + | | | | | |
| Short/wide neck | + | | | | | + | + | + | + | + | | |
| Excessive neck skin | | | | | + | | | | | | | + |
| Short trunk | + | | | | | | | + | | | | + |
| Wide thorax | | | | | | + | | | + | | | |
| Mammillary hypertelorism | | | | | | + | | + | + | | | |
| Inverted nipples | | | | | | + | | | + | | | |
| Dislocated hips | | + | | | | | | | | | | |
| Short limbs | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Bowing of lower limbs | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pretibial skin dimples | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Nail hypoplasia | + | | | | | | | | | | + | |
| Club feet | + | + | + | + | + | + | + | | + | + | + | |

Table S2: Radiological evaluation of CD patients included in the study.

| Radiological findings | Patients | | | | | | | | | | | |
|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Hypoplastic cervical vertebrae | | + | | | + | + | + | | | + | | |
| Hypoplastic scapulae | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Small, bell-shaped thorax with 11 pairs of ribs | + | + | + | + | | | | | | | | + |
| Hypoplastic thoracic pedicles | | + | | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Thoracic scoliosis | | | | | | | + | | | | | |
| Dislocated radial heads | | + | | | | | | | | | | |
| Short first metacarpals | | + | | | | | | | | | | |
| Short middle phalanges from fingers 2 to 5 | | + | | | | | | | | | | |
| Dislocated hips | | + | | | + | + | + | + | + | + | | + |
| Vertical, narrow iliac wings | + | + | | | + | + | + | + | + | + | + | |
| Widely spaced, vertical ischia | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | |
| Hypoplastic pubic bones | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Bowing of femora | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Bowing of tibiae | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Table S3: Compilation of all reported SOX9 mutations associated to CD and ACD.

| SOX9 – premature termination codon | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------|--------------|--------|------------------------------|-----------|-----------------|---------------------|------------|
| Exon | cDNA | Protein | Domain | Karyotype | Phenotype | Sex | Survival | Reference |
| 1 | c.82G>T | p.E28Ter | | NS | CD | NS | NS | [1] |
| 1 | c.122C>A | p.K151Ter | | SRY ⁺ | CD | M | NS [neonatal] | This study |
| 1 | c.257G>A | p.W86Ter | | 46,XX | CD | F | 12 days | [2] |
| 1 | c.261_262insG | p.T87fs251* | | 46,XY,del[6] [q23.2-23.3] | CD | {M}/ {M} | Alive at 5 yrs | [3] |
| 1 | c.296delG | p.S99fs109* | | 46,XY | CD | F* | Alive at 5 yrs | [4] |
| 1 | c.349C>T | p.Q117Ter | HMG | 46,XY | CD | F* | Alive at 12 yrs | [2] |
| 1 | c.390del7 | p.H131fs248* | HMG | 46,XX | CD | F | NS [neonatal] | This study |
| 2 | c.442G>T | p.E148Ter | HMG | 46,XY | CD | F* | NS [neonatal] | [5] |
| 2 | c.442G>T | p.E148Ter | HMG | 46,XX | CD | F | 1 yr 5 mo | [6] |
| 2 | c.448G>T | p.E150Ter | HMG | 46,XX | CD | F | 2 mo | [7] |
| 2 | c.451A>T | p.K151Ter | HMG | 46,XY | CD | {M} | 24 days | This study |
| 2 | c.583C>T | p.Q195Ter | | 46,XX | CD | F | NS | [8] |
| 2 | c.600delC | p.P200fs218* | | 46,XY | CD | F* ^a | Alive at 8 yrs | [9] |
| 2 | c.611delT | p.F204fs218* | | SRY ⁻ | CD | F | 2.5 mo | This study |
| 2 | c.694C>T | p.Gln232Ter | | 46,XX | CD | F | 11 days | This study |
| 3 | c.714_715insA | p.T239fs250* | | 46,XX | CD | F | 1 mo | [10] |
| 3 | c.737_738insC | p.Q246fs251* | | 46,XX | CD | F | Neonatal | [11] |
| 3 | c.737_738insC | p.Q246fs251* | | 46,XY | CD | F* | Neonatal | [11] |
| 3 | c.737_738insC | p.Q246fs251* | | 46,XY | CD | F* ^b | Neonatal | [11] |
| 3 | c.771_772ins5 | p.G257fs296* | | 46,XY | CD | F* | Stillbirth [25 wks] | [6] |
| 3 | c.783_784insG | p.G263fs294* | | 46,XY | CD | F* | NS | [8] |
| 3 | c.783-788delG | p.G263fs277* | | SRY ⁻ | CD | F | 1 day | This study |

SOX9 – premature termination codon [continued]

| Exon | cDNA | Protein | Domain | Karyotype | Phenotype | Sex | Survival | Reference |
|------|-------------------------------------|------------------------|--------|-----------|-----------|-----|----------------------|-----------|
| 3 | c.788_808del21 ou c.789_809del21 | p.G263fs502* | | 46,XX | CD | F | Termination [16 wks] | [10] |
| 3 | c.820_829del10 | p.E277fs278* | | 46,XX | CD | F | 2.5 mo | [2] |
| 3 | c.858_859ins4 | p.286fs294* | | 46,XY | CD | F* | NS | [8] |
| 3 | c.1070_1112del43 | p.Q357fs368* | PQA | 46,XY | CD | F* | 2 days | [2] |
| 3 | c.1123C>T | p.Q375Ter | PQA | 46,XY | CD | F* | 7 wks | [2] |
| 3 | c.1198G>T | p.E400Ter | | 46,XY | CD | M | 2.5 mo | [2] |
| 3 | c.1201C>T | p.Q401Ter | | 46,XY | CD | F* | NS | [12] |
| 3 | c.1320C>G | p.Y440Ter | TA | 46,XY | CD | F* | NS [neonatal] | [5] |
| 3 | c.1320C>G | p.Y440Ter | TA | 46,XX | CD | F | Alive at 11 yrs | [2] |
| 3 | c.1320C>A | p.Y440Ter ^d | TA | 46,XY | CD | F* | 3 mo | [13] |
| 3 | c.1330_1333del4 | p.443fs468* | TA | 46,XX | CD | F | Alive at 11 yrs | [6] |
| 3 | c.1372delC | p.Q458Rfs468* | TA | 46,XY | CD | M | 4 mo | [14] |

SOX9 – C-terminal extensions

| Exon | cDNA | Protein | Domain | Karyotype | Phenotype | Sex | Survival | Reference |
|------|------------------------------------|-----------------------------------|--------|-----------|-----------|-----------------|---------------------|-----------|
| 3 | c.888_889insC | p.P297fs577* | | 46,XX | CD | F | Alive at 6 yrs | [3] |
| 3 | c.984_985insG + c.1061_1069del9 | p.P328fs576* + p.P354_P356del3 | | 46,XY | CD | F* | NS [neonatal] | [5] |
| 3 | c.1095G>AT | p.A365fs586* | PQA | 46,XY | CD | F* | 4 mo | [15] |
| 3 | c.1103_1104insA | p.Q368fs576* | PQA | 46,XY | CD | [M] | >1 day | [16] |
| 3 | c.1103_1104insA | p.Q368fs576* | PQA | 46,XY | CD | F* | >1 day | [16] |
| 3 | c.1216_1217ins16 | p.H406fs574* | TA | 46,XX | CD | F | Terminated [21 wks] | [10] |
| 3 | c.1456_1457insG | p.S484fs576* | TA | 46,XX | CD | F | 5 yrs | [17] |
| 3 | c.1113_1114insG | p.E499fs576* | TA | 46,XY | CD | M | Terminated [23 wks] | [10] |
| 3 | c.1514_1515insC | p.T381fs576* | TA | 46,XY | ACD | F* ^b | Terminated [22 wks] | [18] |

SOX9 – C-terminal extensions [continued]

| Exon | cDNA | Protein | Domain | Karyotype | Phenotype | Sex | Survival | Reference |
|------|-----------------|--------------|--------|-----------|-----------|-----|----------|-----------|
| 3 | c.1519_1520ins4 | p.T507fs558* | TA | 46,XX | CD | F | >1 day | [16] |

SOX9 – missense mutations

| Exon | cDNA | Protein | Domain | Karyotype | Phenotype | Sex | Survival | Reference |
|------|----------|---------|--------|-----------|----------------------|-----------------|------------------------|-----------|
| 1 | c.227C>A | p.A76E | Dimer | 46,XY | CD | M | Alive at 6 yrs | [19] |
| 1 | c.316A>G | p.K106E | HMG | 46,XX | CD | F | Terminated [21 wks] | [10] |
| 1 | c.323C>T | p.P108L | HMG | 46,XY | CD | F* | 6 mo | [2] |
| 1 | c.334T>C | p.F112L | HMG | 46,XY | CD | F* ^c | Few days | [16] |
| 1 | c.335T>C | p.F112S | HMG | 46,XY | CD | {M}/ {M} | Alive at 8 yrs | [2] |
| 1 | c.337A>G | p.M113V | HMG | 46,XX | ACD | F | Alive at 2 yrs | [20] |
| 1 | c.338T>C | p.M113T | HMG | 46,XX | CD | F | 5 mo | [6] |
| 1 | c.356C>T | p.A119V | HMG | 46,XX | CD | F | 12 days | [16] |
| 1 | c.427T>C | p.W143R | HMG | 46,XY | CD | F* | 5 mo | [2] |
| 2 | c.455G>C | p.R152P | HMG | 46,XX | CD | F | 2 days | [2] |
| 2 | c.455G>C | p.R152P | HMG | 46,XX | ACD | F | NS | [21] |
| 2 | c.462C>G | p.F154L | HMG | 46,XX | CD | F | 1 day | [22] |
| 2 | c.472G>A | p.A158T | HMG | 46,XY | CD | F* | Alive at 19 yrs | [22] |
| 2 | c.493C>T | p.H165Y | HMG | 46,XY | CD | M | Alive at 10 yrs | [23] |
| 2 | c.493C>T | p.H165Y | HMG | 46,XY | ACD | M | Alive at 1.8 yrs | [24] |
| 2 | c.494A>C | p.H165P | HMG | 46,XY | CD | {M} | Terminated [20 wks] | [25] |
| 2 | c.495C>G | p.H165Q | HMG | 46,XY | ACD | M | Alive at 8 yrs | [20] |
| 2 | c.506A>C | p.H169P | HMG | NS | CD | | Terminated [2nd trim.] | [1] |
| 2 | c.507C>G | p.H169Q | HMG | NS | CD/ SPS ^e | M | Alive at 10 yrs | [26] |
| 2 | c.509C>G | p.P170R | HMG | 46,XY | CD | M | 1 mo | [2] |
| 2 | c.509C>T | p.P170L | HMG | 46,XY | ACD | M | Alive at 11 yrs | [6] |
| 2 | c.509C>T | p.P170L | HMG | 46,X | ACD | F | Alive at 10.5 yrs | [27] |

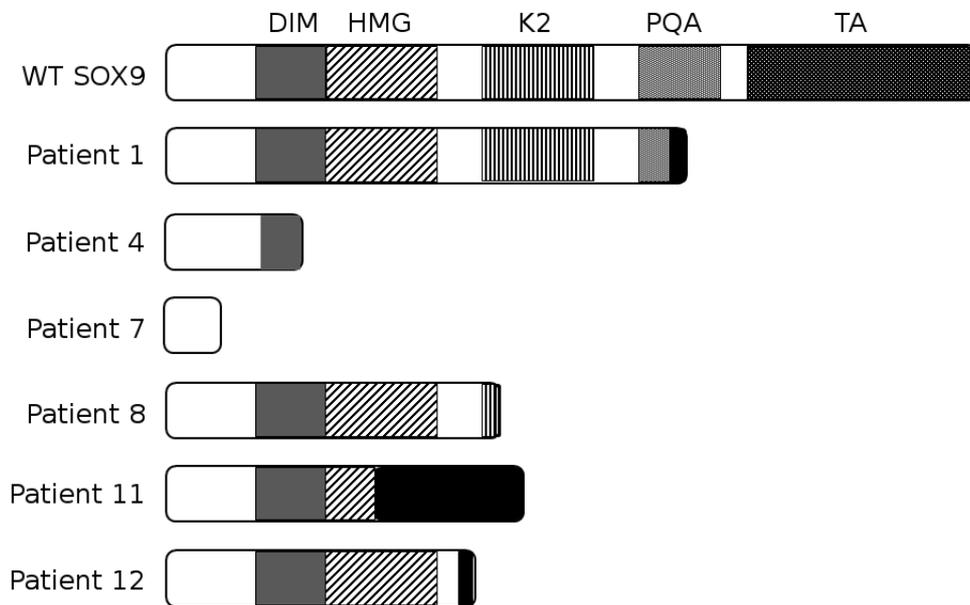
| SOX9 – missense mutations [continued] | | | | | | | | |
|--|-------------|----------------|---------------|------------------|------------------|------------|---------------------|------------------|
| Exon | cDNA | Protein | Domain | Karyotype | Phenotype | Sex | Survival | Reference |
| 2 | c.517A>G | p.K173E | HMG | 46,XY | ACD | [M] | Alive at 11 mo | [28] |
| 2 | c.527C>T | p.P176L | HMG | 46,XY | ACD | F* | Terminated [33 wks] | [29] |
| 2 | c.527C>T | p.P176L | HMG | NS | ACD | M | NS | [30] |

| SOX9 – splice-site mutations | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------------|----------------|---------------|------------------|------------------|------------|-----------------|------------------|
| Exon | cDNA | Protein | Domain | Karyotype | Phenotype | Sex | Survival | Reference |
| | IVS1-2A>C | - | - | 46,XY | CD | F* | NS | [16] |
| | IVS1-2A>G | - | - | 46,XX | CD | F | NS [neonatal] | This study |
| | IVS2+1G>A | - | - | 46,XY | CD | F* | NS [neonatal] | [5] |

| SOX9 – in-phase deletions | | | | | | | | |
|----------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------|------------------|------------------|------------|------------------|------------------|
| Exon | cDNA | Protein | Domain | Karyotype | Phenotype | Sex | Survival | Reference |
| 1 | c.196_225del30 | p.E66_E75del10 | Dimer | 46,XX | CD | F | >1 day | [19] |
| 3 | c.1047_1130del84 | p.P301_P328del28 ^d | PQA | 46,XY | ACD | F* | Alive at 1.8 yrs | [31] |

^aWith dysgerminoma. ^bWith true hermaphroditism. ^cPatient characterized as 'intersex'. ^dMutation in homozygosis. ^eMild CD/ small patella syndrome. M: male; [M]: male with hypospadias; {M}: male with small penis; M*: 46,XX sex reversal; F: female; F*: 46,XY, sex reversal, as proposed by Fonseca et al. [32]. ACD: acampomelic campomelic dysplasia; CD: campomelic dysplasia; Dimer: dimerization domain; HMG: high-mobility group DNA binding domain; NS: not specified; PQA: proline-glutamine-alanine-rich domain; TA: transactivation domain.

Figure S1



Putative SOX9 proteins resultant from the premature stop codon mutations identified in six CD patients. The wild type (WT) protein is shown as a reference, with its functional domains identified. DIM: dimerization domain; HMG: high-mobility group DNA binding domain; K2: minor transactivation domain; PQA: proline-glutamine-alanine-rich domain; TA: major transactivation domain; as proposed by Yusuf *et al.* [2012]. The final black segments depicted in patients 1, 11, and 12 denote mutant amino acids that would be incorporated in the polypeptide chains due to translational frame shift.

Supporting references

- [1] Beaulieu Bergeron M, Lemyre E, Rypens F, Scherer G, Lemieux N, Fournet J-C. 2009. Diagnosis of true hermaphroditism in a fetus with acampomelic campomelic dysplasia. *Prenat Diagn* 29:528–530.
- [2] Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, Kwok C, Goodwin LL, Sillence DO, Sinclair AH. 1996. A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum Mol Genet* 5:1625–1630.
- [3] Chen S-Y, Lin S-J, Tsai L-P, Chou Y-Y. 2012. Sex-reversed acampomelic campomelic dysplasia with a homozygous deletion mutation in SOX9 gene. *Urology* 79:908–911.
- [4] Corbani S, Chouery E, Eid B, Jalkh N, Ghoch JA, Mégarbané A. 2011. Mild Campomelic Dysplasia: Report on a Case and Review. *Mol. Syndromol.* 1:163–168.
- [5] Cost NG, Ludwig AT, Wilcox DT, Rakheja D, Steinberg SJ, Baker LA. 2009. A novel SOX9 mutation, 972delC, causes 46,XY sex-reversed campomelic dysplasia with nephrocalcinosis, urolithiasis, and dysgerminoma. *J Pediatr Surg* 44:451–454.
- [6] Fonseca ACS, Bonaldi A, Bertola DR, Kim CA, Otto PA, Vianna-Morgante AM. 2013. The clinical impact of chromosomal rearrangements with breakpoints upstream of the SOX9 gene: two novel de novo balanced translocations associated with acampomelic campomelic dysplasia. *BMC Med Genet* 14:50.
- [7] Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525–530.
- [8] Friedrich U, Schaefer E, Meinecke P, Scherer G. 2000. SOX9 mutation in a previously published case of campomelic dysplasia without overt campomelia. *Clin Dysmorphol* 9:233.
- [9] Gentilin B, Forzano F, Bedeschi MF, Rizzuti T, Faravelli F, Izzi C, Lituania M, Rodriguez-Perez C, Bondioni MP, Savoldi G, Grosso E, Botta G, Viora E, Baffico AM, Lalatta F. 2010. Phenotype of five cases of prenatally diagnosed campomelic dysplasia harboring novel mutations of the SOX9 gene. *Ultrasound Obstet Gynecol* 36:315–323.
- [10] Giordano J, Prior HM, Bamforth JS, Walter MA. 2001. Genetic study of SOX9 in a case of campomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 98:176–181.
- [11] Gopakumar H, Superti-Furga A, Unger S, Scherer G, Rajiv PK, Nampoothiri S. 2013. Acampomelic Form of Campomelic Dysplasia with SOX9 Missense Mutation. *Indian J Pediatr.*
- [12] Hsiao H-P, Tsai L-P, Chao M-C, Tseng H-I, Chang YC. 2006. Novel SOX9 gene mutation in campomelic dysplasia with autosomal sex reversal. *J Formos Med Assoc* 105:1013–1016.
- [13] Kim H-Y, Yoon CH, Kim G-H, Yoo H-W, Lee BS, Kim KS, Kim EA-R. 2011. A case of campomelic dysplasia without sex reversal. *J Korean Med Sci* 26:143–145.

- [14] Kwok C, Weller PA, Guioli S, Foster JW, Mansour S, Zuffardi O, Punnett HH, Dominguez-Steglich MA, Brook JD, Young ID. 1995. Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am J Hum Genet* 57:1028–1036.
- [15] Massardier J, Roth P, Michel-Calemard L, Rudigoz RC, Bouvier R, Dijoud F, Arnould P, Combourieu D, Gaucherand P. 2008. Campomelic dysplasia: echographic suspicion in the first trimester of pregnancy and final diagnosis of two cases. *Fetal Diagn Ther* 24:452–457.
- [16] Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Kadono I, Ishiguro N, Nishimura G. 2013. A novel SOX9 H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome. *Am J Med Genet A* 161:2528–2534.
- [17] McDowall S, Argentaro A, Ranganathan S, Weller P, Mertin S, Mansour S, Tolmie J, Harley V. 1999. Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J Biol Chem* 274: 24023–24030.
- [18] Meyer J, Südbek P, Held M, Wagner T, Schmitz ML, Bricarelli FD, Eggermont E, Friedrich U, Haas OA, Kobelt A, Leroy JG, Van Maldergem L, Michel E, Mitulla B, Pfeiffer RA, Schinzel A, Schmidt H, Scherer G. 1997. Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 6: 91–98.
- [19] Michel-Calemard L, Lesca G, Morel Y, Boggio D, Plauchu H, Attia-Sobol J. 2004. Campomelic acampomelic dysplasia presenting with increased nuchal translucency in the first trimester. *Prenat Diagn* 24:519–523.
- [20] Moog U, Jansen NJ, Scherer G, Schrandner-Stumpel CT. 2001. Acampomelic campomelic syndrome. *Am J Med Genet* 104:239–245.
- [21] Ninomiya S, Yokoyama Y, Teraoka M, Mori R, Inoue C, Yamashita S, Tamai H, Funato M, Seino Y. 2000. A novel mutation (296 del G) of the SOX9 gene in a patient with campomelic syndrome and sex reversal. *Clin Genet* 58:224–227.
- [22] Okamoto T, Nakamura E, Nagaya K, Hayashi T, Mukai T, Fujieda K. 2010. Patient reports: Two novel frameshift mutations in the SOX9 gene in two patients with campomelic dysplasia who showed long-term survival. *J Pediatr Endocrinol Metab* 23:1189–1193.
- [23] Pop R, Zaragoza MV, Gaudette M, Dohrmann U, Scherer G. 2005. A homozygous nonsense mutation in SOX9 in the dominant disorder campomelic dysplasia: a case of mitotic gene conversion. *Hum Genet* 117:43–53.
- [24] Preiss S, Argentaro A, Clayton A, John A, Jans DA, Ogata T, Nagai T, Barroso I, Schafer AJ, Harley VR. 2001. Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J Biol Chem* 276:27864–27872.
- [25] Shotelersuk V, Jaruratanasirikul S, Sinthuwat T, Janjindamai W. 2006. A novel nonsense mutation, E150X, in the SOX9 gene underlying campomelic dysplasia. *Genet Mol Biol* 29:617–620.
- [26] Sock E, Pagon RA, Keymolen K, Lissens W, Wegner M, Scherer G. 2003. Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. *Hum Mol Genet* 12:1439–1447.

- [27] Staffler A, Hammel M, Wahlbuhl M, Bidlingmaier C, Flemmer AW, Pagel P, Nicolai T, Wegner M, Holzinger A. 2010. Heterozygous SOX9 mutations allowing for residual DNA-binding and transcriptional activation lead to the acampomelic variant of campomelic dysplasia. *Hum Mutat* 31:E1436–44.
- [28] Stoeva R, Grozdanova L, Scherer G, Krasteva M, Bausch E, Krastev T, Linev A, Stefanova M. 2011. A novel SOX9 nonsense mutation, q401x, in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal. *Genet Couns* 22:49–53.
- [29] Thong MK, Scherer G, Kozlowski K, Haan E, Morris L. 2000. Acampomelic campomelic dysplasia with SOX9 mutation. *Am J Med Genet* 93:421–425.
- [30] Tonni G, Ventura A, Pattacini P, Bonasoni MP, Baffico AM. 2013. p.His165Pro: a novel SOX9 missense mutation of campomelic dysplasia. *J Obstet Gynaecol Res* 39:1085–1091.
- [31] Wada Y, Nishimura G, Nagai T, Sawai H, Yoshikata M, Miyagawa S, Hanita T, Sato S, Hasegawa T, Ishikawa S, Ogata T. 2009. Mutation analysis of SOX9 and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with campomelic dysplasia and acampomelic campomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* 149A:2882–2885.
- [32] Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111–1120.
- [33] Yusuf D, Butland, SL, Swanson MI, Bolotin E, Ticoll A, Cheung WA, Zhang XYC, Dickman CTD, Futon DL, Lim JS *et al.* 2012. The transcription factor encyclopedia. *Genome Biol* 13(3):R24.

3 – RESULTADOS

3.2 – Caracterização de displasias esqueléticas com manifestação pré-natal no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Artigo 2: “Prenatal Diagnosis of Skeletal Dysplasias in a Brazilian Tertiary Reference Center: A 20-year Follow-up and Review of the Literature.”

Manuscrito em processo de submissão ao periódico “Prenatal Diagnosis”.

TITLE PAGE

Manuscript title: Prenatal Diagnosis of Skeletal Dysplasias in a Brazilian Tertiary Reference Center: A 20-year Follow-up and Review of the Literature.

Running head: Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias.

Manuscript word, table and figure count: 2349 words (body text), 3 tables, 4 figures (+2 supplementary figures).

Authors and institutions:

Eduardo Preusser de Mattos^{1,2}, Lavinia Schüler-Faccini^{1,2,*}, José Antônio de Azevedo Magalhães³, Júlio César Loguercio Leite¹, Temis Maria Félix¹, Luis Alberto Todeschini³, Denise Pontes Cavalcanti⁴, Maria Teresa Vieira Sanseverino¹

¹Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

²Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴Skeletal Dysplasia Group, Medical Genetics Department, Faculty of Medicine, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author:

Lavinia Schüler-Faccini

Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS – Brazil

CEP 91501-970 | E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Phone: +55 51 33086722 | Fax: +55 51 33598010

Funding sources: EPM, LS-F and MTVS are supported by the research grant 12-0467 of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development.

Conflicts of interest: None declared.

What is already known about this topic?

- About 40% of skeletal dysplasias, many of which are lethal, can be recognized in the prenatal period, although the definition of specific conditions is usually difficult.
- Different studies demonstrate that skeletal dysplasias are being detected earlier in pregnancy in more recent years, due to dedicated prenatal programs.
- The correct prenatal evaluation of a skeletal dysplasia patient directly influences pregnancy management and outcome.

What does this study add?

- To the best of our knowledge, this is the first systematic retrospective evaluation of skeletal dysplasias with prenatal manifestation held at a Brazilian reference center.
- Frequencies of individual conditions are in agreement with other studies, but cases seem to be detected at later stages, which may impact pregnancy management and outcome.

