



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Instituto Biomédico  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Estudo Molecular do Gene *FGFR3*: Rastreamento de mutações  
pela técnica de genotipagem por High Resolution Melt (HRM)**

Fernanda Rolemberg Gonçalves Riba

Orientador: Andre Luiz Mencialha

Co-orientadora: Sayonara Maria de Carvalho Gonzalez

Rio de Janeiro

2019

**Fernanda Rolemberg Gonçalves Riba**

# **Estudo Molecular do Gene *FGFR3*: Rastreamento de mutações pela técnica de genotipagem por High Resolution Melt (HRM)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Andre Luiz Mencialha

Co-orientadora: Sayonara Maria de Carvalho Gonzalez

Rio de Janeiro

2019

**Fernanda Rolemberg Gonçalves Riba**

**Estudo Molecular do Gene *FGFR3*: Rastreamento de mutações  
pela técnica de genotipagem por High Resolution Melt (HRM)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:**

Carmen Lucia Antão Paiva - UNIRIO

Carlos Fernando Araujo-Lima – UNIRIO

Kênia Balbi El-Jaick - UNIRIO

Tatiana de Almeida Simão – UERJ

Leonardo Henrique Ferreira Gomes – IFF/Fiocruz

## **Agradecimentos**

Dedico esta dissertação à Dra. Sayonara Gonzalez e ao Dr. André Mencialha pelas orientações, paciência e incentivo. Obrigada por tudo.

Aos meus pais, irmão e avó, que sempre me apoiaram, incentivaram e nunca mediram esforços para me proporcionar tudo o que fosse necessário para minha caminhada até aqui.

Aos meus familiares, por aguentarem minhas alterações de humor e pela força em todos os momentos.

Ao Dr. Juan Llerena por todo o suporte de informações da clínica médica.

Ao Julio Paixão pelas sugestões e esclarecimentos de dúvidas.

Às meninas do laboratório por muita ajuda e conselhos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Crescimento endocondral do osso.....	18
1.2 Fatores de Crescimento de Fibroblastos e de seus receptores.....	20
1.3 Sinalização do FGFR3.....	22
1.4 Efeito de alterações no gene <i>FGFR3</i> no desenvolvimento ósseo.....	24
1.5 Mecanismos de ativação de FGFR3.....	26
1.6 Displasias Esqueléticas relacionadas ao gene <i>FGFR3</i> .....	26
1.6.1 Acondroplasia.....	26
1.6.2 Hipocondroplasia.....	27
1.6.3 Displasia Tanatofórica.....	28
1.7 Análise molecular no gene <i>FGFR3</i> .....	30
1.8 Implantação da detecção de alterações no gene <i>FGFR3</i> através da técnica de HRM.....	32
1.9 Fatores que afetam os ensaios de HRM.....	35
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
Geral.....	37
Específicos.....	37
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>38</b>
3.1 Local de estudo.....	38
3.2 Critérios de inclusão.....	38
3.3 Critérios de exclusão.....	38
3.4 Fluxograma.....	39
3.5 Pacientes.....	40
3.6 Extração de DNA.....	41
3.6.1 Amostras de sangue periférico.....	41

3.6.2 Amostras de cordão umbilical.....	42
3.7 Quantificação e avaliação do DNA genômico após extração.....	43
3.8 Desenho dos oligonucleotídeos.....	43
3.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	44
3.10 Purificação dos produtos de PCR.....	45
3.11 Sequenciamento de <i>Sanger</i> .....	45
3.12 Análise das sequencias.....	46
3.13 Dissociação em Alta Resolução (HRM).....	46
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 Amplificação de regiões do gene <i>FGFR3</i> .....	48
4.2 Pacientes com suspeita de Acondroplasia.....	49
4.3 Pacientes com suspeita de Hipocondroplasia.....	51
4.4 Pacientes com suspeita de Displasia Tanatofórica Tipo I.....	52
4.5 Pacientes com suspeita de Displasia Tanatofórica Tipo II.....	53
4.6 Dissociação em Alta Resolução (HRM).....	54
4.6.1 Acondroplasia.....	54
4.6.2 Hipocondroplasia.....	59
4.6.3 Displasia Tanatofórica Tipo I.....	62
4.6.4 Displasia Tanatofórica Tipo II.....	66
4.6.5 HRM com todas as DEs.....	67
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>