- The data reported here argue in favor of better prenatal practices for the management of skeletal dysplasias in Brazil.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the status of prenatal detection of osteochondrodysplasias (OCDs) and the frequency of the individual conditions in a single Brazilian reference center.

Method: Retrospective analysis of OCD cases with prenatal manifestation detected in Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from November 1993 to November 2013. Clinical, ultrasonographic (US) and radiological data were reviewed.

Results: Thirty-three patients with prenatal evidence of an OCD were identified. Median gestational age (GA) at first US was of 12 weeks, with a mean of 3.5 examinations performed per patient. The mean GA at diagnosis was of 23.3 weeks and this remained constant during all the evaluated years. Perinatal lethality was observed for 81.8% (n=27) of patients. Final diagnoses included 12 different OCDs, of which type II osteogenesis imperfecta (24.2%, n=8), thanatophoric dysplasias (21.2%, n=7), and campomelic dysplasia (12.1%, n=4) were the most frequent. A set of only 5 genes was predicted to likely account for the majority (81.2%, n=26) of the cases here identified.

Conclusion: The late prenatal detection of OCDs observed in this study highlights the need for better access to standardized prenatal care in Brazil, aiming at the improvement in management of OCDs.

INTRODUCTION

Skeletal dysplasias, or osteochondrodysplasias (OCDs), comprise a vast and heterogeneous group of diseases that affect bone growth and/or development¹. The 2010 Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders recognizes more than 450 different conditions, many of which correspond to OCDs². Mutations implicated in OCDs are usually found in genes that code for structural or signaling components of skeletal tissues with sustained expression from organogenesis through adult life¹.

Although OCDs are individually rare, their combined frequency is relevant and contributes to the infantile morbimortality. For instance, the prevalence of OCDs has been recently estimated at 3.2 cases per 10,000 births in South America and the perinatal lethality was observed in 50% of cases⁵. Similar rates of lethality were observed by several other studies^{6,7}. In the prenatal period, it is estimated that approximately 40% of the OCDs can be recognized by a second or an early third trimester ultrasonography (US), with a high proportion of lethal cases⁸. However, the proposition of a specific diagnosis before delivery is commonly challenging^{6,7,9}.

Despite the great advances in the molecular understanding of many OCDs associated with the growing feasibility of DNA sequencing, it remains of vital importance the postnatal radiological examination by a babygram for correct assessment and specification of the final diagnosis¹⁰. Even through extensive radiographic analysis, recent multicentric studies have reported frequencies of undiagnosed patients as high as 25%^{4,5,11}.

Here we report a South-Brazilian cohort of OCD patients with prenatal evidence of bone abnormalities referred to the Fetal Medicine Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

METHODS

All presumptive cases of OCD detected during pregnancy referred to the Fetal Medicine Group of HCPA from November 1993 to November 2013 were retrospectively evaluated. Clinical data, prenatal US examinations, neonatal radiographs, and clinical photos were independently reviewed by two physicians with expertise in OCDs (MTVS and DPC). We used the diagnostic evidence levels proposed by Barbosa-Buck *et al.*⁵ to evaluate the data quality and exclude from analysis patients for whom any US description and/or good radiographic images were lacking.

Nomenclature and classification of OCDs followed the criteria proposed by the International Skeletal Dysplasia Society². The anonymous disclosure of patients' information was subjected to the ethical approval of the Institutional Review Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the Brazilian National Committee for Ethics in Research.

RESULTS

Clinical characterization

From 40 presumptive cases of shortening of long bones detected by US examination, 33 patients (84.6%) had sufficient medical records enabling the confident ascertainment of OCD phenotypes (Figure 1). Of those, for 32 patients (97.0%) a final specific diagnosis could be established based on postnatal X-rays. Diagnoses included 12 different OCDs distributed in seven nosologic groups (Table 1).

Although the majority (n=23; 69.7%) of the patients were born alive (Figure 1), perinatal lethality was observed in 81.8% of the infants (n=27). Prenatal prediction of lethality was registered on the medical records of 13 patients, all of whom were either stillborns or died within the neonatal period. For the remaining cases, there was no prediction about the prognosis (lethal or non-lethal), e.g.: there were no ultrasonographic evidences for lethality referred on the medical records. Taking into account only the 13 cases in which this information was clearly stated, the accuracy of lethality estimation for this cohort was 100% (see Figure 1). However, it is striking that 51.8% of the lethal cases (n=14) did not have any documented prenatal prediction of lethality.

The most common diagnoses were type II osteogenesis imperfecta (OI II; n=8, 24.2%), the thanatophoric dysplasias type I and II (TD; n=7, 21.2%), and campomelic dysplasia (CD; n=4, 12.1%) (Figure 2). For OI II patients, autosomal dominant inheritance was attributed to seven infants, while one case was suggestive of recessive inheritance due to family history of parental consanguinity and recurrence of a lethal condition in three previous gestations.

One male baby presented with multiple malformations and skeletal findings of overt campomelia of humeri and femora, and a short, narrow thorax with 11 pairs of ribs. At physical examination, this baby had short bowed upper and lower limbs, clinodactyly of fifth fingers and talipes equinovarus. Death occurred shortly after birth and *post-mortem* examination evidenced marked pulmonary hypoplasia, transposition of the great arteries, bilateral renal dysplasia with megaureters, enlarged bladder and urethral agenesis. The skeleton resembled the phenotype most commonly observed in campomelic dysplasia; however, the additional severe internal findings may argue in favor of a polymalformative syndrome. Unfortunately, no

biological samples were available for DNA extraction and molecular investigation of this case.

Although sample size was small and data showed great variability, there was a slight positive tendency in the number of OCD patients diagnosed per year analyzed (Figure S1), ranging from 0 up to 5 individuals detected per year. Mean maternal and paternal ages were of 27.2 ± 6.0 and 32.4 ± 7.8 years, respectively.

Prenatal screening

For most patients (60.6%, n=20) the first sign of skeletal abnormalities (namely, short limb bones) was evidenced by a second trimester ultrasonography, and the mean gestational age at the first diagnosis in this cohort was of 23.3 ± 5.5 weeks (median=23 weeks) (Figure 3). The mean gestational age at the first prenatal diagnosis of an OCD did not change consistently over the period evaluated. In fact, a very subtle increase in gestational age at diagnosis was detected in recent years (Figure S2).

Table 2 shows the reported US findings of each patient included in the study correlated to the final diagnosis. Gestational age at the first US examination was highly heterogeneous (median of 12 weeks), ranging from 5 to 26 weeks, with a high proportion of cases being first examined late in pregnancy. In fact, for seven patients (21.2%) the US suggesting a skeletal dysplasia phenotype was the first examination performed. Additionally, the mean number of US examinations performed in this cohort was of 3.5 ± 2 per patient. Despite these observations, the majority of cases had a morphologic US performed between 18 and 22 weeks of gestation (78.8%, n=26). Of note, most cases did not contain a detailed ultrasound description, neither the proposition of a specific diagnosis (for instance, decreased echogenicity and fractures in OI II).

Molecular genetics

Based on the radiographic findings of a skeletal dysplasia patient, it is often possible to infer one or a few candidate genes, which might be responsible for the phenotype. Following this rationale, 24.2% of patients were characterized as probably encoding mutations in *fibroblast growth factor receptor type 3 (FGFR3)*, corresponding to the achondroplasia and thanatophoric dysplasia infants (Figure 4). Another 21.2% of this cohort (seven patients with OI type II) is likely to encode mutations in either *COL1A1* or *COL1A2*, the genes for type I collagen chains $\alpha 1$ and $\alpha 2$, respectively. This same frequency was observed for cases predicted to encode mutations in *COL2A1* (type II collagen chain $\alpha 1$), which comprised patients with type II achondrogenesis, spondyloepiphyseal dysplasia congenita, and hypochondrogenesis. Noteworthy, almost 80% of individuals in this study group were predicted to encode mutant alleles in one of only five genes – *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *FGFR3*, and *sex determining region Y-box 9 (SOX9)*. Two patients were diagnosed with short rib-polydactyly syndrome type 1/3 (SRPS 1/3) and another one with recessively inherited OI II due to recurrence of a lethal OI phenotype (although, in this case, parental germline mosaicism cannot be excluded). In these three instances candidate gene prediction was defined as “unspecific”. While there are cases of SRPS 1/3 that are due to mutations in *DYNC2H1* (*dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1*) or *IFT80* (*intraflagellar transport 80 homolog*) genes, some cases are not linked to mutant alleles of either genes, making genetic testing for this condition less straightforward. In a similar manner, recessive OI II has been linked to mutations in at least three collagen-modifying genes. The patient left undiagnosed in our cohort was included in the category “undefined” regarding the proposition of candidate genes.

DISCUSSION

The prenatal identification of OCDs remains a challenging field of investigation. Although hundreds of individual OCDs have been described², there is a restricted set of conditions that can be recognized during the prenatal period¹¹. In our cohort, OI II and TD were the most frequent diagnoses (24.2% and 21.2%, respectively; see Table 1), which has been a constant finding in the literature since the establishment of routine fetal ultrasound screening^{11,12,13}. CD was the third most common diagnosis among the patients reported here, in agreement with the case series presented by Rasmussen *et al.*¹⁴, even though similar studies identified a higher prevalence of achondrogenesis type 2 in comparison to CD^{4,5,9,11}.

As reported by others, we could not establish a specific diagnosis to all patients included in the study; noteworthy is that the frequencies of undiagnosed skeletal dysplasias range from 0 to 25% in different studies, and larger cohorts have reported higher percentages of unresolved cases, despite medical expertise in the evaluation of skeletal dysplasias^{4,5}. These observations stress out the clinical complexity of OCDs and the need for a multidisciplinary diagnostic approach. Several reasons might account for undiagnosed OCDs; for instance, many conditions present with similar radiographic findings, usually hindering the definition of specific bone dysplasias¹⁵.

No reduction in the mean gestational age at the moment of the first prenatal diagnosis was observed in this study considering the years evaluated. Although our sample size was small for any formal statistical inference, the phenomenon of anticipation in the prenatal detection of skeletal dysplasias, as well as the improvement in diagnostic accuracy over time, has been observed by several

authors^{7,11,16}. Most of our patients (60.6%) had a skeletal dysplasia detected by a second trimester ultrasound, a figure that resembles the data reported by Krakow *et al.*¹¹. However, those researchers observed a majority of patients being diagnosed prior to 20 weeks of gestation, while we identified only 8 infants in this category, and an overall mean gestational age at the first diagnosis of an OCD of 23.3 weeks. This probably relates to the difficulties in the access to public ultrasonographic prenatal care in Brazil experienced by the majority of the population, associated to a high rate of unplanned pregnancies^{17,18}. Commonly, in the Brazilian public health system, the majority of women do not perform serial morphologic evaluations¹⁹, and there is a low proportion of women initiating prenatal care early in pregnancy^{20,21}. This finding is likely to influence the mean gestational age at the first detection of an OCD, and could be responsible for the comparatively late diagnoses reported here when compared to similar studies. Moreover, the status of our Institution as a tertiary reference center could be contributing to a selection bias towards patients with more challenging diagnoses, differently from others that evaluate the diagnostic accuracy of OCDs in primary care units¹¹.

Although it was not possible to estimate the prenatal diagnostic accuracy in our cohort, the percentage of lethal cases that were ascertained so during the prenatal period was similar to the figures reported by others^{4,6,7,22-24}. Table 3 compares these data with those found in other studies, as well as individual frequencies of the most commonly diagnosed OCDs in the prenatal period. It becomes clear that, despite clinical expertise and methodological improvement, the correct recognition of a skeletal dysplasia *in utero* is still troublesome, and should always be confirmed by a postnatal babygram. Perhaps the routine incorporation of complementary imaging modalities for undiagnosed patients, as has been proposed

for three-dimensional (3D) ultrasound²⁵ and 3D computed tomography²⁶ would improve the ability to prenatally recognize a skeletal dysplasia. However, this issue is still largely open to debate, since some authors challenge the real diagnostic contribution of such methods⁷, specially if these are to be incorporated in current public prenatal health policies.

Perinatal death was highly prevalent in our cohort, accounting for more than 80% of patients, even though the majority of infants were live born. This last finding is in contrast with studies that have detected an increasing proportion of pregnancy terminations among prenatally detected skeletal dysplasias¹⁴; however, our data might be explained by the fact that, with rare exceptions such as is the case of anencephaly, abortion is not legalized in Brazil¹⁹. In a minority of cases, legal authorization for pregnancy termination can be obtained when the prenatal identification of a congenital lethal disorder is clearly established, reinforcing the importance of an accurate diagnosis.

Concerning the prediction of causative genes for individual OCDs, although our mutational predictions were not confirmed by DNA sequencing, the radiographic evaluation of a skeletal dysplasia patient usually yields an accurate molecular hypothesis²⁷. In this way, our data are suggestive of a high prevalence of mutations in a limited set of causative genes in patients with skeletal dysplasias with prenatal onset. The fact that approximately 80% of our patients were predicted to encode mutations in one of only five candidate genes (see Figure 4) has profound relevance to the establishment of a molecular diagnosis rationale, especially if this is to be offered as a routine service in publicly funded institutions, as is our case. Of course, future determination of the accuracy of the proposed molecular diagnoses for individual skeletal dysplasias will be essential to the establishment of a cost-effective

testing strategy, for example, through next-generation sequencing panels of candidate genes.

CONCLUSION

We present a long retrospective study of a cohort of prenatally diagnosed skeletal dysplasia patients held at a single reference Brazilian center. Frequencies of the most common OCDs with prenatal manifestation were in agreement with other studies, as well as the prenatal estimation of lethality. Although not being able to estimate the accuracy of the prenatal diagnosis, this study adds to the epidemiologic characterization of skeletal dysplasias with antenatal manifestation, especially in what concerns the developing countries, where data on this issue are still scarce. Finally, this work highlights the urgent need for better access to public standardized prenatal care in Brazil, aiming at the improvement in management of pregnancies in which a skeletal dysplasia is detected.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the patients and their families for participating in this study. Financial support was provided by the Research and Post-Graduation Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the National Counsel of Technological and Scientific Development.

REFERENCES

1. Spranger JW, Brill PW, Poznanski A. Bone Dysplasias - An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development. New York: Oxford University Press, 2002.
2. Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, *et al.* Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A* 2011; 155A:943–68.
3. Boyd P, Tonks A, Rankin J, *et al.* Monitoring the prenatal detection of structural fetal congenital anomalies in England and Wales: register-based study. *J Med Screen* 2011; 18:2–7.
4. Stevenson DA, Carey JC, Byrne JLB, *et al.* Analysis of skeletal dysplasias in the Utah population. *Am J Med Genet A* 2012; 158A:1046–54.
5. Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, *et al.* Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am J Med Genet A* 2012; 158A:1038–45.
6. Yeh P, Saeed F, Paramasivam G, *et al.* Accuracy of prenatal diagnosis and prediction of lethality for fetal skeletal dysplasias. *Prenat Diagn* 2011; 31:515–8.
7. Schramm T, Gloning K, Minderer S, *et al.* Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34:160–70.
8. Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL. Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias. *Genet Med* 2009; 11:127–33.
9. Khalil A, Pajkrt E, Chitty LS. Early prenatal diagnosis of skeletal anomalies. *Prenat Diagn* 2011; 31:115–24.
10. Ho M. Evaluation of Suspected Fetal Skeletal Dysplasia for the Referring Physician. *Ultrasound Clin* 2013; 8:31–38.
11. Krakow D, Alanay Y, Rimoin LP, *et al.* Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: a retrospective and prospective analysis. *Am J Med Genet A* 2008; 146A:1917–24.
12. Orioli IM, Castilla EE, Barbosa-Neto JG. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J Med Genet* 1986; 23:328–32.
13. Stoll C, Dott B, Roth MP, Alembik Y. Birth prevalence rates of skeletal dysplasias. *Clin Genet* 1989; 35:88–92.
14. Rasmussen SA, Bieber FR, Benacerraf BR, *et al.* Epidemiology of osteochondrodysplasias: changing trends due to advances in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 1996; 61:49–58.

15. Parnell SE, Phillips GS. Neonatal skeletal dysplasias. *Pediatr Radiol* 2012; 42:S150–7.
16. Hatzaki A, Sifakis S, Apostolopoulou D, *et al.* FGFR3 related skeletal dysplasias diagnosed prenatally by ultrasonography and molecular analysis: presentation of 17 cases. *Am J Med Genet A* 2011; 155A:2426–35.
17. Singh S, Sedgh G, Hussain R. Unintended pregnancy: worldwide levels, trends, and outcomes. *Stud Fam Plann* 2010; 41:241–50.
18. Prietsch SOM, González-Chica DA, Cesar JA, Mendoza-Sassi RA Unplanned pregnancy in Southern Brazil: prevalence and associated factors. *Cad Saude Publica* 2011; 27:1906–16.
19. Schuler-Faccini L, Sanseverino MTV, de Rocha Azevedo L, *et al.* Health needs assessment for congenital anomalies in middle-income countries: Examining the case for neural tube defects in Brazil. *J Community Genet* 2013; 1–9.
20. Nagahama EEI, Santiago SM. Prenatal care in an university hospital: evaluating the process. *Cad Saúde Pública* 2006; 22(1):173-9.
21. Pereira PHG, Antón AGS, Junior WSV, *et al.* Associated factors to alter access to prenatal care of Health Center #1 of Paranoá, Brazil, 2005. *Comun Ciênc Saúde* 2006; 17:101-10.
22. Tretter AE, Saunders RC, Meyers CM, *et al.* Antenatal diagnosis of lethal skeletal dysplasias. *Am J Med Genet* 1998; 75:518–22.
23. Parilla BV, Leeth EA, Kambich MP, *et al.* Antenatal detection of skeletal dysplasias. *J Ultrasound Med* 2003; 22:255–8.
24. Witters I, Moerman P, Fryns JP. Skeletal dysplasias: 38 prenatal cases. *Genet Couns* 2008; 19:267–75.
25. Krakow D, Williams J, Poehl M, *et al.* Use of three-dimensional ultrasound imaging in the diagnosis of prenatal-onset skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21:467–72.
26. Ulla M, Aiello H, Cobos MP, *et al.* Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias: contribution of three-dimensional computed tomography. *Fetal Diagn Ther* 2011; 29:238–47.
27. Rimoin DL, Cohn D, Krakow D, *et al.* The skeletal dysplasias: clinical-molecular correlations. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1117:302–9.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Flow chart of all skeletal dysplasia patients with prenatal manifestation identified in this study. After initial exclusion of seven cases due to insufficient data, 33 patients were included in the analysis. Although 27 cases were lethal, the bad prognosis was only clearly stated on US records of 13 patients, and this number was used to determine the accuracy of lethality estimation.

Figure 2: Birth status and number of skeletal dysplasia patients identified in this study according to specific conditions. AO2/ DTD: atelosteogenesis type II/ diastrophic dysplasia; SEDC: spondyloepiphyseal dysplasia congenita; OI: osteogenesis imperfecta; SRPS 1/3: short ribs-polydactyly syndrome 1/3.

Figure 3: Distribution of skeletal dysplasia diagnoses by gestational age (GA) at the moment of the first evidence of an osteochondrodysplasia (OCD). The solid line shows the normal distribution of the data centered at 23.3 weeks (standard deviation: ± 5.0 weeks).

Figure 4: Proposition of candidate genes for specific skeletal dysplasias based on radiographic analysis and characteristic findings. OI II patients with dominant inheritance were predicted to encode mutations in either *COL1A1* or *COL1A2* genes (type I collagen chains $\alpha 1$ and $\alpha 2$, respectively). *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor type 3) accounted for TD and achondroplasia; *COL2A1* (type II collagen chain $\alpha 1$) for type II achondrogenesis, spondyloepiphysealdysplasia congenita, and hypochondrogenesis; *SOX9* (sex determining region Y-box 9) for CD; *SLC26A2*

[solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2] for type II atelosteogenesis/diastrophic dysplasia; *RMRP* (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) for cartilage-hair hypoplasia; *CHST3* [carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3] for recessive Larsen syndrome; “unspecific” for short ribs-polydactyly syndrome 1/3 and recessive OI II (see Table 1); and “undefined” for the undiagnosed patient.

Figure S1: Number of patients with a skeletal dysplasia diagnosed in the prenatal period per year of the retrospective evaluation (solid line) and linear regression model (dashed line).

Figure S2: Distribution of mean gestational age (GA) at the first diagnosis of a skeletal dysplasia as a function of year of detection (empty squares). Linear regression is represented by the dashed line.

TABLES

Table 1: Specific skeletal dysplasias with prenatal manifestation identified in this study.

| Number of patients [n (%)] | Disorder | Nosology group ^a | MIM | Candidate gene |
|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|--|
| 8 (24.2) | Osteogenesis imperfecta type 2 | 25 | 166210 | Various ^e |
| 5 (15.2) | Thanatophoric dysplasia type 1 | 1 | 187600 | <i>FGFR3</i> |
| 4 (12.1) | Campomelic dysplasia | 18 | 114290 | <i>SOX9</i> |
| 3 (9.1) | Achondrogenesis type 2 | 2 | 200610 | <i>COL2A1</i> |
| 2 (6.1) | SEDC ^b | 2 | 183900 | <i>COL2A1</i> |
| 2 (6.1) | SRPS type 1/3 ^c | 9 | 263510 | <i>DYNC2H</i> , <i>IFT80</i> ^d |
| 2 (6.1) | Thanatophoric dysplasia type 2 | 1 | 187601 | <i>FGFR3</i> |
| 2 (6.1) | Hypochondrogenesis | 2 | 200610 | <i>COL2A1</i> |
| 1 (3.0) | Achondroplasia | 1 | 100800 | <i>FGFR3</i> |
| 1 (3.0) | Atelosteogenesis type 2 | 4 | 256050 | <i>DTDST</i> |
| 1 (3.0) | Cartilage-hair hypoplasia | 11 | 250250 | <i>RMRP</i> |
| 1 (3.0) | Suggestive recessive Larsen syndrome | 4 | 143095 | <i>CHST3</i> |
| 1 (3.0) | Undefined | - | - | - |

^aAccording to Warman *et al.* 2011.

^bSpondyloepiphyseal dysplasia congenita.

^cShort ribs-polydactyly syndrome type 1/3 (Saldino-Noonan/ Verma-Naumoff).

^dSome SRPS 1/3 cases are unlinked to both *DYNC2H* and *IFT80*.

^e*COL1A1* and *COL1A2* for dominant inheritance, and *CRTAP*, *LEPRE1*, and *PPIB* for recessive inheritance.

Table 2: Clinical outcome and major ultrasonographic findings of skeletal dysplasia patients.

| Case | Final diagnosis | GA at first US (weeks) | GA at diagnosis (weeks) ^a | Morphologic US | Total number of US | US findings |
|------|--|------------------------|--------------------------------------|----------------|--------------------|---|
| 1 | Achondrogenesis type II | 8 | 13 | Yes | 5 | Cystic hygroma, short long bones. |
| 2 | Achondrogenesis type II | 26 | 26 | No | 2 | Hypoplastic thorax, short long bones. |
| 3 | Achondrogenesis type II | 24 | 27 | No | 2 | Narrow and short thorax, polyhydramnios, short long bones. |
| 4 | Achondroplasia | 19 | 36 | Yes | 2 | Polyhydramnios, short long bones <p5. |
| 5 | AO2/ DTD ^b | 17 | 17 | No | 1 | Very short fetal long bones and short trunk. |
| 6 | Campomelic dysplasia | 13 | 14 | Yes | 4 | Micrognathia, short long bones, bowed femur. |
| 7 | Campomelic dysplasia | 7 | 23 | Yes | 4 | Short long bones. |
| 8 | Campomelic dysplasia | 7 | 23 | Yes | 3 | Intrauterine death, short long bones, bowed femur, hypoplastic thorax. |
| 9 | Campomelic dysplasia | NS | 25 | No | 2 | Polyhydramnios, short long bones. |
| 10 | Cartilage-hair hypoplasia | 8 | 20 | Yes | 8 | Femur length below 2 standard deviations; familial recurrence, 10-year-old son diagnosed. |
| 11 | Hypochondrogenesis | 11 | 16 | Yes | 5 | Short long bones. |
| 12 | Suggestive Larsen syndrome (AR) ^c | 12 | 25 | Yes | 4 | Arthrogryposis secondary to fetal akinesia. |
| 13 | OI type II ^d | 18 | 18 | Yes | 10 | Micrognathia, short long bones <p2.5. |
| 14 | OI type II | 18 | 19 | Yes | 2 | Short long bones. |

| | | | | | | |
|----|------------------------|----|----|-----|----|---|
| 15 | OI type II | 11 | 22 | Yes | 4 | Long bones <p5. |
| 16 | OI type II | 10 | 22 | Yes | 3 | Short long bones. |
| 17 | OI type II | 24 | 24 | No | 1 | Short long bones, bilateral ventriculomegaly. |
| 18 | OI type II | 16 | 29 | Yes | 3 | Brachicephaly, short long bones. |
| 19 | OI type II | 13 | 23 | Yes | 2 | Intrauterine death, short and bowed long bones <p5, possible achondroplasia. |
| 20 | OI type II | 7 | 27 | Yes | 2 | Hydrocephaly, polyhydramnios, skeletal dysplasia. |
| 21 | SEDC ^e | NS | 20 | Yes | NS | Short long bones. |
| 22 | SEDC | NS | 23 | Yes | NS | Long bones <p5. |
| 23 | SRPS 1/3 | 20 | 20 | Yes | 3 | Short long bones. |
| 24 | SRPS 1/3 ^f | 18 | 36 | Yes | 2 | Polyhydramnios, long bones <p2.5, syndactyly, thoracic commitment, prominent face. |
| 25 | TD type I | 6 | 17 | Yes | 6 | Long bones <p5. |
| 26 | TD type I | 5 | 22 | Yes | 5 | Small thorax and short long bones, macrocephaly, polyhydramnios. |
| 27 | TD type I ^g | NS | 27 | NS | NS | Narrow thorax, short long bones, polyhydramnios. |
| 28 | TD type I | 6 | 25 | Yes | 4 | Short long bones. |
| 29 | TD type I | 7 | 26 | Yes | 3 | Severe shortening of long bones, platyspondyly, poor mineralization, flat nasal bridge, narrow thorax, club feet, low set ears. |

| | | | | | | |
|----|--------------------|----|----|-----|---|--|
| 30 | TD type I | 7 | 34 | Yes | 2 | Cloverleaf skull, frontal bossing, polyhydramnios, short ribs and narrow thorax. |
| 31 | TD type II | 18 | 20 | Yes | 4 | Poor mineralization of the cranium, short long bones and ribs. |
| 32 | Undiagnosed | 25 | 25 | No | 2 | Bilateral hydronephrosis, micrognathia, possible skeletal dysplasia. |
| 33 | Hypochondrogenesis | 7 | 26 | Yes | 5 | Femur length <p5 |

^aGestational age at the first evidence of a skeletal dysplasia.

^bIntermediate phenotype between atelosteogenesis type 2 and diastrophic dysplasia.

^cSuggestive autosomal recessive Larsen syndrome

^dOI: osteogenesis imperfecta.

^eSEDC: spondyloepiphyseal dysplasia congenita.

^fSRPS 1/3: short ribs-polydactyly syndrome 1/3 (Saldino-Noonan / Verma-Naumoff).

^gTD: thanatophoric dysplasia.

NS: not specified.

Table 3: Diagnostic accuracy and reported frequencies of skeletal dysplasias with prenatal manifestation in selected cohorts.

| | This study | Tretter, 1998 | Parilla, 2003 | Witters, 2008 | Schramm, 2009 | Khalil, 2011 | Yeh, 2011 | Stevenson, 2012 | Barbosa-Buck, 2012 |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------|------------------------|---------------------------|
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| Period (years) | 20 | 9 | 8 | 10 | 23 | 17 | 8 | 10 | 8 |
| Prenatal/postnatal evaluation | Prenatal | Both | Prenatal | Prenatal | Prenatal | Prenatal | Prenatal | Both | Both |
| Suspected cases | 40 | 29 | 37 | 46 | 178 | 15 | 40 | 184 | 536 |
| Cases excluded | 7 (17.5) | 0 (0) | 6 (16.2) | 8 (17.4) | 16 (8.9) | 0 (0) | 0 (0) | 31 (16.8) | 44 (8.2) |
| False-positives | NS | 1 (3.4) | 2 (5.4) | 0 (0) | 12 (6.7) | 0 ^f (0) | 0 (0) | NS | NS |
| Diagnostic accuracy | | | | | | | | | |
| Confirmed cases | 33 | 28 | 31 | 38 | 162 | 15 | 40 | 153 | 492 |
| Prenatal accuracy | NS | 13 (46.4) | 20 (64.5) | 25 (65.8) | 110 (67.9) | 9 (60.0) | 23 (57.5) | 82 (53.6) | NS |
| Perinatal death ^a | 27 (81.8) | 28 ^d (100) | 16 (51.6) | 27 (71.0) | 114 (70.3) | NS | 35 (87.5) | 64 (41.8) | 244 (49.6) |
| Cases predicted as lethal | 13 (39.4) | 26 (92.8) | 16 (51.6) | 27 (71.0) | 114 (70.3) | NS | 30 (75.0) | 47 (30.7) | NS |
| Prenatal lethality accuracy | 13 (100) | 26 (100) | 16 (100) | 27 (100) | 113 (99.1) | NS | 30 (100) | 47 (100) | NS |
| Most common diagnoses | | | | | | | | | |
| Achondrogenesis ^b | 3 (9.1) | 1 (3.6) | 0 (0) | 2 (5.3) | 8 (4.9) | 2 (13.3) | 2 (5.0) | 6 (3.9) | 10 (2.0) |
| Achondroplasia | 1 (3.0) | 0 (0) | 3 (9.7) | 6 (15.8) | 9 (5.5) | 0 (0) | 7 (17.5) | 18 (11.8) | 68 (13.8) |
| Atelosteogenesis ^b | 1 (3.0) | 1 (3.6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Campomelic dysplasia | 4 (12.1) | 2 (7.1) | 0 (0) | 2 (5.3) | 8 (4.9) | 0 (0) | 0 (0) | 5 (3.3) | 15 (3.0) |
| Cartilage-hair hypoplasia | 1 (3.0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (0.6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (0.2) |
| Cleidocranial dysplasia | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 6 (3.9) | 3 (0.6) |
| Diastrophic dysplasia | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 5 (3.1) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (0.6) | 2 (0.4) |

| | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|------------------------|----------|-----------|-----------|-----------------------|
| Ellis-van Creveld | 0 (0) | 0 (0) | 1 (3.2) | 2 (5.3) | 9 (5.5) | 1 (6.7) | 0 (0) | 0 (0) | 5 (1.0) |
| Hypochondrogenesis | 2 (6.1) | 1 (3.6) | 0 (0) | 0 (0) | 6 (3.7) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (1.3) | 7 (1.4) |
| Hypochondroplasia | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (0.6) | 7 (1.4) |
| Suggestive Larsen syndrome | 1 (3.0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (0.4) |
| AR | | | | | | | | | |
| OI I | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2.6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 19 (12.4) | 28 ^g (5.7) |
| OI II | 8 (24.2) | 6 (21.4) | 0 (0) | 9 (23.7) | | 2 (13.3) | 1 (2.5) | 8 (5.2) | 55 (11.2) |
| OI III | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (3) | 35 ^e (21.6) | 0 (0) | 1 (2.5) | 6 (3.9) | 28 ^g (5.7) |
| OI IV | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | | 0 (0) | 0 (0) | 6 (3.9) | |
| OI undefined | 0 (0) | 0 (0) | 6 (19.4) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 7 (17.5) | 1 (0.6) | 32 (6.5) |
| SEDC | 2 (6.1) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (6.7) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (0.4) |
| Short-ribs dysplasias ^c | 2 (6.1) | 3 (10.7) | 0 (0) | 13 (34.2) | 17 (10.5) | 4 (26.7) | 5 (12.5) | 5 (3.3) | 16 (3.2) |
| TD | 7 (21.2) | 14 (50.0) | 8 (25.8) | 7 (18.4) | 40 (24.7) | 2 (13.3) | 4 (10.0) | 22 (14.4) | 73 (14.8) |
| No specific diagnosis | 1 (3.0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 9 (5.5) | 0 (0) | 10 (25.0) | 16 (10.4) | 118 (24.0) |

^aStillborns, pregnancy terminations, and live births resulting in death in the neonatal period.

^bAll types included.

^cShort-ribs syndromes + asphyxiating thoracic dysplasia Jeune.

^dThis study evaluated only lethal skeletal dysplasia cases.

^eOsteogenesis imperfecta types II, III and IV combined.

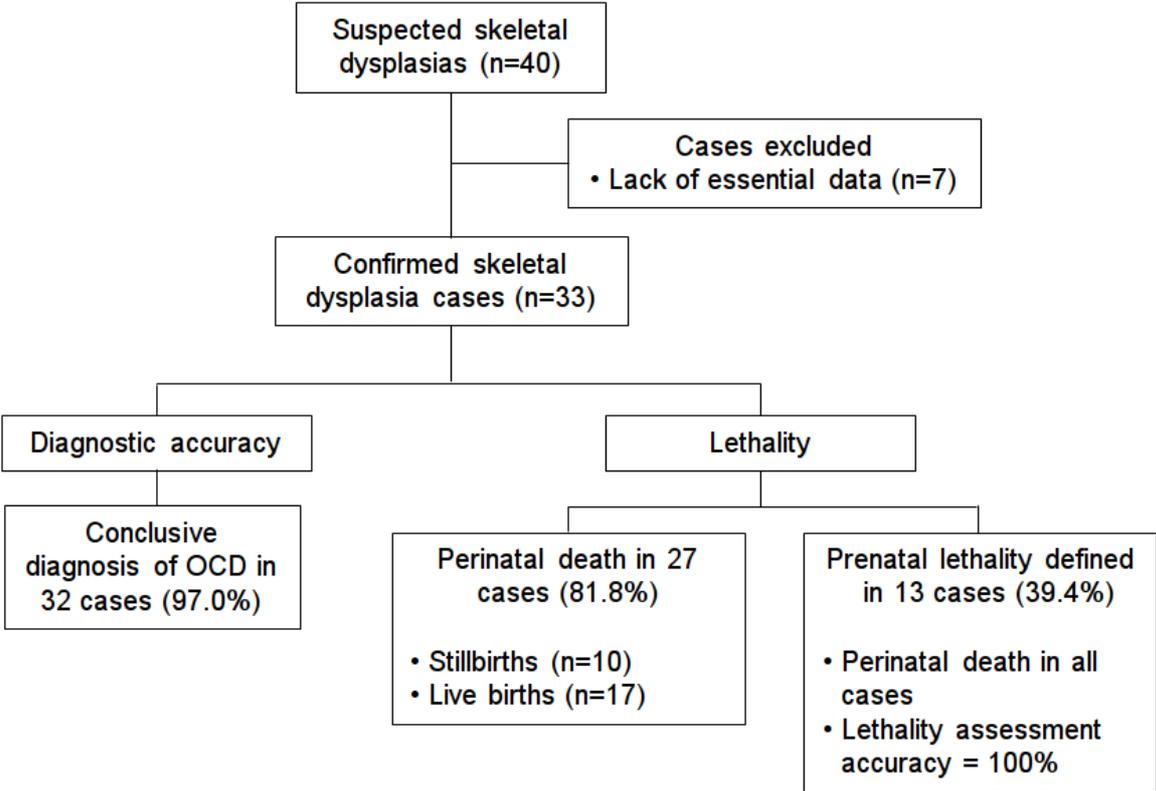
^fThis study evaluated only skeletal dysplasia cases detected in 14 weeks' gestations and confirmed postnatally.

^gOsteogenesis imperfecta I, III and IV combined.

NS: not specified; OI: osteogenesis imperfecta; SEDC: spondyloepiphyseal dysplasia congenita; TD: thanatophoric dysplasia types I and II.

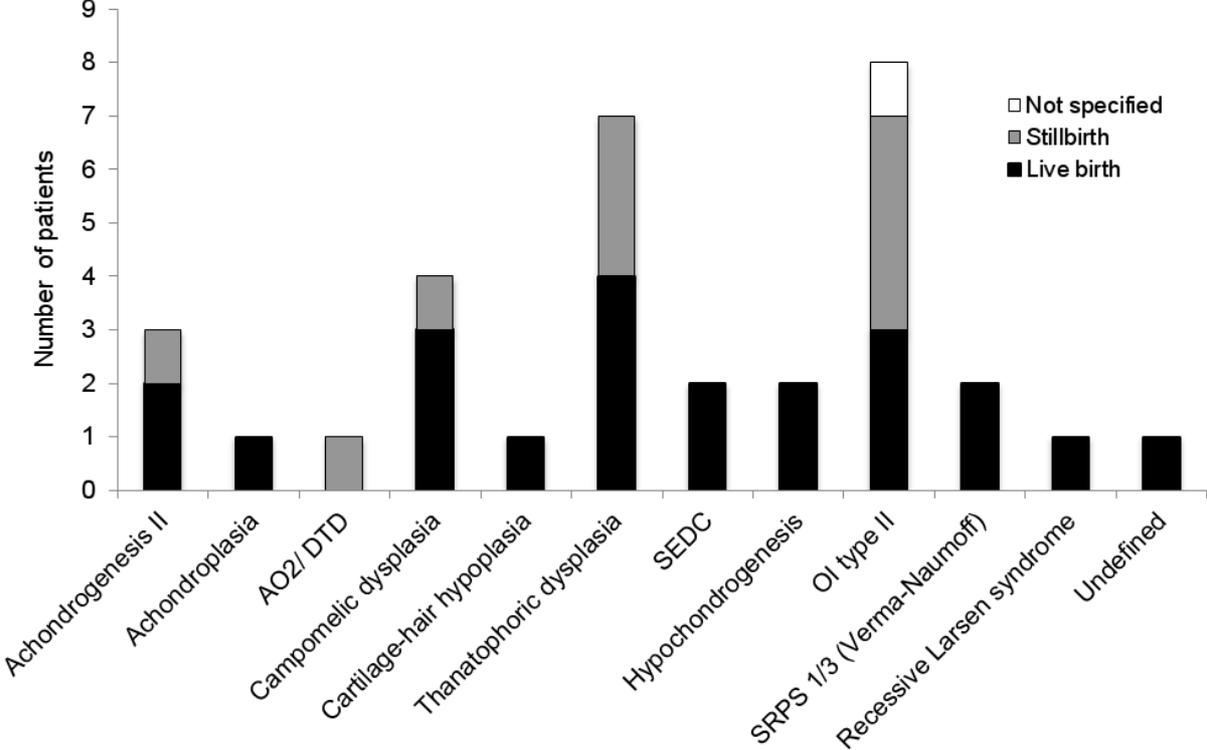
FIGURES

Figure 1



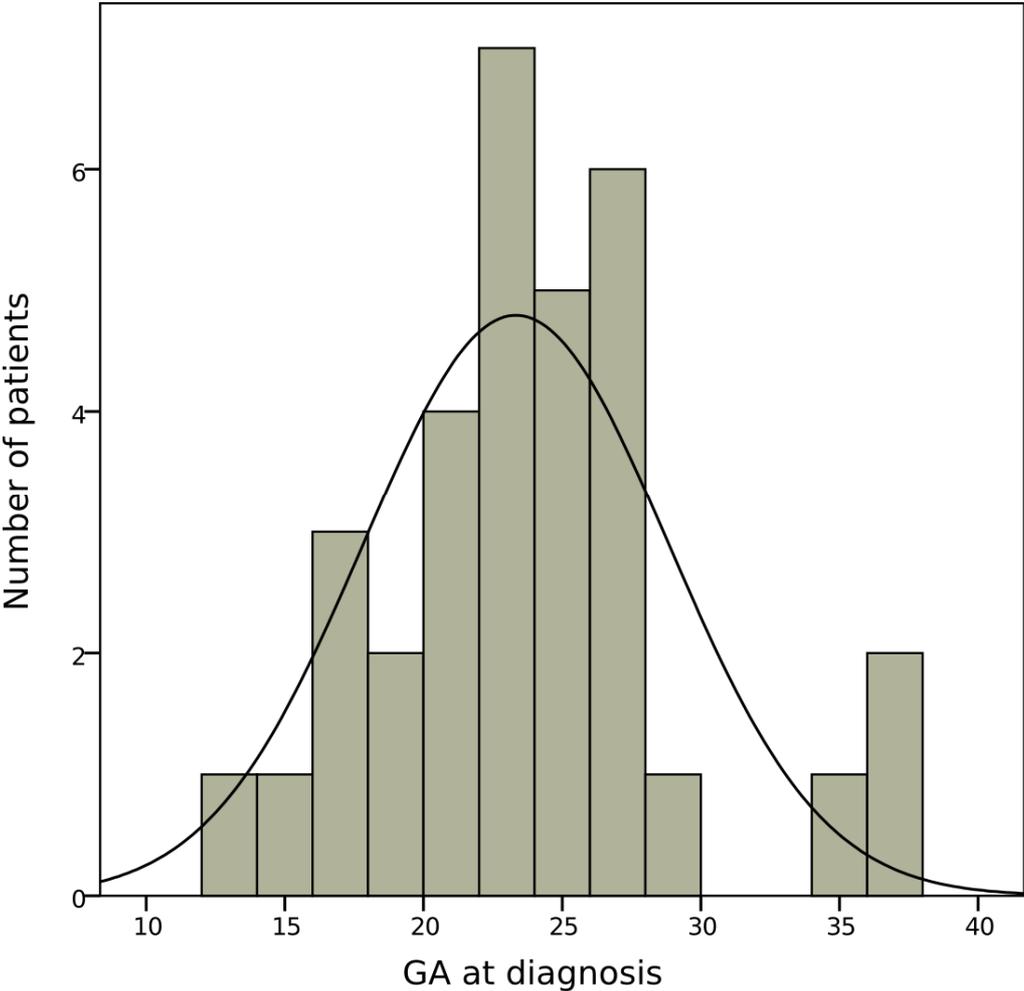
Flow chart of all skeletal dysplasia patients with prenatal manifestation identified in this study. After initial exclusion of seven cases due to insufficient data, 33 patients were included in the analysis. Although 27 cases were lethal, the bad prognosis was only clearly stated on US records of 13 patients, and this number was used to determine the accuracy of lethality estimation.

Figure 2



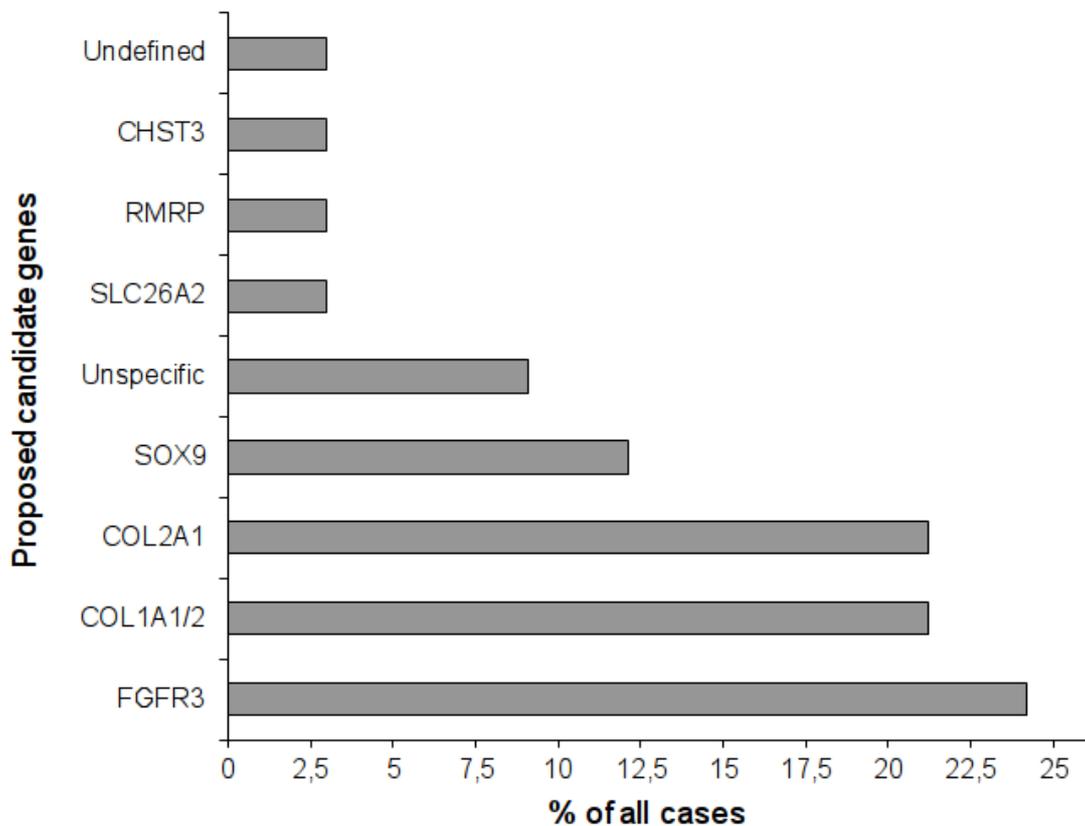
Birth status and number of skeletal dysplasia patients identified in this study according to specific conditions. AO2/ DTD: atelosteogenesis type II/ diastrophic dysplasia; SEDC: spondyloepiphyseal dysplasia congenita; OI: osteogenesis imperfecta; SRPS 1/3: short ribs-polydactyly syndrome 1/3.

Figure 3



Distribution of skeletal dysplasia diagnoses by gestational age (GA) at the moment of the first evidence of an osteochondrodysplasia (OCD). The solid line shows the normal distribution of the data centered at 23.3 weeks (standard deviation: ± 5.0 weeks).

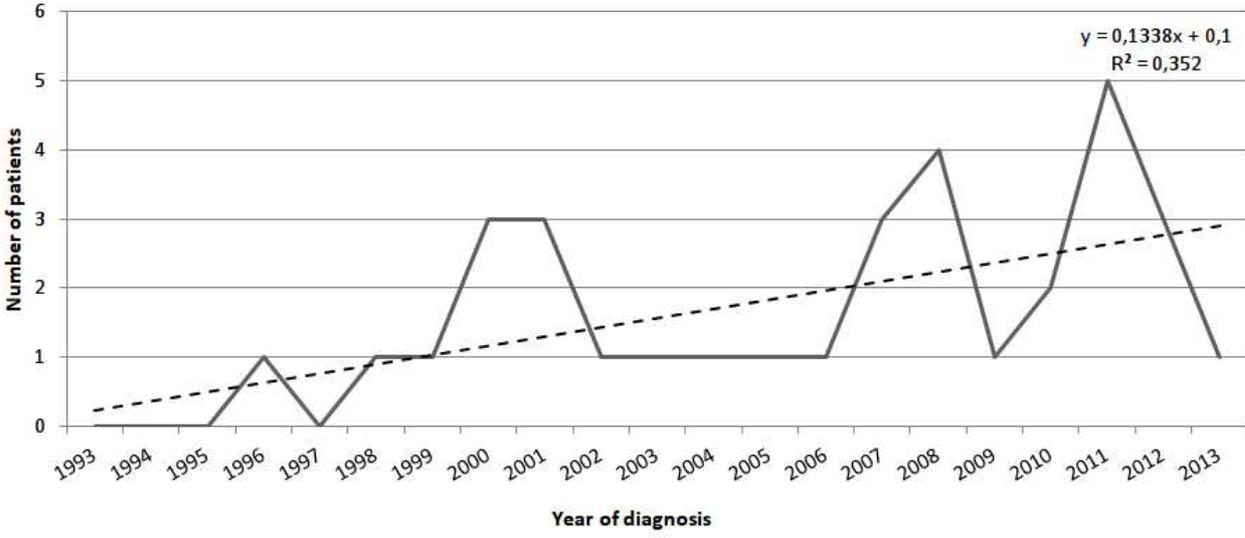
Figure 4



Proposition of candidate genes for specific skeletal dysplasias based on radiographic analysis and characteristic findings. Of 11 patients with dominant inheritance were predicted to encode mutations in either *COL1A1* or *COL1A2* genes (type I collagen chains $\alpha 1$ and $\alpha 2$, respectively). *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor type 3) accounted for TD and achondroplasia; *COL2A1* (type II collagen chain $\alpha 1$) for type II achondrogenesis, spondyloepiphyseal dysplasia congenita, and hypochondrogenesis; *SOX9* (sex determining region Y-box 9) for CD; *SLC26A2* [solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2] for type II atelosteogenesis/diastrophic dysplasia; *RMRP* (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) for cartilage-hair hypoplasia; *CHST3* [carbohydrate (chondroitin 6)

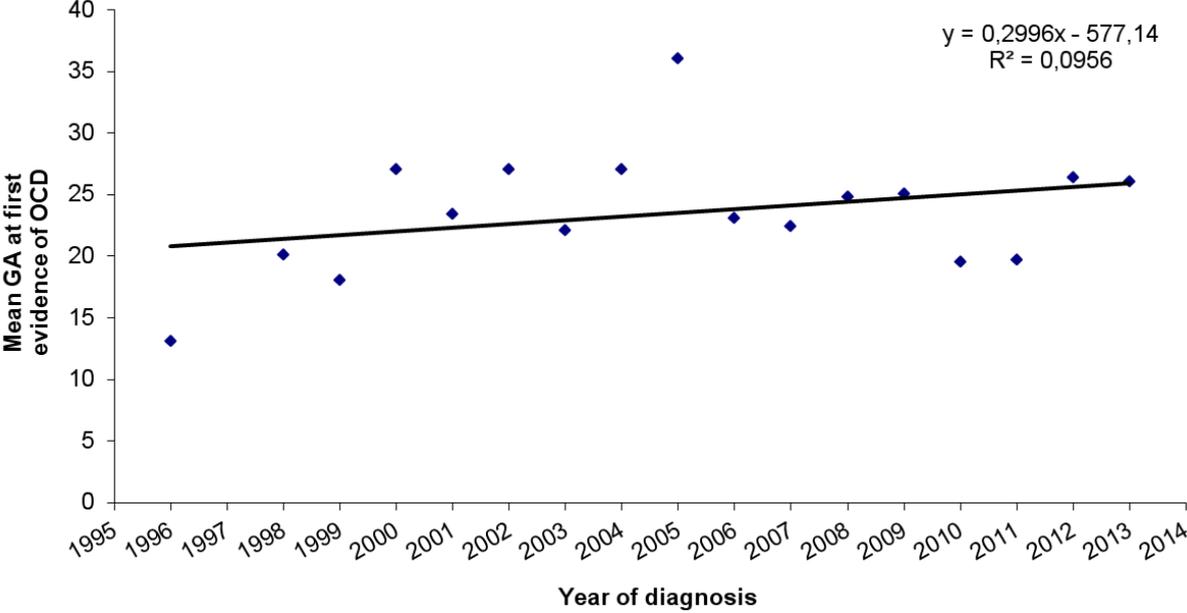
sulfotransferase 3] for recessive Larsen syndrome; “unspecific” for short ribs-polydactyly syndrome 1/3 and recessive OI II (see Table 1); and “undefined” for the undiagnosed patient.

Figure S1



Number of patients with a skeletal dysplasia diagnosed in the prenatal period per year of the retrospective evaluation (solid line) and linear regression model (dashed line).

Figure S2



Distribution of mean gestational age (GA) at the first diagnosis of a skeletal dysplasia as a function of year of detection (empty squares). Linear regression is represented by the dashed line.

3 – RESULTADOS

3.3 – Relato de caso: Espectro fenotípico da atelosteogênese tipo 2/ displasia diastrófica – diagnóstico pré-natal e pré-implantacional.

Artigo 3: “Atelosteogenesis type 2/ diastrophic dysplasia phenotypic spectrum: from prenatal to preimplantation genetic diagnosis.”

Manuscrito submetido ao periódico “Reproductive BioMedicine Online”.

Atelosteogenesis type 2/ diastrophic dysplasia phenotypic spectrum: from prenatal to preimplantation genetic diagnosis.

Eduardo P Mattos ^{a,c}, José Antônio A Magalhães ^b, Lauréane Mittaz-Crettol ^g, Ricardo Azambuja ^d, Lilian Okada ^d, Denise P Cavalcanti ^e, Juliana Cuzzi ^f, Mariângela Badalotti ^d, Rafaella Petracco ^d, Álvaro Petracco ^d, Lavinia Schüller-Faccini ^{a,c}, Maria Teresa V Sanseverino ^{c,*}

^aDepartment of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul; Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323M, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil (EPM: emattos@hcpa.ufrgs.br; LS-F: lavinia.faccini@ufrgs.br).

^bSchool of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul; R. Ramiro Barcelos, 2400, CEP 90035-004, Porto Alegre, RS, Brazil (JAAM: medfetal@terra.com.br).

^cMedical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; R. Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-004, Porto Alegre, RS, Brazil (MTVS: msanseverino@hcpa.ufrgs.br).

^dFertilitat Clínica de Reprodução; Av. Ipiranga, 6690, CEP 90160-090, Porto Alegre, RS, Brazil (RA: ricardo@fertilitat.com.br; LO: lilian@fertilitat.com.br; MB: mariangela@fertilitat.com.br; RP: rafaella@fertilitat.com.br; AP: petracco@fertilitat.com.br).

^eSkeletal Dysplasia Group, Medical Genetics Department, Faculty of Medicine, State University of Campinas; R. Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP 13083-887, Campinas, SP, Brazil (DPC: denisepcavalcanti@gmail.com).

^fGenesis Genetics Diagnosis; R. Mato Grosso, 306/ 506, CEP 01239-040, São Paulo, SP, Brazil (JC: juliana@genesisgenetics.com.br).

^gDivision of Molecular Pediatrics, Lausanne University Hospital; Av. Pierre-Decker 2, CH 1011, Lausanne, Switzerland (LM-C: Laureane.Mittaz-Crettol@chuv.ch).

*Corresponding author:

Maria Teresa V. Sanseverino, MD, PhD

Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS – Brazil, CEP 90035-903

E-mail: msanseverino@hcpa.ufrgs.br | Phone: +55 51 33598011 | Fax: +55 51

33598010

Abstract

We report a patient with an intermediate phenotype between atelosteogenesis type II AO2 and diastrophic dysplasia, two severe osteochondrodysplasias due to mutations in *SLC26A2*, and present the successful application of preimplantation genetic diagnosis (PGD) in this situation. At request from the parents, PGD was developed through haplotype mapping of parental *SLC26A2* alleles in embryos. Transference to the mother was attempted twice, finally resulting in pregnancy and delivery of a healthy baby. This exemplifies the utility of PGD for inherited lethal conditions with significant risk of recurrence, and highlights the importance of accurate diagnosis of skeletal dysplasias with prenatal manifestation.

Keywords

atelosteogenesis type 2, diastrophic dysplasia, genetic counseling, preimplantation genetic diagnosis, prenatal diagnosis, skeletal dysplasia

Introduction

Skeletal dysplasias, or osteochondrodysplasias (OCDs), comprise a vast group of genetic diseases affecting the formation of the skeleton. About 40% of OCDs can be recognized in the prenatal period (Krakow et al., 2008), and, combined, OCDs are frequent conditions that significantly contribute to perinatal death (Barbosa-Buck et al., 2012). An interesting group of recessive OCDs is due to mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter gene (*DTDST*), also known as *SLC26A2*. Conditions with this genetic basis range from lethal achondrogenesis 1B and atelosteogenesis 2 (AO2), to diastrophic dysplasia (DTD), and milder phenotypes. AO2 and severe DTD may present with similar clinical and radiological findings, which sometimes hinders their antenatal distinction (Barbosa et al., 2011). This suggests a transitional AO2/DTD phenotype, in which different *SLC26A2* alleles may contribute to a spectrum of OCDs (Macías-Gómez et al., 2004).

Methods

Detection of mutations

The *SLC26A2* gene was amplified by PCR and screened for the four most common *SLC26A2* mutations by restriction enzyme digestion and gel electrophoresis with positive and negative controls. Subsequently, selective fragments of the gene were analyzed by bidirectional fluorescent direct sequencing. Results have been confirmed in a second amplification product. Primer sequences and PCR conditions are available upon request.

Preimplantation genetic diagnosis

The established protocol followed the guidelines of the Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) International Society (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, 2008). Twenty-four oocytes were fertilized and 19 embryos were successfully produced. DNA was extracted from trophectoderm cells of eleven viable embryos on the fifth day post-fertilization. All biopsied embryos were cryopreserved until transference to the mother. Whole-genome amplification was performed and samples were screened for *SLC26A2* alleles by parental haplotype analysis, based on the mutations identified. As requested by the parents, 24-chromosome array-comparative genomic hybridization (aCGH) was also employed for detection of chromosomal abnormalities.

The individuals reported here were informed and consented with the anonymous disclosure of their medical information. This work was ethically reviewed and approved by the Institutional Review Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Results

Recently, a non-consanguineous couple (32-year-old father and 30-year-old mother) of Portuguese ancestry was referred to our Institution during their second pregnancy due to recurrence of detection of a severe OCD. Their previous pregnancy ended at 16 weeks of gestation, after short fetal long bones and trunk constriction were detected. During the second pregnancy, ultrasonography identified again very short long bones and pregnancy ended at 17 weeks. Postnatal physical examination revealed a female fetus with severely shortened limbs and fingers with hitchhiker thumbs, *varus* deformity of lower limbs, *talipes*

equinovarus with a wide gap between first and second toes, relative macrocephaly, midface hypoplasia, micrognathia, and short trunk (Fig. 1A). Babygram showed narrowing of upper thorax, thin ribs, round ilia, and short long bones and metacarpals (Fig. 1B). These findings were very suggestive of either AO2 or DTD.

SLC26A2 sequencing characterized the fetus as a compound heterozygote for two known pathogenic *SLC26A2* point mutations, c.559C>T (p.Arg178Ter) of paternal, and c.862 C>T (p.Arg279Trp) of maternal origins (Fig. 1C).

A PGD protocol was elected by the family for a subsequent pregnancy. Haplotype reconstructions identified only two embryos carrying both wild type *SLC26A2* alleles (Supplementary table 1). These were firstly transferred to the mother, but no pregnancy developed. Of the other 9 samples, seven carried just one of the two pathogenic alleles, and only five were chromosomally balanced. The parents opted for the implantation of two heterozygous carrier embryos, and this second attempt resulted in pregnancy and delivery of a healthy infant, although the baby was not postnatally screened for *SLC26A2* mutations.

Discussion

In this study, the evaluated fetus had clinical findings compatible with both AO2 and severe DTD. In fact, the skeletal abnormalities reported here are strikingly similar to those identified in a patient reported by Macías-Gomez and colleagues (2004) who was also diagnosed with an intermediate AO2/DTD condition. The substitution p.Arg279Trp has been found in AO2 mostly in compound heterozygosity with p.Arg178Ter or with another null allele (Macías-

Gómez et al., 2004), and the p.Arg178Ter + p.Arg279Trp genotype has been identified in almost half of the patients with AO2, as well as in 20% of patients with DTD diagnosed at the Lausanne Molecular Pediatrics laboratory (L. Mittaz-Crettol, personal communication). Barbosa and colleagues (2011) identified compound heterozygosity for p.Arg178Ter and p.Arg279Trp in seven Portuguese patients diagnosed with classical DTD, and commented on the phenotypic overlap due to *SLC26A2* mutations. Another group reported both mutations in an infant with clinical and skeletal findings suggestive of a severe variant of DTD or a mild form of AO2 (Macías-Gómez et al., 2004). These observations reinforce the notion that the same *SLC26A2* mutations may not always translate into a single, characteristic phenotype, implying genetic and/or environmental factors influencing sulfate transport activity and clinical outcome.

To the best of our knowledge, this is one of the first descriptions on the application of PGD for a recessive lethal skeletal dysplasia with phenotypic characteristics between AO2 and DTD, leading to the successful live birth of a healthy infant. This exemplifies a growing trend in the medical genetics field, especially for the management of lethal recurrent Mendelian traits with substantial risk of recurrence.

References

- Barbosa, M. et al., 2011. Clinical and molecular characterization of Diastrophic Dysplasia in the Portuguese population. *Clin. Genet.* 80(6), 550–557.
- Barbosa-Buck, C.O. et al., 2012. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A(5), 1038–1045.
- Krakow, D. et al., 2008. Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: a retrospective and prospective analysis. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A(15), 1917–1924.
- Macías-Gómez, N.M. et al., 2004. Diastrophic dysplasia and atelosteogenesis type II as expression of compound heterozygosis: first report of a Mexican patient and genotype-phenotype correlation. *Am. J. Med. Genet. A.* 129A(2), 190–192.
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, 2008. Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance. *Reprod. Biomed. Online.* 16(1), 134–147.

Financial support

Financial support was provided by research grant 12-0467 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The sponsor had no role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the article for publication.

Authors' declarations

Eduardo Preusser de Mattos: I declare that I participated in the analysis of the data and writing of this manuscript and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

José Antônio de Azevedo Magalhães: I declare that I participated in medical assistance and data analysis and that I have seen and approved the final version of this manuscript. I have none conflicts of interest to declare.

Lauréane Mittaz-Crettol: I declare that I participated in *SLC26A2* sequencing and that I have seen and approved the final version of this manuscript. I have none conflicts of interest to declare.

Ricardo Azambuja: I declare that I participated in *in vitro* fertilization, embryo biopsy and culture, and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

Lilian Okada: I declare that I participated in *in vitro* fertilization, embryo biopsy and culture, and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

Denise Pontes Cavalcanti: I declare that I participated in the clinical discussion and writing of this manuscript and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

Juliana Cuzzi: I declare that I participated in the performance of aCGH and molecular studies of embryos and that I have seen and approved the final version of this manuscript. I have none conflicts of interest to declare.

Mariângela Badalotti: I declare that I participated in medical assistance and data analysis and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

Rafaella Petracco: I declare that I participated in medical assistance and data analysis and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

Álvaro Petracco: I declare that I participated in medical assistance and data analysis and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

Lavinia Schüler-Faccini: I declare that I participated in the analysis of the data and writing of this manuscript and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

Maria Teresa Vieira Sanseverino: I declare that I participated in the clinical discussion, medical assistance, study coordination, data interpretation and writing of this manuscript and that I have seen and approved the final version. I have none conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors would like to thank the subjects reported here and Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Fund 12-0467 for supporting this publication.

Figure legend

Figure 1: Phenotype of the fetus at 17 weeks of gestation. A: Fetus appearance upon necropsy. Note the short trunk and limbs and the bowing of lower limbs with club feet. Hands with the characteristic “hitchhiker” thumb and feet with a wide gap between the first and second toes are also present. B: Whole-body radiography of the fetus, revealing short long bones, thoracic constriction, thin ribs, and round ilia with unossified pubis. C: *SLC26A2* sequencing of the mother-father-child trio. Electropherograms depict heterozygous peaks corresponding to the c.559 C>T substitution (p.Arg178Ter) of paternal origin, and to the c.862 C>T substitution (p.Arg279Trp) of maternal origin.

Supplementary table

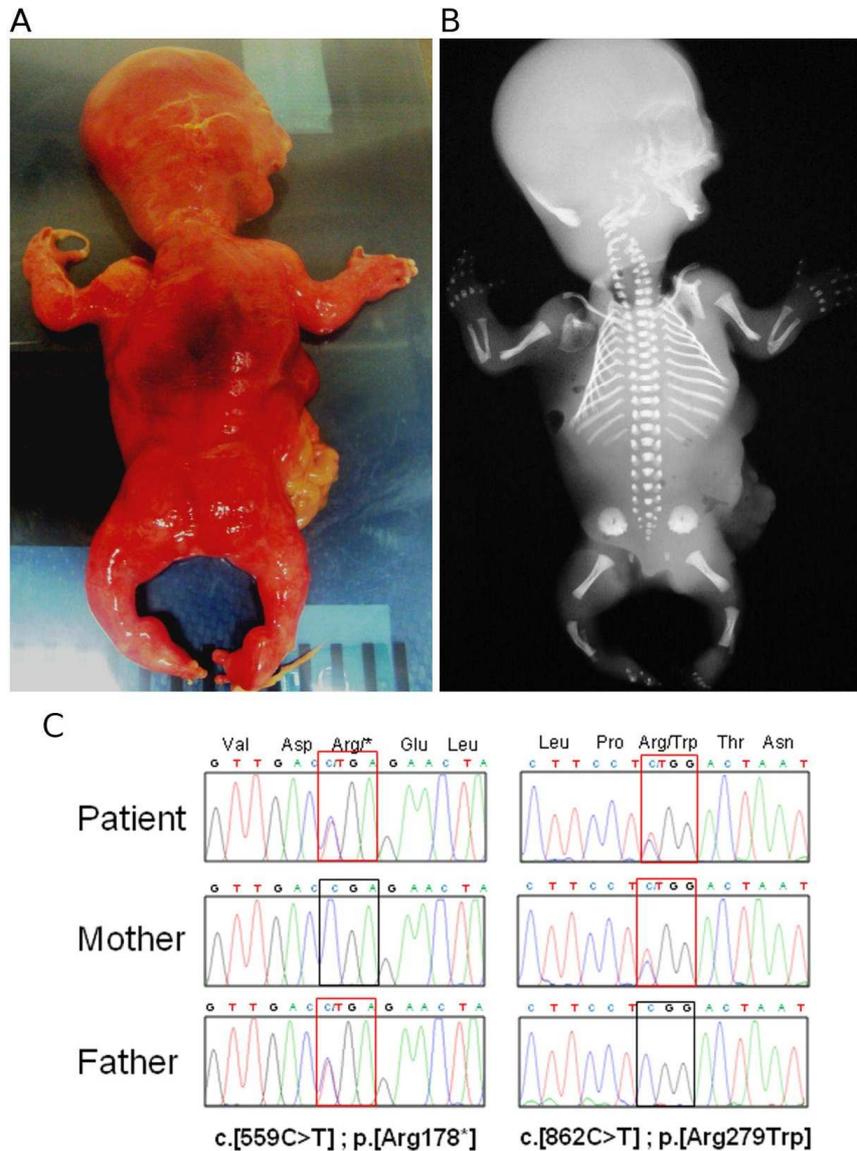
Supplementary table 1: Preimplantation genetic diagnosis for AO2/DTD and embryo selection.

| Sample | Inferred alleles ^a | aCGH result | Interpretation | Fate of embryo |
|--------|-------------------------------|-----------------|---|---|
| 2 | p.Arg178Ter / wt ^c | 45,XX; -2 | Heterozygous carrier (paternal mutant allele); chromosome 2 monosomy | Not used |
| 5 | p.Arg178Ter / wt | 45,XX; -17 | Heterozygous carrier (paternal mutant allele); chromosome 17 monosomy | Not used |
| 6 | wt / p.Arg279Trp | 46,XY | Heterozygous carrier (maternal mutant allele) | Transferred attempt #2, healthy infant born |
| 7 | p.Arg178Ter / wt | 46,XX | Heterozygous carrier (paternal mutant allele) | Transferred attempt #2 |
| 9 | wt / p.Arg279Trp | 46,XY | Heterozygous carrier (maternal mutant allele) | Cryopreserved |
| 10 | wt / wt | 46,XX | Wild type at the <i>SLC26A2</i> locus | Transferred attempt #1 |
| 11 | wt / p.Arg279Trp | 46,XY | Heterozygous carrier (maternal mutant allele) | Cryopreserved |
| 13 | wt / p.Arg279Trp | 46,XX | Heterozygous carrier (maternal mutant allele) | Cryopreserved |
| 14 | p.Arg178Ter / p.Arg279Trp | NT ^b | Compound heterozygous mutant (maternal and paternal mutant alleles) | Not used |
| 17 | p.Arg178Ter / p.Arg279Trp | NT | Compound heterozygous mutant (maternal and paternal mutant alleles) | Not used |
| 19 | wt / wt | 46,XY | Wild type at the <i>SLC26A2</i> locus | Transferred attempt #1 |

^aAlleles from embryos were imputed from parental haplotypes. ^bNT: not tested. ^cwt: wild type allele, without any of the parental mutations, as inferred by haplotype analysis.

Figures

Figure 1



Phenotype of the fetus at 17 weeks of gestation. A: Fetus appearance upon necropsy. Note the short trunk and limbs and the bowing of lower limbs with club feet. Hands with the characteristic “hitchhiker” thumb and feet with a wide gap between the first and second toes are also present. B: Whole-body radiography of

the fetus, revealing short long bones, thoracic constriction, thin ribs, and round ilia with unossified pubis. C: *SLC26A2* sequencing of the mother-father-child trio. Electropherograms depict heterozygous peaks corresponding to the c.559 C>T substitution (p.Arg178Ter) of paternal origin, and to the c.862 C>T substitution (p.Arg279Trp) of maternal origin.

3 – RESULTADOS

3.4 – Relato de caso: Validação da técnica de tomografia computadorizada com reconstrução tridimensional no diagnóstico pré-natal da hipocondrogênese: relato de um caso ilustrativo.

Artigo 4: “Validation of computed tomography with tridimensional reconstruction for the prenatal diagnosis of hypochondrogenesis: report of an illustrative case.”

Manuscrito em preparação a ser submetido ao periódico “Pediatric Radiology”.

Validation of computed tomography with tridimensional reconstruction for the prenatal diagnosis of hypochondrogenesis: report of an illustrative case.

Eduardo Preusser de Mattos^{1, 4}, Juliano Adams Perez², José Antônio de Azevedo Magalhães³, Lavinia Schüller-Faccini^{1, 4}, Maria Teresa Vieira Sanseverino^{1,*}

¹Medical Genetics Service, ²Radiology Service, and ³Fetal Medicine Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; ⁴Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author:

Maria Teresa V. Sanseverino, MD, PhD

Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS – Brazil, CEP 90035-903

E-mail: msanseverino@hcpa.ufrgs.br | Phone: +55 51 33598011 | Fax: +55 51

33598010

Conflicts of interest: None declared

Abstract

Several skeletal dysplasias, congenital defects of bone formation and/or development, manifest during pregnancy, but the definition of a specific condition by conventional ultrasonography (US) is usually difficult. We report the application of tridimensional computed tomography (3D-CT) in the accurate prenatal diagnosis of hypochondrogenesis, a lethal skeletal dysplasia, in a Brazilian patient. While US identified only a third of pathognomonic skeletal findings of hypochondrogenesis, prenatal 3D-CT showed the same diagnostic accuracy as postnatal radiography. The incorporation of 3D-CT as a standard imaging technique in the antenatal detection of skeletal dysplasias, especially in the severe cases, could positively influence pregnancy management, estimation of lethality and intervention planning.

Keywords

skeletal dysplasia, hypochondrogenesis, prenatal diagnosis, computed tomography, collagen II

Introduction

Skeletal dysplasias are a large, heterogeneous group of congenital malformations in which bone growth and/or development are compromised [1]. Approximately 450 different skeletal dysplasias are currently recognized, and about 40% can be identified in the prenatal period, many of which are severe and lethal conditions [2]. Although the molecular basis of many skeletal dysplasias has been recently elucidated, the primary diagnostic modality of specific conditions is still the radiographic examination [1, 2]. The correct definition of a skeletal dysplasia before delivery by ultrasonography (US) is usually technically challenging and, sometimes, impossible [3]. However, a precise *in utero* diagnosis has direct impact on the estimation of lethality and risk of recurrence, on pregnancy management, and on allocation of resources [2]. In this sense, the contribution of additional imaging techniques for the prenatal definition of specific skeletal dysplasias, such as tridimensional US, magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT), has been assessed by some studies [4–7]. Here, we report the use of CT in the prenatal diagnosis of hypochondrogenesis, a lethal skeletal dysplasia, in a Brazilian patient.

Case report

A non-consanguineous couple (36-years old mother and 44-years old father) was referred from a small and distant municipality to our reference Medical Genetics Service for genetic counseling during their second pregnancy due to detection of a female fetus with short long bones at 26 weeks of gestation. At this

time, US showed that the femur length (FL) was compatible to 21 weeks, and the FL: abdominal circumference (AC) ratio was 0.16, indicative of a lethal condition secondary to pulmonary hypoplasia. *In utero* radiographic imaging of the fetus was also attempted, but the resulting images were of very poor quality and did not contribute to a specific diagnosis. The FL:AC ratio decreased to 0.12 and, subsequently, to 0.11 at 31 and 35 weeks of gestation respectively, reinforcing the severe prognosis of the fetus. This last US also identified shortened long bones below the 3rd centile, AC and cephalic circumference (CC) above the 95th centile, and polyhydramnios.

Considering the risks of a long trip back home, and the limited medical resources in the couple's municipality, we sought to define the condition of the fetus before delivery, in order to better assess which interventions would be necessary to guarantee the best care to both the mother and her child. Taking into account the strong evidences of a lethal condition, CT with tridimensional reconstruction (3D-CT) was elected at 35 weeks of gestation as a way of evaluating the fetal skeleton in detail. This procedure¹ confirmed the US observations of disproportionate short stature, severely shortened long bones, macrocephaly, and thoracic constriction (Fig. 1a and 1b). Moreover, 3D-CT demonstrated absence of pubic ossification and a marked deficiency of ossification of the cervical vertebrae. These findings were pathognomonic of a collagen II skeletal dysplasia named hypochondrogenesis [8].

Birth occurred at 36+5 weeks by a cesarean section due to premature rupture of membranes, with Apgar scores of 3, 6, and 8 at 1, 5, and 10 minutes

¹ Essa é uma descrição parcial da metodologia utilizada. Na versão final do manuscrito será mencionado o aparelho específico que foi utilizado no exame, seus parâmetros de aquisição das imagens e a dose estimada de radiação.

respectively. The baby weighted 2,995 g, measured 36 cm, and had a CC of 37.5 cm, a TC of 33 cm, and an AC of 35 cm. Dysmorphological evaluation evidenced a syndromic appearance, with a large and ample cranial sutures, flat nasal bridge, micrognathia, cleft palate, short limbs, small thorax, and inverted nipples. The infant shortly developed a respiratory distress, requiring assisted ventilation and intensive care. Feeding was provided by a nasogastric tube. Whole-body postnatal radiographic imaging confirmed all prenatal findings that were suggested by 3D-CT and decisively established the diagnosis of hypochondrogenesis (Fig. 2a to 2d).

Taking into account the nine most common pathognomonic skeletal findings of hypochondrogenesis [7], it was possible to compare our diagnostic performance between prenatal 2D-US and 3D-CT, and postnatal radiography (Table 1). While 2D-US was able to identify only a third of skeletal findings commonly present in hypochondrogenesis, the first interpretation of 3D-CT imaging allowed us to immediately observe 5 out of 9 radiological characteristics of this skeletal dysplasia. Following a literature-based re-evaluation, we observed the prenatal 3D-CT examination revealed all diagnostic skeletal findings that were identifiable in the postnatal radiographies (see Table 1).

Discussion

Hypochondrogenesis is a lethal skeletal dysplasia that is capable of being diagnosed in the prenatal period [2]. However, it is usually very difficult to establish a specific antenatal diagnosis based on US examinations only, as is the case for many other skeletal dysplasias [3]. Here we report the application of 3D-CT as a

strategy for evaluating the fetal skeleton in detail, which prompted us to the diagnosis of a type II collagen-related abnormality. All prenatal findings suggestive of hypochondrogenesis evidenced by 3D-CT were confirmed in postnatal x-rays. As demonstrated in Table 1, prenatal 3D-CT displayed the same diagnostic performance of conventional postnatal radiographic evaluation. Although we did not immediately identify all characteristic skeletal findings of hypochondrogenesis in the CT images, a brief review of the literature was sufficient to suggest us the remaining abnormalities.

Similarly, Miyazaki and colleagues (2012) evaluated and correctly ascertained the specific skeletal dysplasia of 17 fetuses using 3D-CT, including one case of hypochondrogenesis [7]. The authors evaluated the percentage of postnatal radiographic skeletal findings that could be detected with 3D-CT prenatally, and evidenced that 44% and 100% of findings characteristic of hypochondrogenesis were detected by 3D-CT on the first evaluation and upon further retrospective evaluation, respectively.

The diagnostic value of CT modalities in the prenatal characterization of skeletal dysplasias has been proven particularly useful, as assessed by some studies in recent years. For instance, Ruano and colleagues (2004) compared helical 3D-CT (3D-HCT) to both conventional 2D-US and 3D-US in its capacity of identifying specific skeletal abnormalities in six patients (3 cases of achondroplasia, 2 of osteogenesis imperfecta type II, and 1 of chondrodysplasia punctata) [5]. Interestingly, 3D-HCT made possible the identification of 94.3% of the skeletal findings observable by postnatal radiographies, while 3D-US and 2D-US identified 77.1% and 51.4% of these findings, respectively. Moreover, the

specific diagnoses proposed by 3D-HCT examinations were correct in all cases, while the predictions based on 2D-US were accurate for only 4 patients. Similar findings were reported by Ulla and collaborators, that presented data on the contribution of 3D-CT for the prenatal diagnosis of osteogenesis imperfect types II and III, chondrodysplasia punctata and thanatophoric dysplasia [6]. The authors stressed out the special utility of 3D-CT in the evaluation of bone fractures and vertebral morphology, which usually provide clues to specific skeletal dysplasias [2].

Collectively, the findings reported here and by others [4–7] argue in favor of the application of CT modalities for the prenatal diagnosis of several skeletal dysplasias. Different lines of evidence have demonstrated the overall better performance of CT over both conventional and tridimensional US, as well as the high concordance of skeletal findings observable by prenatal CT and postnatal radiography. The precise antenatal diagnosis of a skeletal dysplasia is of utmost importance for several reasons, including lethality estimation, and definition of delivery method and subsequent interventions. Importantly, it has been suggested that 3D-CT could be especially useful in clinical management in institutions where molecular analysis is not readily available [6], as is commonly the case in developing areas. Additional assessments of the diagnostic value of CT in skeletal dysplasias are likely to confirm the observations discussed here, hopefully establishing it as an accurate prenatal detection method.

Acknowledgments

The authors would like to thank the family reported here for their collaboration for publication. We are also indebted to the members of the Brazilian Skeletal Dysplasia Network discussion list, especially Drs. Andrea Superti-Furga (University of Lausanne, Switzerland) and Denise P. Cavalcanti (Campinas State University, São Paulo, Brazil), for thoughtful comments on this case. EPM and LS-F are supported by the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development and by Research Grant 12-0467 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

References

1. Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C *et al.* Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A* 2011; 155A: 943–68.
2. Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL. Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias. *Genet Med* 2009; 11: 127–33.
3. Schramm T, Gloning KP, Minderer S, *et al.* Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34: 160–70.
4. Suzumura H, Kohno T, Nishimura G, Watanabe H, Arisaka O. Prenatal diagnosis of hypochondrogenesis using fetal MRI: a case report. *Pediatr Radiol* 2002; 32: 373–5.
5. Ruano R, Molho M, Roume J, Ville Y. Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias by combining two-dimensional and three-dimensional ultrasound and intrauterine three-dimensional helical computer tomography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004; 24: 134–40.
6. Ulla M, Aiello H, Cobos MP, *et al.* Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias: contribution of three-dimensional computed tomography. *Fetal Diagn Ther* 2011; 29: 238–47.
7. Miyazaki O, Nishimura G, Sago H, Horiuchi T, Hayashi S, Kosaki R. Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasia with 3D CT. *Pediatr Radiol* 2012; 42: 842–52.
8. Castori M, Brancati F, Scanderbeg AC, Dallapiccola B. Hypochondrogenesis. *Pediatr Radiol* 2006; 36: 460–1.

Figure legends

Fig 1: Fetal computed tomography with tridimensional reconstruction (3D-CT) at 35 weeks of gestation reveals signs of a collagen II skeletal dysplasia from the achondrogenesis type II/ hypochondrogenesis spectrum. Antero-posterior (a) and lateral (b) views of the reconstruction evidence a disproportionate short stature with severely shortened long bones, macrocephaly with ample sutures, absence of pubic ossification and nonossification of cervical vertebrae.

Fig 2: Postnatal radiological examination confirms the 3D-CT prenatal findings of the lethal skeletal dysplasia hypochondrogenesis. The infant presented with a large cranium with widely spaced sutures (a) and a defect in the ossification of the cervical vertebrae (b). Whole-body antero-posterior (c) and lateral (d) radiographies showed short long bones, small ribs and thoracic constriction, and hypoplastic pelvis with absence of pubic ossification.

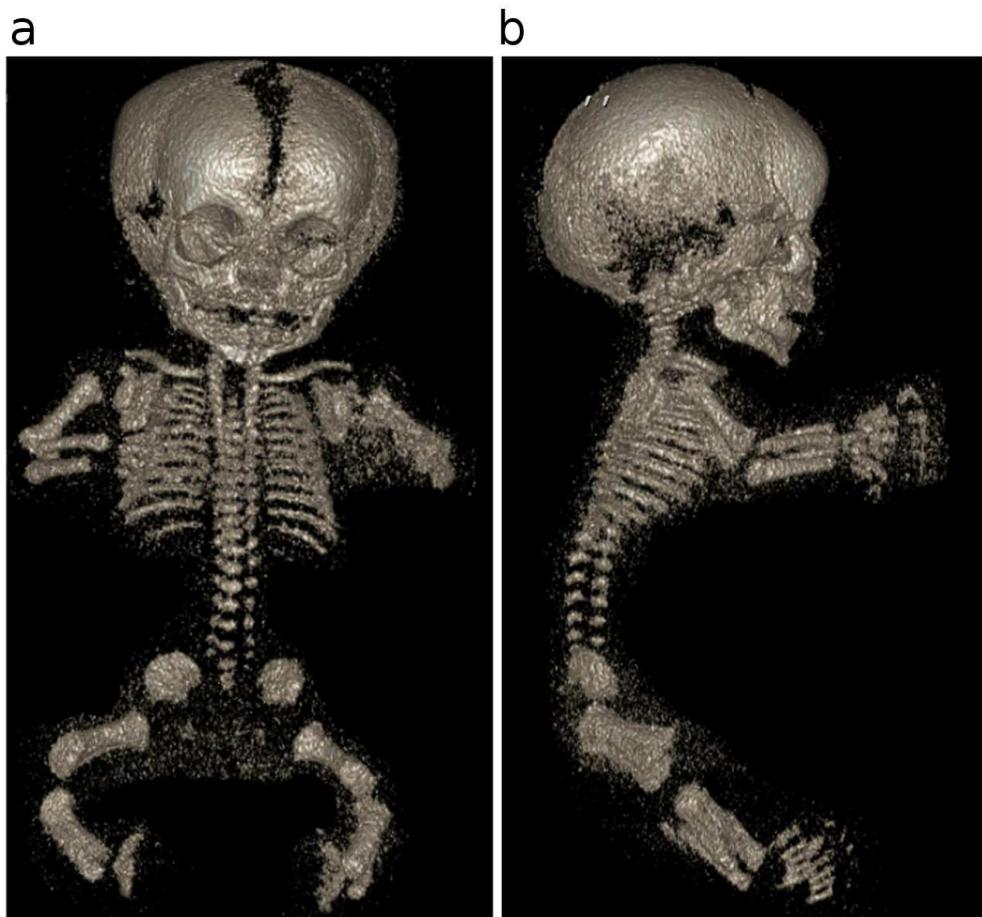
Tables

Table 1: Comparison of hypochondrogenesis skeletal findings identified in the patient by prenatal 3D-CT and postnatal radiography.

| Skeletal findings ^a | 2D-US | 3D-CT evaluation | Systematic 3D-CT review | Radiography |
|---------------------------------|-------------|------------------|-------------------------|-------------|
| Major findings | | | | |
| Narrow thorax | + | + | + | + |
| Nonossified pubic bones | | + | + | + |
| Nonossified cervical vertebrae | | + | + | + |
| Minor findings | | | | |
| Flat acetabular roofs | | | + | + |
| Ovoid, flat vertebral bodies | | | + | + |
| Hypoplastic iliac wings | | | + | + |
| Metaphyseal irregularity | | | + | + |
| Short broad femora | + | + | + | + |
| Short ribs | + | + | + | + |
| Total positive findings [n (%)] | 3/9 (33.3%) | 5/9 (55.6%) | 9/9 (100%) | 9/9 (100%) |

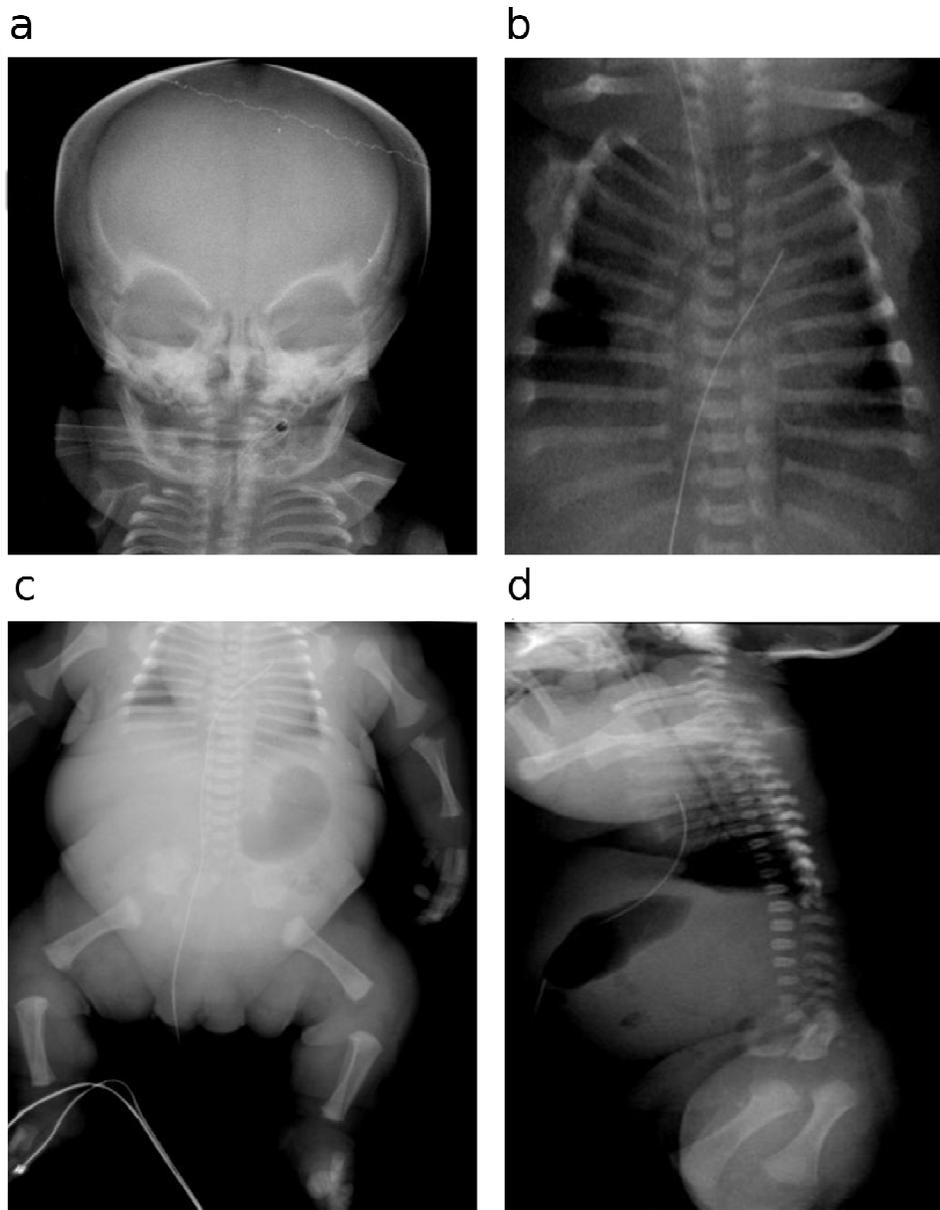
^aAs presented by Miyazaki *et al* [7].

Figure 1



Fetal computed tomography with tridimensional reconstruction (3D-CT) at 35 weeks of gestation reveals signs of a collagen II skeletal dysplasia from the achondrogenesis type II/ hypochondrogenesis spectrum. Antero-posterior (a) and lateral (b) views of the reconstruction evidence a disproportionate short stature with severely shortened long bones, macrocephaly with ample sutures, absence of pubic ossification and nonossification of cervical vertebrae.

Figure 2



Postnatal radiological examination confirms the 3D-CT prenatal findings of the lethal skeletal dysplasia hypochondrogenesis. The infant presented with a large cranium with widely spaced sutures (a) and a defect in the ossification of the cervical vertebrae (b). Whole-body antero-posterior (c) and lateral (d)

radiographies showed short long bones, small ribs and thoracic constriction, and hypoplastic pelvis with absence of pubic ossification.

3 – RESULTADOS

3.5 – Proposta de um protocolo operacional padrão para o diagnóstico de displasias esqueléticas com foco no período pré-natal.

Artigo 5: “Proposta de um protocolo operacional padrão para o diagnóstico de displasias esqueléticas com foco no período pré-natal.”

Manuscrito em preparação a ser submetido ao periódico “Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia”.

Proposta de um protocolo operacional padrão para o diagnóstico de displasias esqueléticas com foco no período pré-natal

Eduardo Preusser de Mattos^{1,2}, José Antônio de Azevedo Magalhães³, Júlio César Loguercio Leite¹, Temis Maria Félix¹, Luis Alberto Todeschini³, Denise Pontes Cavalcanti⁴, Lavinia Schüller-Faccini^{1,2}, Maria Teresa Vieira Sanseverino^{1,*}

¹Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil;

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; ³Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do

Sul, Porto Alegre, Brasil; ⁴Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil

*Autor correspondente:

Maria Teresa Vieira Sanseverino

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS – Brasil

CEP 90035-903 | E-mail: msanseverino@hcpa.ufrgs.br

Telefone: +55 51 33598011 | Fax: +55 51 33598010

Fontes de financiamento: EPM, LS-F e MTVS recebem suporte financeiro através do projeto número 12-0467 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Resumo

Objetivo: Apresentar uma proposta de protocolo operacional padrão para o aprimoramento do diagnóstico de displasias esqueléticas com manifestação no período pré-natal.

Métodos: Revisão da literatura médica a respeito das abordagens diagnósticas nas displasias esqueléticas. Foram consideradas também as diretrizes da Sociedade Internacional de Displasias Esqueléticas na elaboração deste trabalho.

Resultados: São apresentadas, em forma de chaves diagnósticas, as principais abordagens que devem ser tomadas por profissionais de saúde para uma identificação mais acurada de uma displasia esquelética, com foco especial naquelas condições detectadas durante a gravidez. Discutem-se as medidas ultrassonográficas essenciais que devem ser realizadas, assim como o estabelecimento de parâmetros de estimativa de letalidade, a fim de se propor uma hipótese diagnóstica bem orientada. Por fim, são apresentados mecanismos da avaliação subsequente pós-natal, com ênfase no exame físico, na história familiar e na investigação radiológica.

Conclusões: As abordagens aqui discutidas podem auxiliar no aprimoramento da identificação e do manejo de pacientes nos quais se observa uma displasia esquelética.

Palavras-chave: displasia esquelética, osteocondrodisplasia, diagnóstico pré-natal, aconselhamento genético

Abstract

Objective: To present a proposal of a standard operational protocol for the improvement in the diagnosis of skeletal dysplasias with prenatal manifestation.

Methods: Review of the medical literature regarding the diagnostic procedures in skeletal dysplasias. Guidelines of the International Skeletal Dysplasia Society were also considered in the elaboration of this work.

Results: The major diagnostic procedures of skeletal dysplasias, which should be considered by health professionals for a more accurate detection of these conditions, are presented as flowcharts. Special attention is given to the group of skeletal dysplasias that manifests during pregnancy and can be diagnosed prenatally. Essential ultrasonographic measurements are also discussed, as well as the estimations of lethality parameters, in order to make a well-oriented diagnostic hypothesis. Finally, mechanisms for the subsequent postnatal evaluation are presented, emphasizing the physical and radiological examination, as well as the family history of affected individuals.

Conclusions: The procedures discussed here may help to improve the identification and management of patients with a suspected skeletal dysplasia.

Keywords: skeletal dysplasia, osteochondrodysplasia, prenatal diagnosis, genetic counseling

Introdução

As displasias esqueléticas, ou osteocondrodismplasias (OCDs), representam um grande grupo de malformações congênitas que afetam o desenvolvimento e/ou o crescimento dos ossos longos [Warman et al., 2011]. São incluídas nessa categoria mais de 450 desordens distintas que podem ser herdadas como condições autossômicas dominantes e recessivas, ou ligadas ao X. As bases moleculares de aproximadamente metade das OCDs já são conhecidas e evidenciam alterações em proteínas dedicadas às mais diversas funções celulares [Warman et al., 2011].

Apesar de individualmente raras, as OCDs combinadas são um importante grupo de malformações congênitas que responde por uma parcela significativa das mortes perinatais [Krakow et al., 2008]. Estimativas recentes apontam para uma prevalência de 3,2 casos de OCDs para cada 10.000 nascimentos na América do Sul [Barbosa-Buck et al., 2012]. Apesar de muitas OCDs serem identificadas somente após o nascimento, cerca de 40% delas apresenta manifestação pré-natal [Krakow et al., 2009] e, nesse grupo, a letalidade pode chegar a 50% [Barbosa-Buck et al., 2012]. A detecção precoce de uma OCD antes do nascimento tem implicações importantes para o manejo da gravidez, o planejamento do parto e de possíveis intervenções pós-natais, a estimativa de letalidade e para um aconselhamento genético adequado dos pais de um feto em que se identifica uma displasia esquelética [Krakow et al., 2009]. Contudo, a maioria dos achados clínicos pré-natais sugestivos de uma OCD é inespecífica e necessita de uma avaliação detalhada por um profissional especializado no

diagnóstico de displasias esqueléticas. De fato, diferentes estudos têm evidenciado uma dificuldade na proposição de diagnósticos específicos antes do nascimento para muitas OCDs [Syngelaki et al., 2011], e a taxa de acurácia das hipóteses diagnósticas no período pré-natal não costuma ser maior do que 60 a 70% [Parilla et al., 2003; Schramm et al., 2009; Khalil et al., 2011].

No Brasil, não há estimativas sobre a especificidade do diagnóstico pré-natal para OCDs, mas um estudo recente de nosso grupo evidenciou uma correlação muito baixa entre a proposição de diagnósticos específicos durante o pré-natal e a confirmação da displasia em questão após o nascimento, em uma coorte de pacientes atendidos em um hospital terciário de referência em genética médica [Mattos et al., manuscrito em preparação]. Muitos fatores, como o acesso da população mais carente a serviços de medicina fetal e o treinamento de profissionais especializados, podem influenciar esse desfecho. Além disso, a legislação brasileira prevê a interrupção legal da gestação somente quando (i) o procedimento visa salvar a vida da mãe; (ii) a gestação é resultado de estupro; e (iii) a presença de feto anencéfalo é detectada [Faúndes et al., 2002; Diniz, 2007]. Ainda que existam alguns casos raros de decisão judicial favorável ao aborto de fetos com diagnóstico pré-natal bem estabelecido de uma condição letal, como evidenciado para muitas OCDs, a grande maioria das gestantes nessa situação procede com a gravidez a termo. Coletivamente, esses fatores tornam urgente a implementação de melhores práticas clínicas para a detecção e o manejo das OCDs no país.

Nesse sentido, o presente estudo traz a proposição de um protocolo operacional para uma investigação mais detalhada de pacientes com suspeita

pré-natal de displasias esqueléticas. A ultrassonografia e os raios-X, exames simples e baratos, disponíveis na maioria dos centros de saúde, aliados a uma detalhada avaliação clínica, podem ser ferramentas poderosas para a melhoria da caracterização das OCDs no Brasil.

Metodologia

O protocolo aqui apresentado foi desenvolvido a partir de uma vasta revisão da literatura a respeito das metodologias utilizadas no diagnóstico de displasias esqueléticas. Foram considerados para a análise artigos científicos que incluíam séries de casos, estudos do tipo caso-controle e opiniões de especialistas a respeito da detecção de OCDs com manifestação pré-natal. Alguns exemplos da literatura utilizada podem ser consultados nas referências deste trabalho [Meizner, 1997; Gonçalves et al., 2004; Rimoin et al., 2007; Dighe et al., 2008; Krakow et al., 2009; Cassart, 2010; Alanay and Lachman, 2011; Parnell and Phillips, 2012]. Adicionalmente, incluíram-se diretrizes de recomendação da Sociedade Internacional de Displasias Esqueléticas (www.isds.ch), órgão responsável pela nosologia e classificação das OCDs a nível mundial [Warman et al., 2011].

Resultados e Discussão

Abordagem inicial na suspeita pré-natal de uma OCD

Geralmente, o primeiro sinal de uma displasia esquelética de início pré-natal é observado pelo médico ginecologista ou obstetra em um exame ultrassonográfico de segundo trimestre, em que se avalia a morfologia fetal. Os achados clínicos mais comumente associados a displasias esqueléticas nesses casos são o de encurtamento dos ossos longos e/ou restrição de crescimento desproporcionada. Frente a essa situação, o médico deve suspeitar de uma condição genética do grupo das OCDs e proceder a uma investigação mais detalhada a fim de se formular, com maior grau de certeza, uma hipótese diagnóstica bem fundamentada. Para isso, é indispensável uma avaliação ultrassonográfica sistemática da morfologia fetal voltada para as displasias esqueléticas.

A figura 1 apresenta um exemplo de ficha clínica que pode ser utilizada para guiar o examinador na avaliação de parâmetros essenciais para um diagnóstico mais acurado. Hoje em dia, muitos equipamentos de ultrassom já incorporam automaticamente uma comparação das medidas fetais com valores de normalidade para a idade gestacional. Contudo, o registro de tais informações é imprescindível para uma futura revisão dos achados clínicos. Adicionalmente, como demonstrado na figura 1, além da medida cuidadosa de todos os ossos longos, o exame pré-natal direcionado para OCDs deve obter as medidas das circunferências cefálica, torácica e abdominal. Esses dados são importantes para o cálculo de razões preditoras de letalidade da condição identificada (ver adiante). A presença de outras anomalias estruturais, como polidactilia, fraturas e edemas, deve ser detalhadamente descrita, uma vez que tais informações podem contribuir para uma maior especificidade diagnóstica. O esquema apresentado na

figura 2 resume esses e outros desfechos importantes que devem ser incluídos na avaliação pré-natal sistemática, sempre que se suspeita de uma displasia esquelética.

Obtidos todos os parâmetros fundamentais para uma avaliação pré-natal detalhada, o próximo passo do médico assistente deve ser o de julgar os dados obtidos e identificar qual o tipo de alteração fetal presente. Por exemplo, deve-se diferenciar uma displasia esquelética de uma situação de restrição simétrica de crescimento intra-uterino, que não é classificada como uma OCD e apresenta etiologias distintas. Para isso, alguns achados são fortemente sugestivos de displasias esqueléticas, ainda que não sejam específicos de determinadas OCDs, como demonstrados na figura 3. Mais comumente, se verifica comprimento de ossos longos e circunferência torácica pequenos, ambos abaixo do percentil 5 para a idade gestacional do feto no momento da avaliação. Entretanto, outros indícios, como macrocefalia, craniossinostoses e uma razão circunferência torácica/ comprimento do pé menor do que 1, podem sugerir a presença de uma displasia esquelética.

Instituído o diagnóstico pré-natal de uma OCD, com a descrição detalhada de todos os achados, o próximo passo a ser tomado é a realização de uma estimativa de letalidade da condição detectada. A determinação precisa do grau de letalidade da displasia esquelética diagnosticada é extremamente importante para o planejamento do manejo da gestação, assim como para a preparação do casal e de seus médicos para o nascimento de uma criança que pode vir a precisar de tratamento intensivo imediatamente após o nascimento. De modo geral, quanto mais desproporcional o desenvolvimento da caixa torácica do feto,

mais provável é o nascimento de um bebê com hipoplasia pulmonar severa. Desse modo, a fim de se estimar o grau de comprometimento pulmonar do feto, podem ser calculadas duas razões fetais que têm se mostrado bastante informativas quanto à letalidade da displasia detectada. Como demonstrado na figura 4, tanto o comprimento do fêmur quanto a circunferência torácica divididos pela circunferência abdominal podem ser utilizados com esse propósito. A razão que incorpora o comprimento do fêmur é geralmente a mais utilizada, mas ambas as estimativas de letalidade parecem apresentar boa correlação com os desfechos pós-natais.

Os elementos discutidos até esse ponto compreendem basicamente todo o leque de opções que o ultrassom convencional pode contribuir para se tentar chegar a uma hipótese diagnóstica de uma OCD específica antes do nascimento. Adicionalmente, nos casos de centros que possuem equipamentos de ultrassom mais novos, a modalidade de visualização do feto em três dimensões pode ser de grande valia na avaliação da morfologia fetal, especialmente da face [Garjian et al., 2000; Krakow et al., 2003; Ulla et al., 2011]. Certas condições faciais, como o formato da cabeça e a presença de fendas orais, são mais bem avaliadas pela ultrassonografia tridimensional e podem ajudar a restringir o número de hipóteses diagnósticas formuladas. Alternativamente, novas modalidades diagnósticas pré-natais para a detecção de displasias esqueléticas estão sendo incorporadas na prática clínica, como a tomografia computadorizada [Miyazaki et al., 2012] e a ressonância magnética [Suzumura et al., 2002]. Contudo, essas metodologias não são abordadas aqui por se tratarem de técnicas mais complexas, que geralmente

não são prontamente acessíveis para a maior parte das gestantes atendidas em unidades básicas de saúde.

Abordagem pós-natal

Após o nascimento de um paciente com manifestações pré-natais de uma OCD, é extremamente importante que se obtenha a confirmação radiológica do diagnóstico proposto, mesmo tratando-se de natimortos, pois somente pelos exames radiológicos após o nascimento é possível confirmar ou descartar hipóteses diagnósticas levantadas no período pré-natal e estimar riscos de recorrência. Além disso, a avaliação esquelética por exame de raios-x permite a detecção de achados ósseos sutis, porém relevantes, que podem ser muito úteis na definição de uma displasia esquelética específica.

Concomitantemente à avaliação radiológica, faz-se necessário um exame clínico completo do paciente em investigação. A figura 5 traz um exemplo de fluxograma que pode ser utilizado para uma abordagem inicial de pacientes com suspeita clínica de uma OCD. O racional dessa avaliação sistemática baseia-se em dois pilares fundamentais: a mensuração das proporções corporais do paciente e a anamnese detalhada. A história familiar é fundamental nos casos de suspeita de uma OCD, assim como para qualquer outra doença genética, já que ela pode revelar o padrão de herança da condição em questão. Muitas OCDs são originadas por mutações dominantes *de novo*, de modo que o paciente avaliado é, geralmente, o único afetado na família; entretanto, uma parcela considerável das OCDs apresenta herança recessiva [Warman et al., 2011], fazendo com que famílias originárias de uniões consanguíneas tenham um risco de recorrência

considerável da condição em investigação. Similarmente, a mensuração de outros membros da família do paciente em avaliação pode ser útil para se descartar uma displasia esquelética, caso a baixa estatura do paciente seja de origem familiar, não relacionada a uma OCD. Além disso, a avaliação clínica pode determinar se o tipo de encurtamento observado no paciente é proporcionado ou desproporcionado, se o tronco é curto em relação aos membros, e se os membros são encurtados nas porções proximal, medial ou distal (encurtamento rizo-, meso- ou acromélico, respectivamente).

Finalmente, deve-se proceder à avaliação radiológica dos pacientes em investigação genética por suspeita pré-natal de uma OCD. A figura 6 mostra um exemplo de protocolo básico de rastreamento direcionado do esqueleto. Geralmente, uma única radiografia consegue abranger todo o corpo do recém-nascido ou natimorto e costuma ser suficiente para a avaliação clínica, desde que realizada nas posições ântero-posterior e lateral. As mãos e os pés geralmente necessitam de radiografias específicas.

Diversas abordagens são sugeridas para a avaliação sistemática do esqueleto na suspeita de uma OCD. Por um lado, a classificação das displasias esqueléticas vem sofrendo modificações substanciais em anos recentes e está entrando na era molecular, em que diferentes OCDs são agrupadas de acordo com o gene causador dos fenótipos observados. Contudo, a abordagem clínica mais comumente empregada na avaliação radiológica de OCDs visa à determinação dos componentes do esqueleto em que se encontram alterações [Offiah and Hall, 2003]. Por exemplo, se as anormalidades ósseas mais aparentes são localizadas nas metáfises, trata-se de uma displasia metafisária; se

anormalidades vertebrais e epifisárias são mais evidentes, pode-se estar lidando com uma displasia espondiloepifisária. Ainda que muitas OCDs apresentem achados de difícil identificação por profissionais iniciantes na área, esse sistema de avaliação radiológica costuma ser bastante útil na identificação de um grande grupo de OCDs. A partir do reconhecimento inicial, recomenda-se a utilização de um atlas fotográfico e/ou digital específico para OCDs, a fim de se comparar as alterações identificadas no paciente em estudo com aquelas anormalidades típicas da hipótese diagnóstica. Exemplos de bases de dados que o leitor pode consultar para maiores detalhes são o atlas de displasias esqueléticas de Spranger e colaboradores [Spranger et al., 2002] e os softwares REAMS [Hall and Washbrook, 2000] e London Dysmorphology Database [Fryns and de Ravel, 2002]. Adicionalmente, existem grupos de pesquisa brasileiros dedicados à identificação pré- e pós-natal das displasias esqueléticas, que oferecem suporte diagnóstico gratuito. Aos profissionais interessados, recomenda-se contatar o grupo de OCDs da Universidade Estadual de Campinas (www.oed.med.br), que fornece auxílio ao diagnóstico.

Conclusão

O conjunto de práticas diagnósticas proposto nesse trabalho tem como objetivo central aprimorar a identificação das displasias esqueléticas no Brasil. Ainda que seja uma área bastante desafiadora, com muitas particularidades que podem tornar difícil a formulação de hipóteses diagnósticas, a avaliação bem orientada de pacientes com suspeita de uma OCD é fundamental e facilita em

muito a elaboração de um diagnóstico mais preciso. A figura 7 apresenta um quadro com o resumo das informações aqui discutidas, enfatizando os procedimentos mínimos essenciais que devem ser sempre realizados durante a avaliação clínica de um paciente com suspeita de uma OCD. A difusão desse protocolo, especialmente para unidades básicas de atendimento pré-natal, pode contribuir para a melhoria do diagnóstico das displasias esqueléticas no Brasil.

Referências

- Alanay Y, Lachman RS. 2011. A review of the principles of radiological assessment of skeletal dysplasias. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 3: 163–78.
- Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti DP. 2012. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am. J. Med. Genet. A* 158A: 1038–45.
- Cassart M. 2010. Suspected fetal skeletal malformations or bone diseases: how to explore. *Pediatr. Radiol.* 40: 1046–51.
- Dighe M, Fligner C, Cheng E, Warren B, Dubinsky T. 2008. Fetal skeletal dysplasia: an approach to diagnosis with illustrative cases. *Radiographics* 28: 1061–77.
- Diniz D. 2007. Selective abortion in Brazil: the anencephaly case. *Dev. World Bioeth.* 7: 64–7.
- Faúndes A, Leocádio E, Andalaft J. 2002. Making legal abortion accessible in Brazil. *Reprod. Health Matters* 10: 120–7.
- Fryns J-P, de Ravel TJJ. 2002. London Dysmorphology Database, London Neurogenetics Database and Dysmorphology Photo Library on CD-ROM [Version 3] 2001R. M. Winter, M. Baraitser, Oxford University Press, ISBN 019851-780, pound sterling 1595. *Hum. Genet.* 111: 113.
- Garjian K V, Pretorius DH, Budorick NE, Cantrell CJ, Johnson DD, Nelson TR. 2000. Fetal skeletal dysplasia: three-dimensional US--initial experience. *Radiology* 214: 717–23.
- Gonçalves LF, Espinoza J, Mazor M, Romero R. 2004. Newer imaging modalities in the prenatal diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 24: 115–20.
- Hall CM, Washbrook J. 2000. Radiological electronic atlas of malformation syndromes and skeletal dysplasias (REAMS).
- Khalil A, Pajkrt E, Chitty LS. 2011. Early prenatal diagnosis of skeletal anomalies. *Prenat. Diagn.* 31: 115–24.
- Krakow D, Alanay Y, Rimoin LP, Lin V, Wilcox WR, Lachman RS, Rimoin DL. 2008. Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: a retrospective and prospective analysis. *Am. J. Med. Genet. A* 146A: 1917–24.
- Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL. 2009. Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias. *Genet. Med.* 11: 127–33.
- Krakow D, Williams J, Poehl M, Rimoin DL, Platt LD. 2003. Use of three-dimensional ultrasound imaging in the diagnosis of prenatal-onset skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 21: 467–72.

- Meizner I. 1997. Fetal skeletal malformations revisited: steps in the diagnostic approach. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 10: 303–6.
- Miyazaki O, Nishimura G, Sago H, Horiuchi T, Hayashi S, Kosaki R. 2012. Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasia with 3D CT. *Pediatr. Radiol.* 42: 842–52.
- Offiah AC, Hall CM. 2003. Radiological diagnosis of the constitutional disorders of bone. As easy as A, B, C? *Pediatr. Radiol.* 33: 153–61.
- Parilla B V, Leeth E a, Kambich MP, Chilis P, MacGregor SN. 2003. Antenatal detection of skeletal dysplasias. *J. Ultrasound Med.* 22: 255–8; quiz 259–61.
- Parnell SE, Phillips GS. 2012. Neonatal skeletal dysplasias. *Pediatr. Radiol.* 42 Suppl 1: S150–7.
- Rimoin DL, Cohn D, Krakow D, Wilcox W, Lachman RS, Alanay Y. 2007. The skeletal dysplasias: clinical-molecular correlations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1117: 302–9.
- Schramm T, Gloning KP, Minderer S, Daumer-Haas C, Hörtnagel K, Nerlich A, Tutschek B. 2009. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 34: 160–70.
- Spranger JW, Brill PW, Poznanski A. 2002. *Bone Dysplasias - An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development*, 2e. Press, OU, editor. New York.
- Suzumura H, Kohno T, Nishimura G, Watanabe H, Arisaka O. 2002. Prenatal diagnosis of hypochondrogenesis using fetal MRI: a case report. *Pediatr. Radiol.* 32: 373–5.
- Syngelaki A, Chelemen T, Dagklis T, Allan L, Nicolaidis KH. 2011. Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks. *Prenat. Diagn.* 31: 90–102.
- Ulla M, Aiello H, Cobos MP, Orioli I, García-Mónaco R, Etchegaray A, Igarzábal ML, Otaño L. 2011. Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias: contribution of three-dimensional computed tomography. *Fetal Diagn. Ther.* 29: 238–47.
- Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin DL, Robertson S, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. 2011. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am. J. Med. Genet. A* 155A: 943–68.

FIGURAS

Figura 1

Protocolo para a investigação pré-natal de displasias esqueléticas Avaliação sistemática da morfologia fetal

| Ossos longos | | Comprimento (mm) | Padrão para _____ semanas (mm) | Mineralização | Curvatura | Fraturas |
|--------------|----------|------------------|--------------------------------|---------------|-----------|----------|
| Fêmur | Direito | | | | | |
| | Esquerdo | | | | | |
| Tíbia | Direita | | | | | |
| | Esquerda | | | | | |
| Fíbula | Direita | | | | | |
| | Esquerda | | | | | |
| Úmero | Direito | | | | | |
| | Esquerdo | | | | | |
| Ulna | Direita | | | | | |
| | Esquerda | | | | | |
| Rádio | Direito | | | | | |
| | Esquerdo | | | | | |

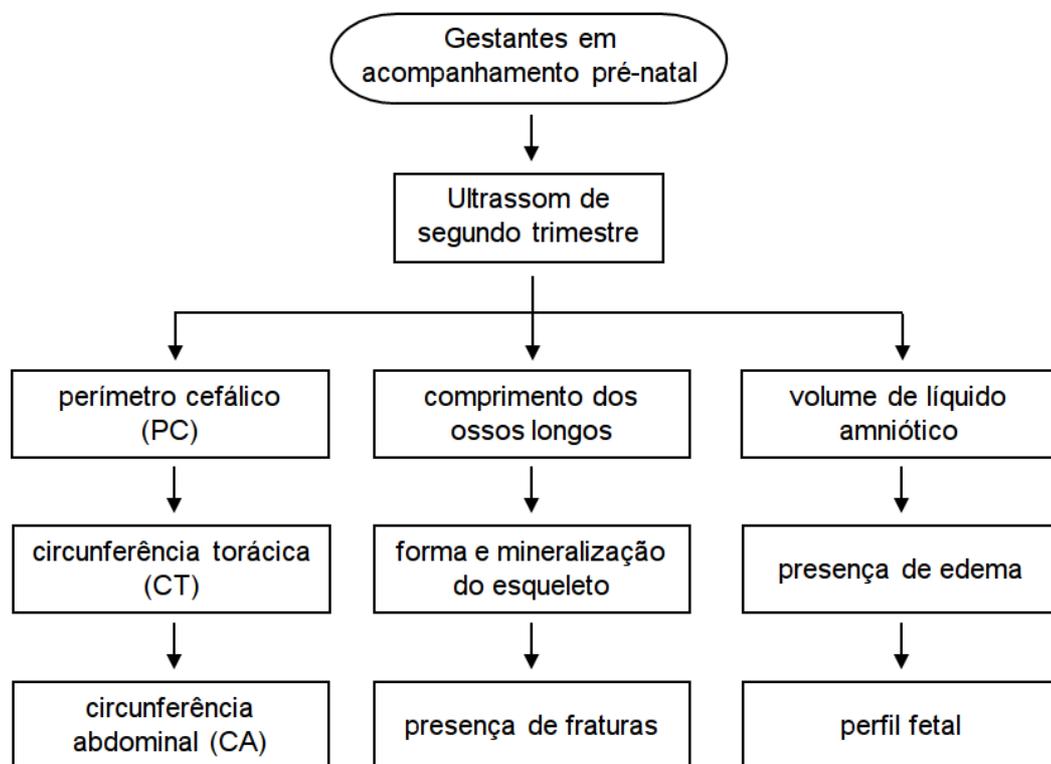
| | | |
|-------|---------------------|--|
| Ossos | Ausentes | |
| | Hipoplásticos | |
| | Outras malformações | |

| | | | | | | |
|--------------|------|-----------|--|--------------------------|------|--|
| Polidactilia | Mãos | Pré-axial | | Sindactilia | Mãos | |
| | | Pós-axial | | | Pés | |
| | Pés | Pré-axial | | Pé torto congênito | | |
| | | Pós-axial | | Comprimento dos pés (mm) | | |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|
| | | Medida (mm) | Padrão para _____ semanas (mm) | Razão CT / CA | |
| | Circunferência torácica (CT) | | | | |
| | Circunferência abdominal (CA) | | | | |
| Perímetro cefálico | Medida (mm) | Padrão para _____ semanas (mm) | | Razão comprimento do fêmur / CA | |
| | | | | | |
| Mineralização do crânio | Normal | Reduzida | | Razão CT / comprimento do pé | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Mineralização das vértebras | | | | | |
| Distância interpedicular | | | | | |

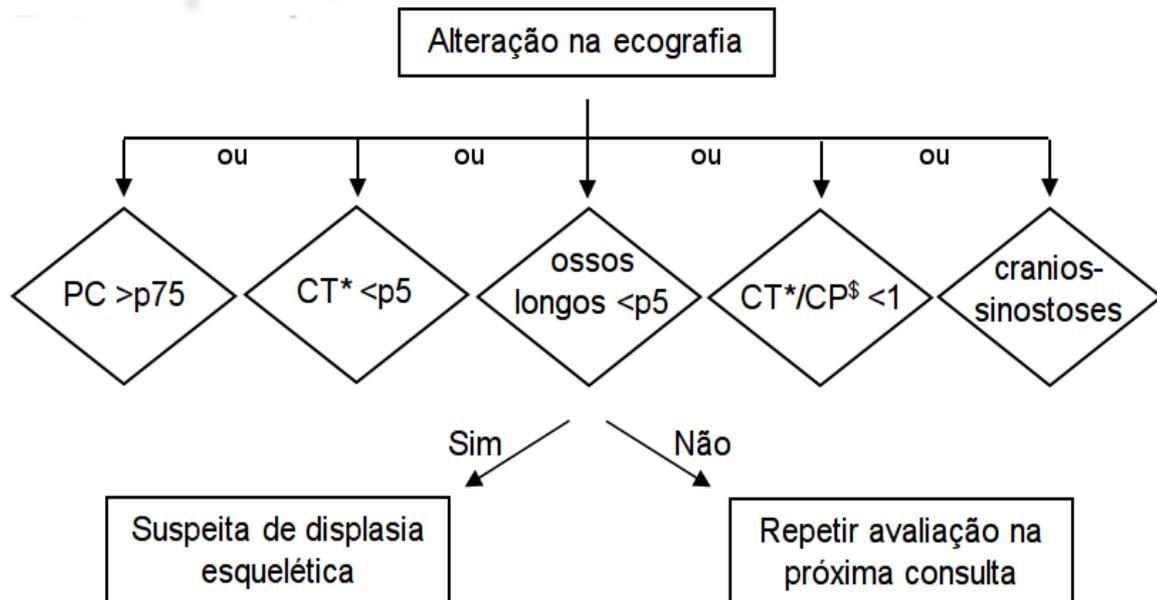
Exemplo de ficha clínica específica para a avaliação sistemática pré-natal da morfologia fetal em pacientes com suspeita de displasia esquelética. O protocolo foca na medida do comprimento de todos os ossos longos e sua comparação com valores de normalidade para a idade gestacional em que o feto se encontra. Além disso, ele possibilita a descrição detalhada de outras anormalidades estruturais do esqueleto, assim como uma estimativa da letalidade da condição identificada pelo cálculo de razões entre medidas corporais.

Figura 2



Esquema dos elementos essenciais a serem investigados por exame ultrassonográfico de segundo trimestre em gestações com suspeita de displasia esquelética. O detalhamento desses parâmetros é fundamental para a estimativa do grau de restrição de crescimento presente e para a formulação de uma hipótese diagnóstica.

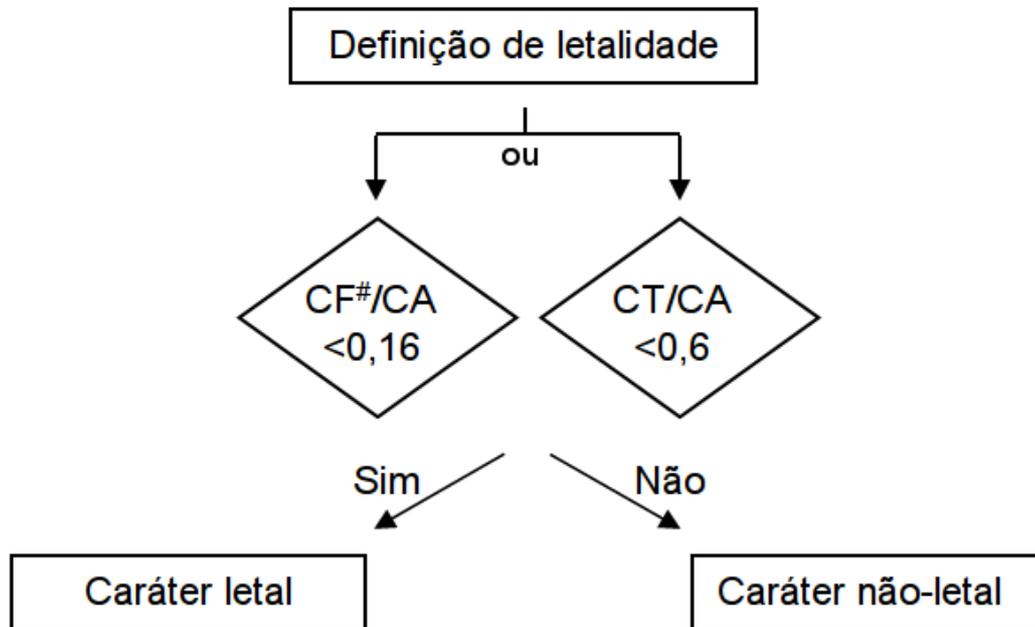
Figura 3



Achados ultrassonográficos sugestivos de uma displasia esquelética. Geralmente, o indicativo mais comum é a identificação de ossos longos com comprimento abaixo do percentil 5 para a idade gestacional, mas outras características, como constrição torácica e perímetro cefálico aumentado, podem estar presentes.

§Comprimento do pé.

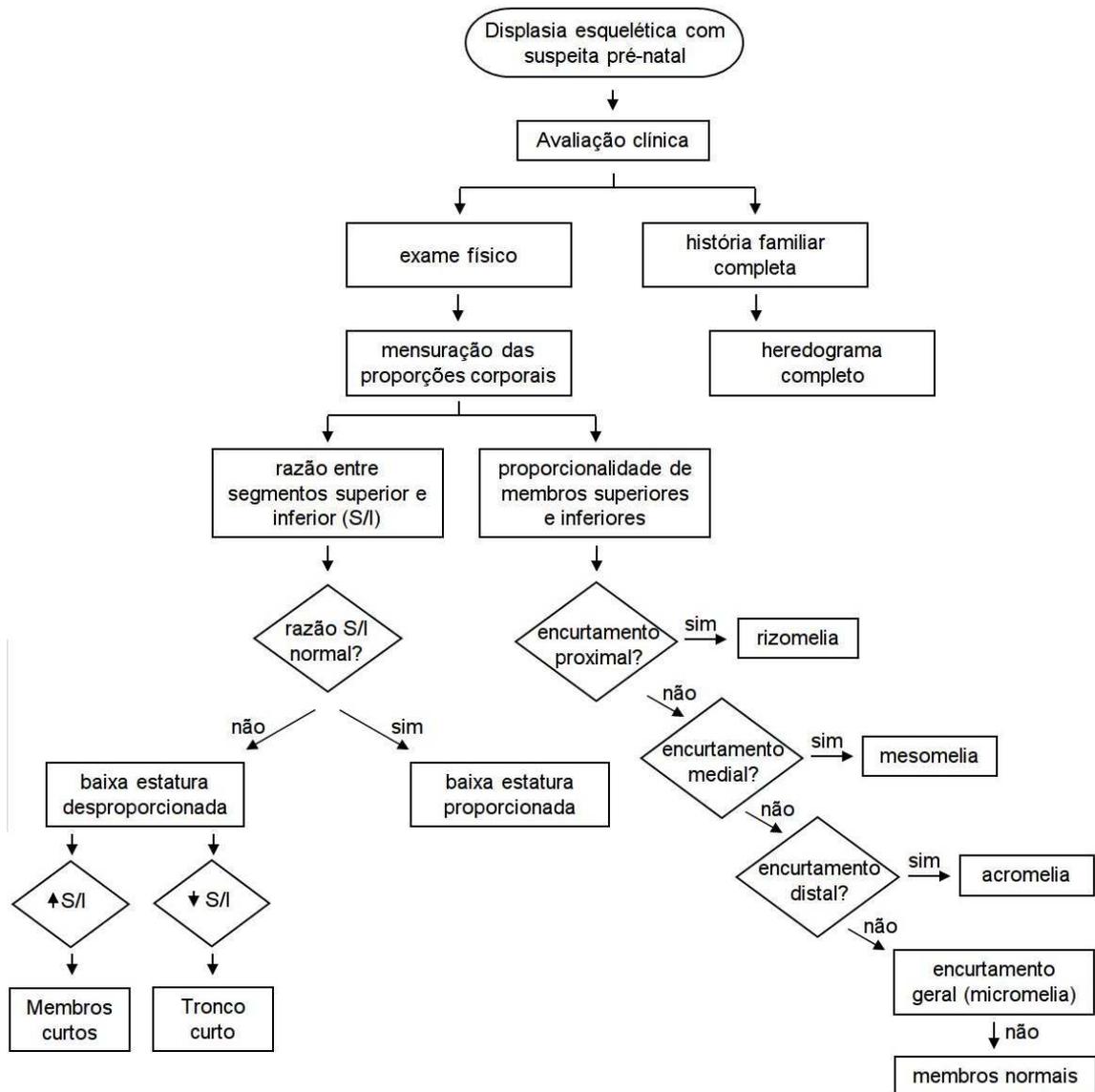
Figura 4



Razões utilizadas para se estimar o caráter letal de uma displasia esquelética identificada durante a gestação. Ambas as razões estimam a desproporcionalidade no crescimento dos segmentos corporais e refletem, indiretamente, o grau de hipoplasia pulmonar do feto devido a constrição torácica.

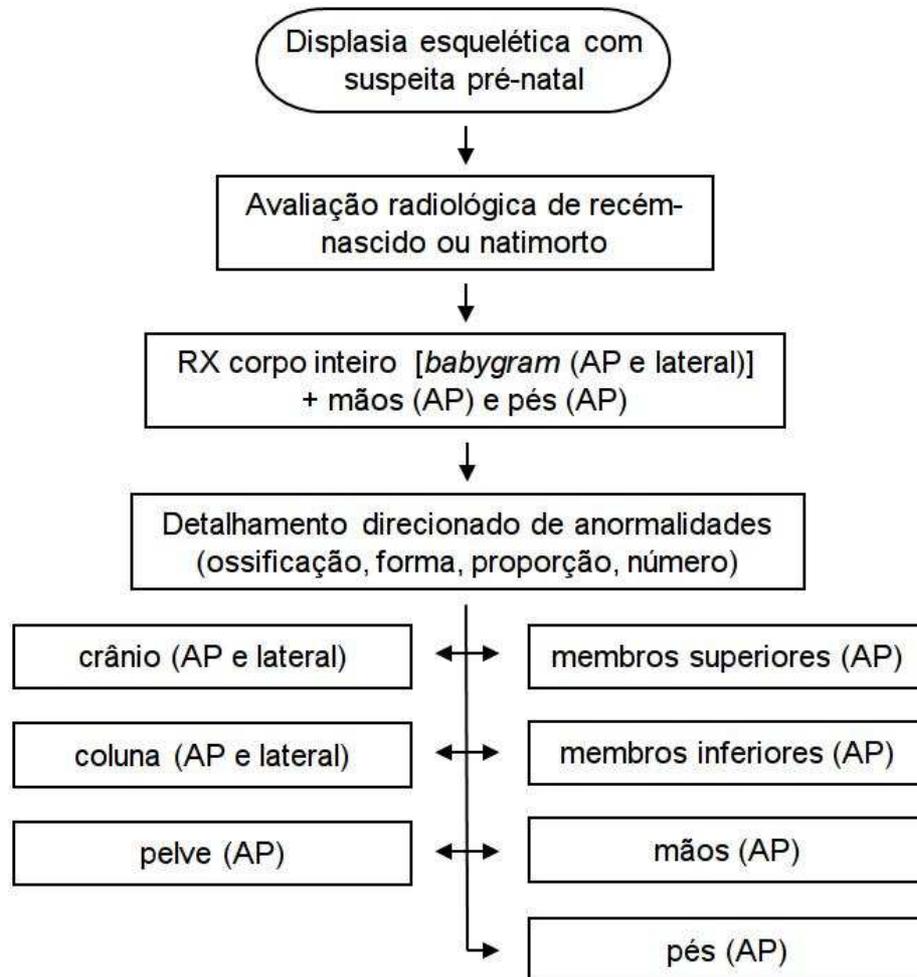
#Comprimento do fêmur.

Figura 5



Esquema diagnóstico para a caracterização clínica de pacientes com uma displasia esquelética avaliada após o nascimento, podendo ser aplicado tanto a crianças como a adultos. Os dois elementos centrais desse protocolo são a anamnese e a mensuração das proporções corporais.

Figura 6



Diretrizes para a avaliação radiológica de pacientes diagnosticados com uma displasia esquelética.

Figura 7

| <u>Procedimentos mínimos de avaliação clínica direcionada para OCDs</u> |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Ultrassonografia pré-natal direcionada• História familiar detalhada• Confirmação radiológica pós-natal* (mesmo se natimorto em qualquer idade gestacional)• Avaliação dismorfológica / fotos clínicas• Coleta de tecido e/ou sangue para extração de DNA |
| <p>*padrão-ouro diagnóstico</p> |

Quadro-resumo destacando os procedimentos essenciais que deve ser sempre realizados na avaliação clínica de pacientes com suspeita de uma OCD.

4 – DISCUSSÃO

Este trabalho abordou, de forma sistemática, o grande grupo de malformações congênitas conhecido como displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias (OCDs), com um enfoque especial nas condições que apresentam algum tipo de manifestação pré-natal. Cerca de 40% de todas as displasias esqueléticas podem ser identificadas durante a gestação por um exame ultrassonográfico de segundo trimestre (Krakow et al., 2008). Muitas das OCDs de detecção pré-natal são incompatíveis com a vida ou apresentam prognósticos em longo prazo bastante reservados, tornando sua identificação precoce muito importante. Além disso, o risco de recorrência de uma OCD pode variar de praticamente zero (mais precisamente, com risco igual ao da população em geral) a 50% (nas condições dominantes), tornando o diagnóstico preciso extremamente importante para o aconselhamento genético de casais com filhos afetados por uma OCD.

O presente trabalho inicia a abordagem sobre as displasias esqueléticas com manifestação pré-natal no Brasil apresentando os dados que compõem o manuscrito 1, dedicado à caracterização clínica e molecular de pacientes brasileiros diagnosticados com displasia campomélica, uma das OCDs com manifestação pré-natal mais prevalente, como demonstrado no manuscrito 2. A displasia campomélica é uma doença muito interessante do ponto de vista molecular, visto que seu gene causador, o *SOX9*, é um dos fatores de transcrição mais importantes durante o desenvolvimento do sistema esquelético (Wagner et al., 1994). Além disso, o *SOX9* parece ser um dos genes mais extensamente regulados do genoma humano, com diversos elementos regulatórios já caracterizados distribuídos ao longo de cerca de dois milhões de pares de bases ao redor do gene (Gordon et al., 2009). Pacientes com o fenótipo clássico da displasia campomélica quase sempre apresentam mutações na região codificante do *SOX9* que levam à haploinsuficiência desse fator de transcrição. Por outro lado, o espectro fenotípico de alterações relacionadas à displasia campomélica abrange também pacientes menos graves, que geralmente sobrevivem ao

período neonatal e podem chegar à idade adulta. Nesses casos, mutações gênicas no *SOX9* são incomuns, prevalecendo as deleções ou translocações de potenciais elementos regulatórios da expressão do *SOX9* (Gordon et al., 2009).

O manuscrito 1 se concentrou em casos de displasia campomélica clássica, que usualmente podem ser identificados durante a gestação. Ao todo, foram incluídos nesse estudo 12 pacientes provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul (n=4), São Paulo (n=7) e Pernambuco (n=1). Todos os indivíduos desse estudo apresentavam achados clínicos e radiológicos similares e característicos de casos letais de displasia campomélica. Uma criança tinha genitália externa feminina normal, apesar de o cariótipo apontar uma constituição cromossômica masculina (46,XY). Esse tipo de reversão sexual é comum na displasia campomélica e afeta até $\frac{3}{4}$ dos pacientes com cariótipo 46,XY (Sim et al., 2008). Para nove pacientes (66,7%), havia DNA disponível para a realização de sequenciamento do *SOX9*, e foram identificadas mutações em heterozigose em sete indivíduos. Seis dessas alterações corresponderam a variantes que inserem códons de parada prematuros na sequência nucleotídica do gene, possivelmente resultando na tradução de polipeptídeos truncados. Esse tipo de mutação é o mais comumente observado na displasia campomélica (ver tabela S3 do manuscrito 1). Adicionalmente, em um paciente foi detectada uma mutação no sítio acceptor de “splicing” do íntron 1 do *SOX9*, e essa alteração foi predita como patogênica por análises de conservação de sequência. Interessantemente, esse estudo não identificou nenhum paciente com alterações do tipo de troca de sentido (“missense”) na região gênica correspondente ao domínio de ligação ao DNA da proteína *SOX9*. Esse tipo de alteração é o segundo mais frequentemente observado em pacientes com displasia campomélica e responde por uma parcela significativa dos casos com reversão sexual. Para os dois pacientes com DNA disponível e que não tiveram mutações detectadas, planeja-se a realização da técnica de hibridização genômica comparativa para a detecção de variações patogênicas no número de cópias de elementos regulatórios da expressão do *SOX9*. Tentou-se ainda realizar correlações genótipo-fenótipo, mas não foram observadas diferenças entre os pacientes incluídos nesse estudo no que diz respeito aos achados clínicos e radiológicos e à severidade da doença.

As mutações identificadas no manuscrito 1 são novas e nunca foram previamente descritas, expandindo o espectro de alterações conhecidas que são associadas à displasia campomélica. Além disso, esse estudo relata uma das maiores coortes de pacientes com displasia campomélica já descritas, apresentando uma extensa caracterização clínica e radiológica que poderá auxiliar no diagnóstico de novos pacientes com suspeita clínica de displasia campomélica.

A seguir, o segundo manuscrito desse trabalho objetivou caracterizar as displasias esqueléticas identificadas durante a gravidez no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Como observado por outros autores (Orioli et al., 1986; Stoll et al., 1989; Krakow et al., 2008), foi identificado um pequeno grupo de OCDs que correspondeu à maioria dos diagnósticos realizados. Casos de osteogênese imperfeita tipo II e displasia tanatofórica corresponderam a 24,2% e 21,2% do total de pacientes incluídos no estudo, respectivamente. A displasia campomélica foi a terceira causa mais comum de OCD nessa coorte, um achado similar ao reportado por Rasmussen e colaboradores em 1996 (Rasmussen et al., 1996).

Como evidenciado por outros autores, nem todos os casos de displasia esquelética conseguem ser definitivamente diagnosticados, explicitando a grande heterogeneidade das condições incluídas nesse grupo de malformações congênitas. Em nosso estudo, um paciente não teve sua OCD identificada, apesar de todos os esforços para se chegar a um diagnóstico específico e de alterações claramente compatíveis com uma OCD. Esse achado também ressalta a complexidade clínica das displasias esqueléticas e a necessidade de uma abordagem multidisciplinar no atendimento de pacientes com anormalidades desse espectro.

Outro achado interessante do manuscrito 2 foi a observação da falta de associação entre o ano de diagnóstico dos casos pré-natais de OCD e a idade gestacional dos mesmos (Krakow et al., 2008; Schramm et al., 2009; Hatzaki et al., 2011). Estudos conduzidos em outros países – em sua maioria nações desenvolvidas – apontam para uma antecipação do diagnóstico de displasias

esqueléticas em anos recentes. Isso significa que avanços tecnológicos e científicos têm permitido a detecção de uma displasia esquelética em estágios mais iniciais da gravidez. Contudo, durante os 20 anos da análise retrospectiva descrita no manuscrito 2, isso não foi detectado. Além disso, a idade gestacional média de diagnóstico nessa coorte de pacientes foi igual a 23,3 semanas de gestação, com 60,6% dos pacientes sendo identificados no segundo trimestre. Outros trabalhos mostram a maior parte dos casos de OCDs com detecção pré-natal sendo identificados antes de 20 semanas de gestação (Krakow et al., 2008), enquanto nosso estudo observou apenas oito pacientes nessa categoria.

Como o aparente déficit diagnóstico de displasias esqueléticas caracterizado em nosso estudo foi observado em um hospital terciário de referência em genética médica, muito provavelmente outros centros de medicina fetal no Brasil apresentam a mesma característica. Diversos fatores podem estar associados a um menor sucesso diagnóstico das OCDs em nosso País. Provavelmente, as dificuldades de acesso ao exame ultrassonográfico pré-natal, que são experimentadas pela maior parte da população atendida pelo Sistema Único de Saúde, devem contribuir para esse achado. Adicionalmente, o Brasil apresenta uma alta taxa de gestações não-planejadas (Singh et al., 2010; Prietsch et al., 2011), o que pode contribuir para exames fetais mais tardios. Comumente, a maioria das gestantes atendidas pelo Estado brasileiro não realizam uma avaliação da morfologia fetal (Schuler-Faccini et al., 2013), o que poderia resultar na falta de antecipação diagnóstica das OCDs em anos mais recentes, como foi observado em nosso estudo, ainda que as técnicas de diagnóstico pré-natal no País tenham evoluído imensamente nas duas últimas décadas. Entretanto, o status do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como centro terciário de referência pode ter inserido um viés de seleção em nosso estudo, de modo que pacientes com condições de maior dificuldade diagnóstica poderiam ter sido referidos a esta Instituição. De fato, outros trabalhos estimam a acurácia do diagnóstico pré-natal de displasias esqueléticas em unidades básicas de saúde e, talvez, detectem casos mais fáceis de serem identificados. Ainda que não tenha sido possível estimar a precisão dos diagnósticos realizados antes do nascimento em nosso estudo, foi observada uma alta concordância entre a estimativa pré-

natal de letalidade e o desfecho pós-natal dos casos de OCDs. Contudo, essa avaliação só foi realizada em 12 dos 33 pacientes incluídos na investigação, ressaltando a necessidade de abordagens mais padronizadas para a avaliação de fetos com suspeita de displasia esquelética (tópico abordado no manuscrito 5 deste trabalho, como discutido a seguir). O manuscrito 2 compara ainda as frequências de OCDs individuais observadas em nosso estudo com aquelas de outras coortes de pacientes relatadas na literatura (Tretter et al., 1998; Parilla et al., 2003; Witters et al., 2008; Schramm et al., 2009; Khalil et al., 2011; Yeh et al., 2011; Stevenson et al., 2012; Barbosa-Buck et al., 2012) e mostra resultados similares.

O manuscrito 2 finaliza com uma discussão a respeito dos genes cujas mutações levaram aos fenótipos identificados no estudo. Ainda que as condições dos pacientes incluídos nesse trabalho não tenham sido investigadas por sequenciamento de DNA, a análise radiográfica de casos de OCDs costuma prever mutações em genes específicos com uma alta taxa de precisão (Rimoin et al., 2007). Nesse sentido, aproximadamente 80% dos pacientes incluídos em nosso estudo tiveram mutações preditas em apenas cinco genes candidatos. Esses dados são indicativos de uma alta prevalência de mutações em um pequeno conjunto de genes em pacientes com uma displasia esquelética de manifestação pré-natal. Adicionalmente, o fato de muitas condições serem resultantes de mutações em poucos genes argumenta a favor do desenvolvimento de uma estratégia de identificação molecular custo-efetiva que poderia ser introduzida no sistema público de saúde. Finalmente, o manuscrito 2 reportou uma coorte retrospectiva de pacientes com displasias esqueléticas de início pré-natal diagnosticados em um centro brasileiro de referência em genética médica. Esse estudo contribui significativamente para a caracterização epidemiológica das OCDs no Brasil e sugere uma necessidade urgente de implementação de melhores práticas de atenção pré-natal no País.

A partir dos dados reportados no manuscrito 2, dois pacientes apresentavam dados clínicos interessantes que justificaram a preparação de dois relatos de caso. O manuscrito 3 compreendeu a descrição de um feto morto com

diagnóstico final de uma displasia esquelética de fenótipo intermediário entre a atelosteogênese tipo 2 e a displasia diastrófica, duas condições recessivas graves originárias de mutações no gene *SLC26A2*. Esse caso foi emblemático, pois as mutações identificadas nesse paciente contribuíram para a instituição de um fenótipo levemente diferente daquele classicamente atribuído a essas alterações moleculares, evidenciado certo grau de expressividade variável da doença. Além disso, foi possível relatar, pela primeira vez, o estabelecimento de um protocolo de diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) para a atelosteogênese tipo 2/ displasia diastrófica, já que ambos os pais eram heterozigotos para as mutações identificadas no feto morto e desejavam uma nova gestação saudável. Apesar de não ser tecnicamente diferente de outros protocolos de PGD para doenças genéticas recessivas, o relato desse caso enriquece a literatura acerca das displasias esqueléticas e fornece evidências positivas de uma alternativa reprodutiva para casais com recorrência de gestações perdidas devido a OCDs letais.

O segundo relato de caso desse trabalho (manuscrito 4) corresponde à última paciente incluída nas análises do manuscrito 2, identificada no ano de 2013 e avaliada de forma prospectiva pelo Serviço de Genética Médica do HCPA. Esse manuscrito reporta a identificação pré-natal de uma paciente acometida pela displasia esquelética letal denominada de hipocondrogênese pela realização de um exame de tomografia computadorizada com reconstrução tridimensional (3D-CT). A utilização dessa modalidade diagnóstica no período pré-natal tem sido enfatizada por diversos autores como uma estratégia de se aumentar a precisão dos diagnósticos de OCDs antes do nascimento (Ruano et al., 2004; Ulla et al., 2011; Miyazaki et al., 2012). Similarmente, o manuscrito 4 demonstra que a realização do exame de 3D-CT possibilitou a visualização das mesmas características ósseas identificadas por uma radiografia convencional pós-natal, ainda considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de OCDs. Esse achado reforça o valor diagnóstico das novas tecnologias de imagem na identificação pré-natal mais precisa de displasias esqueléticas, o que pode vir a ter um impacto significativo no manejo de gestações com suspeita de uma OCD.

Finalmente, o manuscrito final desse trabalho apresenta uma proposta de protocolo operacional padrão para o diagnóstico de displasias esqueléticas, com um foco especial no período pré-natal. O principal objetivo dessa publicação é divulgar para a comunidade médica brasileira as diretrizes internacionalmente aceitas para a correta identificação de pacientes com displasias esqueléticas específicas pela utilização de técnicas simples e disponíveis na maior parte dos centros de saúde. Como observado no manuscrito 1, o diagnóstico das OCDs, principalmente daquelas com manifestação pré-natal, é bastante desafiador, mesmo para profissionais com experiência na área. Desse modo, o estabelecimento de um guia com técnicas padronizadas para a identificação e o manejo de casos de displasia esquelética poderia ser muito útil para melhorar o diagnóstico dessas condições no Brasil, especialmente nas unidades básicas de saúde que atendem a maior parte das gestantes do País.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Akiyama H, Chaboissier M-C, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813–28.
- Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, *et al.* (2004) Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18:1072–87.
- Akiyama H, Kamitani T, Yang X, Kandyil R, Bridgewater LC, Fellous M, Mori-Akiyama Y, de Crombrughe B (2005) The transcription factor Sox9 is degraded by the ubiquitin-proteasome system and stabilized by a mutation in a ubiquitin-target site. *Matrix Biol* 23:499–505.
- Argentaro A, Sim H, Kelly S, Preiss S, Clayton A, Jans D a, Harley VR (2003) A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem* 278:33839–47.
- Bagheri-Fam S, Ferraz C, Demaille J, Scherer G, Pfeifer D (2001) Comparative genomics of the SOX9 region in human and Fugu rubripes: conservation of short regulatory sequence elements within large intergenic regions. *Genomics* 78:73–82.
- Bagheri-Fam S, Barrionuevo F, Dohrmann U, Günther T, Schüle R, Kemler R, Mallo M, Kanzler B, Scherer G (2006) Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal Sox9 expression pattern. *Dev Biol* 291:382–97.
- Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti DP (2012) Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am J Med Genet A* 158A:1038–45.
- Beaulieu Bergeron M, Lemyre E, Rypens F, Scherer G, Lemieux N, Fournet J-C (2009) Diagnosis of true hermaphroditism in a fetus with acampomelic campomelic dysplasia. *Prenat Diagn* 29:528–30.
- Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16:174–8.
- Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A, Thomas S, Bruland O, David M, Nicolino M, *et al.* (2011) Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J Med Genet* 48:825–30.
- Bernard P (2003) Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum Mol Genet* 12:1755–65.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85–9.
- Bien-Willner G a, Stankiewicz P, Lupski JR (2007) SOX9cre1, a cis-acting regulatory element located 1.1 Mb upstream of SOX9, mediates its enhancement through the SHH pathway. *Hum Mol Genet* 16:1143–56.

- Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, Kwok C, Goodwin LL, Sillence DO, Sinclair AH (1996) A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum Mol Genet* 5:1625–30.
- Chen S-Y, Lin S-J, Tsai L-P, Chou Y-Y (2012) Sex-reversed acampomelic campomelic dysplasia with a homozygous deletion mutation in SOX9 gene. *Urology* 79:908–11.
- Cheng A, Genever PG (2010) SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *J Bone Miner Res* 25:2680–9.
- Corbani S, Chouery E, Eid B, Jalkh N, Ghoch JA, Mégarbané A (2011) Mild Campomelic Dysplasia: Report on a Case and Review. *Mol Syndromol* 1:163–8.
- Cost NG, Ludwig AT, Wilcox DT, Rakheja D, Steinberg SJ, Baker L a (2009) A novel SOX9 mutation, 972delC, causes 46,XY sex-reversed campomelic dysplasia with nephrocalcinosis, urolithiasis, and dysgerminoma. *J Pediatr Surg* 44:451–4.
- Dudek KA, Lafont JE, Martinez-Sanchez A, Murphy CL (2010) Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes. *J Biol Chem* 285:24381–7.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525–30.
- Friedrich U, Schaefer E, Meinecke P, Scherer G (2000) SOX9 mutation in a previously published case of campomelic dysplasia without overt campomelia. *Clin Dysmorphol* 9:233.
- Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H (2009) Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1198–204.
- Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, Boizet-Bonhoure B (2002) A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11199–204.
- Gentilin B, Forzano F, Bedeschi MF, Rizzuti T, Faravelli F, Izzi C, Lituania M, Rodriguez-Perez C, Bondioni MP, Savoldi G, *et al.* (2010) Phenotype of five cases of prenatally diagnosed campomelic dysplasia harboring novel mutations of the SOX9 gene. *Ultrasound Obstet Gynecol* 36:315–23.
- Gene Ontology Database, disponível em www.geneontology.org.
- Georg I, Bagheri-Fam S, Knowler KC, Wieacker P, Scherer G, Harley VR (2010) Mutations of the SRY-responsive enhancer of SOX9 are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Sex Dev* 4:321–5.
- Giordano J, Prior HM, Bamforth JS, Walter M a (2001) Genetic study of SOX9 in a case of campomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 98:176–81.
- Gopakumar H, Superti-Furga A, Unger S, Scherer G, Rajiv PK, Nampoothiri S (2013) Acampomelic Form of Campomelic Dysplasia with SOX9 Missense Mutation. *Indian J Pediatr*.
- Gordon CT, Tan TY, Benko S, Fitzpatrick D, Lyonnet S, Farlie PG (2009) Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease. *J Med Genet* 46:649–56.

- Hattori T, Eberspaecher H, Lu J, Zhang R, Nishida T, Kahyo T, Yasuda H, de Crombrughe B (2006) Interactions between PIAS proteins and SOX9 result in an increase in the cellular concentrations of SOX9. *J Biol Chem* 281:14417–28.
- Hattori T, Coustry F, Stephens S, Eberspaecher H, Takigawa M, Yasuda H, de Crombrughe B (2008) Transcriptional regulation of chondrogenesis by coactivator Tip60 via chromatin association with Sox9 and Sox5. *Nucleic Acids Res* 36:3011–24.
- Hattori T, Müller C, Gebhard S, Bauer E, Pausch F, Schlund B, Bösl MR, Hess A, Surmann-Schmitt C, von der Mark H, *et al.* (2010) SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development* 137:901–11.
- Hatzaki, A, Sifakis, S, Apostolopoulou, D, Bouzarelou, D, Konstantinidou, A, Kappou, D, Sideris, A, Tzortzis, E, Athanassiadis, A, Florentin, L, Theodoropoulos, P, Makatsoris, C, Karadimas, C, Velissariou, V. 2011. FGFR3 related skeletal dysplasias diagnosed prenatally by ultrasonography and molecular analysis: presentation of 17 cases. *Am. J. Med. Genet. A* 155A: 2426–35.
- Haudenschild DR, Chen J, Pang N, Lotz MK, D’Lima DD (2010) Rho kinase-dependent activation of SOX9 in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 62:191–200.
- Hsiao H-P, Tsai L-P, Chao M-C, Tseng H-I, Chang YC (2006) Novel SOX9 gene mutation in campomelic dysplasia with autosomal sex reversal. *J Formos Med Assoc* 105:1013–6.
- Huang W, Chung UI, Kronenberg HM, de Crombrughe B (2001) The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:160–5.
- Jakobsen LP, Ullmann R, Christensen SB, Jensen KE, Mølsted K, Henriksen KF, Hansen C, Knudsen M a, Larsen L a, Tommerup N, *et al.* (2007) Pierre Robin sequence may be caused by dysregulation of SOX9 and KCNJ2. *J Med Genet* 44:381–6.
- Khalil, A, Pajkrt, E, Chitty, LS. 2011. Early prenatal diagnosis of skeletal anomalies. *Prenat. Diagn.* 31: 115–24.
- Kiefer JC (2007) Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn* 236:2356–66.
- Kim H-Y, Yoon CH, Kim G-H, Yoo H-W, Lee BS, Kim KS, Kim EA-R (2011) A case of campomelic dysplasia without sex reversal. *J Korean Med Sci* 26:143–5.
- Krakow, D, Alanay, Y, Rimoin, LP, Lin, V, Wilcox, WR, Lachman, RS, Rimoin, DL (2008) Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: a retrospective and prospective analysis. *Am. J. Med. Genet. A* 146A:1917–24.
- Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL (2009) Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias. *Genet Med* 11:127–33.
- Kwok C, Weller PA, Guioli S, Foster JW, Mansour S, Zuffardi O, Punnett HH, Dominguez-Steglich MA, Brook JD, Young ID (1995) Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am J Hum Genet* 57:1028–36.
- Lecointre C, Pichon O, Hamel A, Heloury Y, Michel-Calemard L, Morel Y, David A, Le Caignec C (2009) Familial acampomelic form of campomelic dysplasia caused by a 960 kb deletion upstream of SOX9. *Am J Med Genet A* 149A:1183–9.

- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B (1997) SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17:2336–46.
- Long F, Ornitz DM (2013) Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a008334.
- Malki S, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B (2005a) Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res* 309:468–75.
- Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Méjean C, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B (2005b) Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J* 24:1798–809.
- Maroteaux P, Spranger J, Opitz JM, Kucera J, Lowry RB, Schimke RN, Kagan SM (1971) [The campomelic syndrome]. *Presse Med* 79:1157–62.
- Martinez-Sanchez A, Dudek KA, Murphy CL (2012) Regulation of human chondrocyte function through direct inhibition of cartilage master regulator SOX9 by microRNA-145 (miRNA-145). *J Biol Chem* 287:916–24.
- Massardier J, Roth P, Michel-Calemard L, Rudigoz RC, Bouvier R, Dijoud F, Arnould P, Combourieu D, Gaucherand P (2008) Campomelic dysplasia: echographic suspicion in the first trimester of pregnancy and final diagnosis of two cases. *Fetal Diagn Ther* 24:452–7.
- Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Kadono I, Ishiguro N, Nishimura G (2013) A novel SOX9 H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161A:2528-34.
- McDowall S, Argentaro a, Ranganathan S, Weller P, Mertin S, Mansour S, Tolmie J, Harley V (1999) Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J Biol Chem* 274:24023–30.
- Meyer J, Südbek P, Held M, Wagner T, Schmitz ML, Bricarelli FD, Eggermont E, Friedrich U, Haas O a, Kobelt a, *et al.* (1997) Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 6:91–8.
- Michel-Calemard L, Lesca G, Morel Y, Boggio D, Plauchu H, Attia-Sobol J (2004) Campomelic acampomelic dysplasia presenting with increased nuchal translucency in the first trimester. *Prenat Diagn* 24:519–23.
- Miyazaki, O, Nishimura, G, Sago, H, Horiuchi, T, Hayashi, S, Kosaki, R. 2012. Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasia with 3D CT. *Pediatr. Radiol.* 42: 842–52.
- Moog U, Jansen NJ, Scherer G, Schrandner-Stumpel CT (2001) Acampomelic campomelic syndrome. *Am J Med Genet* 104:239–45.
- Murakami S, Kan M, McKeenan WL, de Crombrughe B (2000a) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1113–8.
- Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B (2000b) Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 275:3687–92.

- Nakamura Y, He X, Kato H, Wakitani S, Kobayashi T, Watanabe S, Iida A, Tahara H, Warman ML, Watanapokasin R, *et al.* (2012) Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage. *Appl Biochem Biotechnol* 166:64–71.
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P (1997) SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183:108–21.
- Ninomiya S, Yokoyama Y, Teraoka M, Mori R, Inoue C, Yamashita S, Tamai H, Funato M, Seino Y (2000) A novel mutation (296 del G) of the SOX9 gene in a patient with campomelic syndrome and sex reversal. *Clin Genet* 58:224–7.
- Okamoto T, Nakamura E, Nagaya K, Hayashi T, Mukai T, Fujieda K (2010) Patient reports: Two novel frameshift mutations in the SOX9 gene in two patients with campomelic dysplasia who showed long-term survival. *J Pediatr Endocrinol Metab* 23:1189–93.
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; disponível em <http://www.omim.org>.
- Orioli, IM, Castilla, EE, Barbosa-Neto, JG. 1986. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J. Med. Genet.* 23:328–32.
- Pan Q, Yu Y, Chen Q, Li C, Wu H, Wan Y, Ma J, Sun F (2008) Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol* 217:228–41.
- Parilla, B V, Leeth, E a, Kambich, MP, Chilis, P, MacGregor, SN. 2003. Antenatal detection of skeletal dysplasias. *J. Ultrasound Med.* 22:255–8.
- Pfeifer D, Kist R, Dewar K, Devon K, Lander ES, Birren B, Korniszewski L, Back E, Scherer G (1999) Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9: evidence for an extended control region. *Am J Hum Genet* 65:111–24.
- Pop R, Zaragoza M V, Gaudette M, Dohrmann U, Scherer G (2005) A homozygous nonsense mutation in SOX9 in the dominant disorder campomelic dysplasia: a case of mitotic gene conversion. *Hum Genet* 117:43–53.
- Preiss S, Argentaro a, Clayton a, John a, Jans D a, Ogata T, Nagai T, Barroso I, Schafer a J, Harley VR (2001) Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J Biol Chem* 276:27864–72.
- Prietsch, SOM, González-Chica, DA, Cesar, JA, Mendoza-Sassi, RA. 2011. [Unplanned pregnancy in Southern Brazil: prevalence and associated factors]. *Cad. Saude Publica* 27:1906–16.
- Pritchett J, Athwal V, Roberts N, Hanley N a, Hanley KP (2011) Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: lessons from development. *Trends Mol Med* 17:166–74.
- Rasmussen, S a, Bieber, FR, Benacerraf, BR, Lachman, RS, Rimoin, DL, Holmes, LB (1996) Epidemiology of osteochondrodysplasias: changing trends due to advances in prenatal diagnosis. *Am. J. Med. Genet.* 61:49–58.
- Rimoin, DL, Cohn, D, Krakow, D, Wilcox, W, Lachman, RS, Alanay, Y. 2007. The skeletal dysplasias: clinical-molecular correlations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1117: 302–9.

- Ruano, R, Molho, M, Roume, J, Ville, Y (2004) Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias by combining two-dimensional and three-dimensional ultrasound and intrauterine three-dimensional helical computer tomography. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 24:134–40.
- Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H (2007) S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep* 8:504–9.
- Sanchez-Castro M, Gordon CT, Petit F, Nord AS, Callier P, Andrieux J, Guérin P, Pichon O, David A, Abadie V *et al* (2013) Congenital heart defects in patients with deletions upstream of SOX9. *Hum Mutat* 34:12:1628-31.
- Schafer a J, Dominguez-Steglich M a, Guioli S, Kwok C, Weller P a, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN (1995) The role of SOX9 in autosomal sex reversal and campomelic dysplasia. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350:271–7.
- Schramm, T, Gloning, KP, Minderer, S, Daumer-Haas, C, Hörtnagel, K, Nerlich, A, Tutschek, B (2009) Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 34:160–70.
- Schuler-Faccini, L, Sanseverino, MT V, de Rocha Azevedo, LM, Moorthie, S, Alberg, C, Chowdhury, S, Sagoo, GS, Burton, H, Nacul, LC. 2013. Health needs assessment for congenital anomalies in middle-income countries: Examining the case for neural tube defects in Brazil. *J. Community Genet.*
- Sekido R, Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453:930–4.
- Shotelersuk V, Jaruratanasirikul S, Sinthuwiwat T, Janjindamai W (2006) A novel nonsense mutation, E150X, in the SOX9 gene underlying campomelic dysplasia. *Genet Mol Biol* 29:617–20.
- Sim H, Argentaro A, Harley VR (2008) Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. *Trends Endocrinol Metab* 19:213–22.
- Singh, S, Sedgh, G, Hussain, R (2010) Unintended pregnancy: worldwide levels, trends, and outcomes. *Stud. Fam. Plann.* 41:241–50.
- Smyk M, Obersztyn E, Nowakowska B, Bocian E, Cheung SW, Mazurczak T, Stankiewicz P (2007) Recurrent SOX9 deletion campomelic dysplasia due to somatic mosaicism in the father. *Am J Med Genet A* 143A:866–70.
- Sock E, Pagon RA, Keymolen K, Lissens W, Wegner M, Scherer G (2003) Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. *Hum Mol Genet* 12:1439–47.
- Spranger JW, Brill PW, Poznanski A (2002) *Bone Dysplasias - An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development*. 2nd edition. Oxford University Press, New York, 613 pp.
- Staffler A, Hammel M, Wahlbuhl M, Bidlingmaier C, Flemmer AW, Pagel P, Nicolai T, Wegner M, Holzinger A (2010) Heterozygous SOX9 mutations allowing for residual DNA-binding and transcriptional activation lead to the acampomelic variant of campomelic dysplasia. *Hum Mutat* 31:E1436–44.
- Stevenson, DA, Carey, JC, Byrne, JLB, Srisukhumbowornchai, S, Feldkamp, ML. 2012. Analysis of skeletal dysplasias in the Utah population. *Am. J. Med. Genet. A* 158A:1046–54.

- Stoeva R, Grozdanova L, Scherer G, Krasteva M, Bausch E, Krastev T, Linev a, Stefanova M (2011) A novel SOX9 nonsense mutation, q401x, in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal. *Genet Couns* 22:49–53.
- Stoll, C, Dott, B, Roth, MP, Alembik, Y (1989) Birth prevalence rates of skeletal dysplasias. *Clin. Genet.* 35:88–92.
- Südbeck P, Schmitz ML, Baeuerle PA, Scherer G (1996) Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat Genet* 13:230–2.
- Tew SR, Clegg PD, Brew CJ, Redmond CM, Hardingham TE (2007) SOX9 transduction of a human chondrocytic cell line identifies novel genes regulated in primary human chondrocytes and in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 9:R107.
- Thong MK, Scherer G, Kozlowski K, Haan E, Morris L (2000) Acampomelic campomelic dysplasia with SOX9 mutation. *Am J Med Genet* 93:421–5.
- Tommerup N, Schempp W, Meinecke P, Pedersen S, Bolund L, Brandt C, Goodpasture C, Guldberg P, Held KR, Reinwein H (1993) Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat Genet* 4:170–4.
- Tonni G, Ventura A, Pattacini P, Bonasoni MP, Baffico AM (2013) p.His165Pro: A novel SOX9 missense mutation of campomelic dysplasia. *J Obstet Gynaecol Res.*
- Tretter, a E, Saunders, RC, Meyers, CM, Dungan, JS, Grumbach, K, Sun, CC, Campbell, a B, Wulfsberg, EA (1998) Antenatal diagnosis of lethal skeletal dysplasias. *Am. J. Med. Genet.* 75:518–22.
- Tschopp P, Duboule D (2011) A genetic approach to the transcriptional regulation of Hox gene clusters. *Annu Rev Genet* 45:145–66.
- Tsuda M, Takahashi S, Takahashi Y, Asahara H (2003) Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* 278:27224–9.
- Ulla, M, Aiello, H, Cobos, MP, Orioli, I, García-Mónaco, R, Etchegaray, A, Igarzábal, ML, Otaño, L (2011) Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias: contribution of three-dimensional computed tomography. *Fetal Diagn. Ther.* 29:238–47.
- Wada Y, Nishimura G, Nagai T, Sawai H, Yoshikata M, Miyagawa S, Hanita T, Sato S, Hasegawa T, Ishikawa S, *et al.* (2009) Mutation analysis of SOX9 and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with campomelic dysplasia and acampomelic campomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* 149A:2882–5.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantés J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, *et al.* (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111–20.
- Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin DL, *et al.* (2011) Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A* 155A:943–68.
- Witters, I, Moerman, P, Fryns, JP (2008) Skeletal dysplasias: 38 prenatal cases. *Genet. Couns.* 19:67–75.

- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P (1995) The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9:15–20.
- Wunderle VM, Critcher R, Hastie N, Goodfellow PN, Schedl a (1998) Deletion of long-range regulatory elements upstream of SOX9 causes campomelic dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10649–54.
- Xiao B, Ji X, Xing Y, Chen Y, Tao J (2013) A rare case of 46, XX SRY-negative male with a ~74-kb duplication in a region upstream of SOX9. *Eur J Med Genet* 1–4.
- Xu Z, Gao X, He Y, Ju J, Zhang M, Liu R, Wu Y, Ma C, Ma C, Lin Z, *et al.* (2012) Synergistic effect of SRY and its direct target, WDR5, on Sox9 expression. *PLoS One* 7:e34327.
- Yamashita S, Andoh M, Ueno-Kudoh H, Sato T, Miyaki S, Asahara H (2009) Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes. *Exp Cell Res* 315:2231–40.
- Yeh, P, Saeed, F, Paramasivam, G, Wyatt-Ashmead, J, Kumar, S. 2011. Accuracy of prenatal diagnosis and prediction of lethality for fetal skeletal dysplasias. *Prenat Diagn* 31:515–8.
- Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B (2006) Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19004–9.

6 – ANEXOS

- A1 – Termo de consentimento livre e esclarecido, versão para pacientes.
- A2 – Termo de consentimento livre e esclarecido, verso para pais e/ou responsáveis legais de pacientes.
- A3 – Primers utilizados para amplificação de SOX9.
- A4 – Condições de PCR utilizadas para amplificação de SOX9.
- A5 – Folder de divulgação do projeto, apresentado na edição de 2012 do Curso de Controvérsias em Medicina Fetal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Casos

Diagnóstico pré-natal de displasias esqueléticas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – caracterização clínica e molecular

INTRODUÇÃO / OBJETIVO DA PESQUISA:

O objetivo desta investigação é identificar a origem da displasia esquelética (alteração nos ossos ou articulações) que foi diagnosticada em seu filho e aprofundar o estudo dos mecanismos envolvidos na mesma. As radiografias, fotos e amostras de sangue do seu filho, bem como as informações médicas a respeito da sua família, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com displasias esqueléticas, de forma anônima.

PROCEDIMENTO:

Concordando em participar deste estudo, os pesquisadores terão necessidade de obter alguns dados da história clínica e familiar do seu filho, assim como haverá necessidade de dados do exame clínico, fotos clínicas e radiografias para o estabelecimento ou confirmação do diagnóstico. O sangue para extração de DNA poderá ser coletado em qualquer momento e, normalmente, a coleta é feita em uma veia do braço. O DNA dos pais e, eventualmente, de outros familiares também poderá ser necessário para a conclusão dos estudos. Normalmente se coletam de 4 a 10 ml de sangue.

RISCOS:

O paciente pode sentir um breve desconforto com a coleta de sangue e o procedimento pode deixar uma pequena marca no local da agulha. Esse procedimento dura uns poucos segundos.

VANTAGENS / RESULTADOS:

Os resultados desta pesquisa devem fornecer um maior conhecimento sobre a doença em questão. Os resultados da pesquisa serão fornecidos a você e a 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. 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.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

A participação do seu filho na presente pesquisa é voluntária. Sendo assim, a qualquer momento você poderá recusar a participação de seu filho ou retirar o consentimento e interromper a participação dele na presente pesquisa, sem comprometimento dos cuidados médicos que ele recebe atualmente ou poderá receber no futuro.

COLETA, FUTURAS PESQUISAS E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO:

O DNA, material genético obtido a partir de uma amostra de sangue do seu filho, será usado para esse estudo se você concordar. Você pode concordar com o uso da amostra de sangue dele 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 da amostra dele em outro estudo (opção 2) ou você pode dar sua permissão agora, sem ter que ser solicitado novamente (opção 3). Em qualquer caso, seus nomes serão conhecidos apenas pelo investigador do estudo e ninguém mais.

Você tem o direito de retirar seu filho desse estudo a qualquer momento. Se você escolher retirá-lo, nenhum outro estudo será conduzido com a amostra dele. Se você concordar com a participação de seu filho nesse estudo, a amostra de sangue dele será armazenada no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob a responsabilidade do investigador principal pelo tempo determinado pela regulamentação vigente. Essa amostra será usada exclusivamente para os propósitos científicos descritos aqui. Você pode requerer a destruição da amostra a qualquer momento. Uma cópia desse termo de consentimento será fornecida a você.

A assinatura dos itens abaixo indica que você foi informado, tanto oralmente como pelo termo de consentimento, sobre a pesquisa mencionada acima. Dessa forma, você confirma que leu e entendeu o conteúdo da Folha de Informação e que, voluntariamente, concorda com a participação de seu filho nesse 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 participação de seu filho nesse estudo. Você tem o direito de retirar seu filho desse estudo em qualquer momento sem qualquer consequência para ele ou para você.

I. Em quaisquer das opções abaixo sua identidade e a de seu filho serão mantidas confidenciais. Escolhendo um dos itens abaixo você estará concordando com a utilização do DNA do seu filho para:

- 1 Ser usada apenas nesse projeto de pesquisa. Essa amostra não pode ser usada em nenhum outro projeto.
- 2 Ser usada apenas nesse projeto, e para outros projetos com sua permissão. Se a amostra puder ser usada em outro projeto, você quer ser contatado para que solicitem sua permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para usar a amostra de seu filho em outro estudo.
- 3 Ser usada para este e qualquer outro projeto. Você não quer ser contatado para nova permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para que a amostra de seu filho seja utilizada em outro estudo.

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

- Apenas esse estudo, sem a possibilidade de publicações.
- Esse estudo e eventuais apresentações em publicações científicas de forma anônima e não identificável.
- Não autorizo a utilização de fotos clínicas.

Nome do paciente: _____ Data de nascimento: _____

Nome do pai/mãe ou responsável legal: _____

Assinatura do pai/mãe ou responsável legal: _____

Local e data: _____

Em caso de dúvidas, os pesquisadores estão à disposição para esclarecimentos:

Pesquisador principal:

Maria Teresa Vieira Sanseverino
Serviço de Genética Médica SGM – HCPA
Telefone: (51) 3359-8011
E-mail: msanseverino@hcpa.ufrgs.br

Assinatura: _____

Pesquisador colaborador:

Eduardo Preusser de Mattos
Serviço de Genética Médica SGM – HCPA
Telefone: (51) 3359-8011
E-mail: eduardo.mattos@ufrgs.br

Local e data: _____

Em caso de dúvidas éticas, você poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-8304

A2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pais

Diagnóstico pré-natal de displasias esqueléticas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – caracterização clínica e molecular

INTRODUÇÃO / OBJETIVO DA PESQUISA:

O objetivo desta investigação é identificar a origem da displasia esquelética (alteração nos ossos ou articulações) que foi diagnosticada em seu filho e aprofundar o estudo dos mecanismos envolvidos na mesma.

PROCEDIMENTO:

Concordando em participar deste estudo, os pesquisadores terão necessidade de coletar uma amostra de seu sangue para auxiliar na identificação da alteração presente em seu filho. A coleta é feita em uma veia do braço e, geralmente, se coleta de 4 a 10 ml de sangue.

RISCOS:

Você pode sentir um breve desconforto com a coleta de sangue e o procedimento pode deixar uma pequena marca no local da agulha. Esse procedimento dura uns poucos segundos.

VANTAGENS / RESULTADOS:

Os resultados desta pesquisa devem fornecer um maior conhecimento sobre a doença de seu filho. 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. 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.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

A sua participação na presente pesquisa é voluntária. Sendo assim, a qualquer momento você poderá se recusar a participar ou retirar o consentimento e interromper a sua participação presente pesquisa, sem comprometimento dos cuidados médicos que seu filho e/ou você recebem atualmente ou poderão receber no futuro.

COLETA, FUTURAS PESQUISAS E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO:

O DNA, material genético obtido a partir de uma amostra de seu sangue, será usado para esse estudo se você concordar. 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 da sua amostra em 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.

Você tem o direito de se retirar desse estudo a qualquer momento. Se você escolher se retirar, nenhum outro estudo será conduzido com a sua amostra. Se você concordar com a sua participação nesse estudo, a sua amostra de sangue será armazenada no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob a responsabilidade do investigador principal pelo tempo determinado pela regulamentação vigente. Essa amostra será usada exclusivamente para os propósitos científicos descritos aqui. Você pode requerer a destruição da amostra a qualquer momento. Uma cópia desse termo de consentimento será fornecida a você.

A assinatura dos itens abaixo indica que você foi informado, tanto oralmente como pelo termo de consentimento, sobre a pesquisa mencionada acima. Dessa forma, você confirma que leu e entendeu o conteúdo da Folha de Informação e que, voluntariamente, concorda com a sua participação. 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 se retirar desse estudo em qualquer momento sem qualquer consequência para você ou para seu filho.

III. Em quaisquer das opções abaixo sua identidade e a de seu filho serão mantidas confidenciais. Escolhendo um dos itens abaixo você estará concordando com a utilização do seu DNA para:

- 1 Ser usada apenas nesse projeto de pesquisa. Essa amostra não pode ser usada em nenhum outro projeto.
- 2 Ser usada apenas nesse projeto, e para outros projetos com sua permissão. Se a amostra puder ser usada em outro projeto, você quer ser contatado para que solicitem sua permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para usar sua amostra em outro estudo.
- 3 Ser usada para este e qualquer outro projeto. Você não quer ser contatado para nova permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para que sua amostra seja utilizada em outro estudo.

Nome: _____ Data de nascimento: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

Em caso de dúvidas, os pesquisadores estão à disposição para esclarecimentos:

Pesquisador principal:

Maria Teresa Vieira Sanseverino
Serviço de Genética Médica SGM – HCPA
Telefone: (51) 3359-8011
E-mail: msanseverino@hcpa.ufrgs.br

Assinatura: _____

Pesquisador colaborador:

Eduardo Preusser de Mattos
Serviço de Genética Médica SGM – HCPA
Telefone: (51) 3359-8011
E-mail: eduardo.mattos@ufrgs.br

Local e data: _____

Em caso de dúvidas éticas, você poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-8304

A3 – Primers utilizados para amplificação do gene SOX9

SOX9_1F 5' TTCTCGCCTTTCCCGGCCACC 3'
SOX9_2R 5' GGGGCAAATCAGCCCTGACCAG 3'
SOX9_3F 5' GACAGTTTGGCGGATTTAC 3'
SOX9_4R 5' CCACGAAGAATCTCCCAGGC 3'
SOX9_5F 5' CCTGATAAAAGGGGGCTGTCC 3'
SOX9_6R 5' GCGCCTGCTGCTTGGACA 3'
SOX9_9F 5' TAAGACTAGGGCGTCTGCAC 3'
SOX9_10R 5' TCCGTCTTGATGTGCGTTCG 3'
SOX9_11F 5' AGCGAACGCACATCAAGACG 3'
SOX9_12R 5' TTGGTCCTCTCTTTCTTCGGTTA 3'

A4 – Condições de PCR utilizadas para amplificação do gene SOX9.

| | Par de primers (0,2 µM de cada) | | | | |
|--------------------------------------|--|--|--|---------------------------------|------------------------|
| | F1/R2 | F3/R4 | F5/R6 | F9/R10 | F11/R12 |
| dNTPs | 200 µM | 200 µM | 200 µM | 200 µM | 200 µM |
| MgCl₂ | 1,3 mM | 1,5 mM | 1,5 mM | 0,9 mM | 1,5 mM |
| DMSO | 5% | 10% | 10% | 5% | - |
| Polimerase | Taq Platinum 1U (Invitrogen) | AmpliTaq Gold 1U (Applied Biosystems) | AmpliTaq Gold 1U (Applied Biosystems) | Taq Platinum 1U (Invitrogen) | Taq 1U (Invitrogen) |
| Temperatura de anelamento | 64°C | 58°C | 58°C | 61°C | 61°C |
| Número de ciclos | 35 | 30 | 30 | 35 | 35 |

A5 – Folder de divulgação do projeto, apresentado na edição de 2012 do Curso de Controvérsias em Medicina Fetal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Displasias esqueléticas mais comuns

- Grupo de OCDs letais:
 - ✓Displasia tanatofórica tipos I e II
 - ✓Acondrogênese tipo II
 - ✓Osteogênese imperfeita tipo II
 - ✓Displasia campomélica
- Grupo de OCDs não-letais
 - ✓Acondroplasia (nanismo comum)



Displasia tanatofórica tipo I: fêmures curvados e pelve com baixa mineralização e formato de tridente.

Referências

•Warman ML et al. 2011. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. Am J Med Genet Part A 156A:943-968.

•Barbosa-Buck CO et al. 2012. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. Am J Med Genet Part A 156A:1038-1045.

•Krakow D et al. 2008. Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: A retrospective and prospective analysis. Am J Med Genet Part A 148A:1917-1924.

REALIZAÇÃO:

Rede Brasileira de Displasias Esqueléticas | CoSMO-B (Congenital Skeletal Malformations and Osteochondrodysplasias in Brazil)

www.oed.fem.unicamp.br



PROJETO DISPLASIAS ESQUELÉTICAS

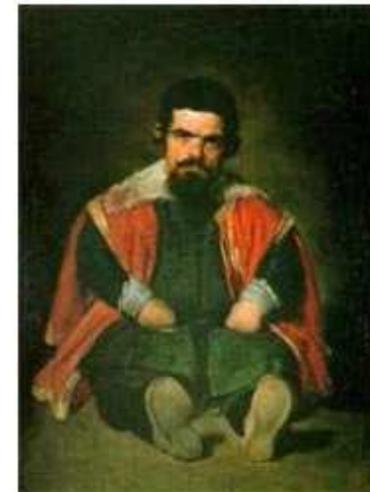
GPPG – HCPA 12-0487
 Dra. Maria Teresa V. Sanseverino | maria@genetica.hcpa.ufrgs.br
 Eduardo Preusser de Mattos | eduardo@genetica.hcpa.ufrgs.br

SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA
 HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
 Rua Ramiro Barcelos, 2350
 Porto Alegre – RS | CEP 91.035-903
 Fone: (51) 3359-8011

Apelo: FIPE – HCPA e CNPq



DISPLASIAS ESQUELÉTICAS
 Características e diagnóstico pré-natal



Don Sebastian de Morra (1545), Diego Velázquez

O que são displasias esqueléticas?

• Displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias (OCDs) constituem um grande grupo de doenças genéticas que afetam o esqueleto, produzindo alterações no crescimento e/ou nas proporções corporais.

• São reconhecidas cerca de 450 desordens desse tipo, com mais de 220 genes associados^a.

• Estima-se uma prevalência de 3,2 a cada 10.000 nascimentos na América do Sul^b.

• Quanto ao padrão de herança, muitas OCDs são causadas por mutações dominantes novas, mas há várias formas recessivas com 25% de possibilidade de recorrência^a.

• Em torno de 40% das OCDs podem ser diagnosticadas por ultrassom pré-natal^b.



Diagnóstico pré-natal

• Ultrassonografia de segundo trimestre - itens essenciais da investigação:

- ✓ perímetro cefálico (PC)
- ✓ circunferência torácica (CT)
- ✓ circunferência abdominal (CA)
- ✓ comprimento, forma e mineralização dos ossos longos
- ✓ presença de fraturas e edemas
- ✓ perfil fetal

• Quando há suspeita de displasia esquelética?

- ✓ CT < percentil 5
- ✓ ossos longos < percentil 5
- ✓ PC > percentil 75
- ✓ razão CT / comprimento do pé < 1,0

• Parâmetros de letalidade:

- ✓ CT / CA < 0,6
- ✓ comprimento do fêmur / CA < 0,16

O diagnóstico definitivo é essencial para o aconselhamento genético do casal.

Confirmação pós-natal

• A avaliação radiológica pós-natal é fundamental para o estabelecimento correto do diagnóstico.



Osteogênese imperfeita tipo II: baixa mineralização óssea

Atelosteogênese II: note a pelve característica

• A investigação básica deve conter:

Radiografias de:

- ✓ crânio [anteroposterior (AP) e lateral]
- ✓ coluna (AP e lateral)
- ✓ pelve (AP)
- ✓ membros superiores/inferiores (AP)
- ✓ mãos e pés (AP)

Coleta de material para extração de DNA:

- ✓ sangue em EDTA ou papel filtro
- ✓ amostra de tecido