## Lista de Figuras

Figura 1: Imagem de um osso longo e esquema da placa de crescimento.....	18
Figura 2: Esquema da estrutura da proteína FGFR3 humana.....	20
Figura 3: Localização genômica do gene <i>FGFR3</i> no cromossomo 4 (seta amarela). ....	21
Figura 4: Esquema da estrutura do dímero de FGFR3 com seu ligante FGF.....	21
Figura 5: Vias de sinalização de FGF em condrócitos em proliferação. ....	23
Figura 6: Fotografias de indivíduos com acondroplasia.....	26
Figura 7: Indivíduo com hipocondroplasia.....	27
Figura 8: Radiografia de esqueleto e fotografia do paciente 38 com displasia tanatofórica tipo I.....	28
Figura 9: Radiografia de esqueleto e fotografia do paciente 41 com displasia tanatofórica tipo II.....	28
Figura 10: Gráfico de HRM mostrando a curva de dissociação de um indivíduo controle (wild type) e de um paciente com uma alteração (c.1138G>A).....	33
Figura 11: Fluxograma da análise molecular realizada no Laboratório de Medicina Genômica do IFF.....	38
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 0,8% representativa de DNA genômico extraído pelo método de <i>salting out</i> . Poço1: padrão de peso molecular $\lambda$ <i>HIND III</i> ; poço 2: paciente 27; poço3: paciente 28. ....	47
Figura 13: Eletroforese realizada em gel de agarose 1,5% dos produtos provenientes da padronização da amplificação de regiões do gene <i>FGFR3</i> relacionadas com as DEs. ....	48
Figura 14: Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.16081 G>A.....	48
Figura 15: Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.16081 G>C.....	49
Figura 16: Eletroferograma negativo do paciente 2.....	49
Figura 17: A: Eletroferograma do sequenciamento do paciente 2 evidenciando o polimorfismo na posição g.16002 C>T. B: Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.16081 G>A do mesmo paciente. ....	50
Figura 18: Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.17333 C>A.....	50
Figura 19: Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.17333 C>G.....	51
Figura 20: Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.13526 C>T. ....	51
Figura 21: Radiografia do paciente 58 compatível com DTI, que apresenta fêmur em forma curvada. ....	52
Figura 22: Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.17852 A>G.....	52
Figura 23: Análise de HRM dos pacientes com ACH que apresentam a alteração g.16081 G>A.....	53



Figura 24: Análise de HRM dos pacientes com ACH que apresentam as alterações g.16081 G>A e g.16081 G>C.....	54
Figura 25: Análise de HRM de pacientes com ACH que apresentam a alteração g.16081 G>A e polimorfismo. ....	56
Figura 26: Análise de HRM dos pacientes com ACH.....	57
Figura 27: Análise de HRM dos pacientes com HCH que apresentam a alteração g.17333 C>A.....	59
Figura 28: Análise de HRM dos pacientes com HCH que apresentam a alteração g.17333 C>A e g.17333 C>G. ....	60
Figura 29: Análise de HRM dos pacientes com ACH e HCH. A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. ....	62
Figura 30: Análise de HRM dos pacientes com DTI que apresentam a alteração g.13526 C>T.....	63
Figura 31: Análise de HRM do paciente 58 com suspeita de DTI.....	65
Figura 32: Análise de HRM dos pacientes com DTII que apresentam a alteração g.17852 A>G.....	66
Figura 33: Análise de HRM com todas as DEs. ....	68

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Relação das mutações em <i>FGFR3</i> e das displasias esqueléticas associadas.	29
Tabela 2: Classificação dos SNPs mostrando a troca de nucleotídeo, mudança de Tm que cada troca gera e a ocorrência no genoma humano. ....	32
Tabela 3: Dados dos pacientes e de suas respectivas amostras analisadas neste estudo. ....	39
Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar segmentos específicos do gene <i>FGFR3</i> . F: Sequência senso. R: Sequência anti-senso. ....	43
Tabela 5: Concentração do DNA genômico e dos oligonucleotídeos utilizados para cada DE. ....	45
Tabela 6: Tabela mostrando os resultados encontrados no sequenciamento de <i>sanger</i> .	69

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>A</b>	Adenina
<b>ACH</b>	<i>Achondroplasia</i> ; Acondroplasia
<b>C</b>	Citosina
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>cm</b>	Centímetro
<b>dATP</b>	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i> ; Desoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	<i>Deoxycytidine triphosphate</i> ; Desoxicitosina trifosfato
<b>dGTP</b>	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i> ; Desoxiguanosina trifosfato
<b>DE</b>	Displasia Esquelética
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Ácido desoxiribonucleico
<b>dNTP</b>	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> ; Desoxinucleotideo trifosfato
<b>dTTP</b>	<i>Deoxythymidine triphosphate</i> ; Desoxitimina trifosfato
<b>DTI</b>	Displasia Tanatofórica tipo I
<b>DTII</b>	Displasia Tanatofórica tipo II
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ; Ácido etilenodiaminotetracético
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i> ; Fator de crescimento de fibroblasto
<b>FGFR3</b>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i> ; Receptor de Fator de crescimento de fibroblasto
<b>G</b>	Guanina
<b>HCH</b>	<i>Hypochondroplasia</i> ; Hipocondroplasia

<b>HRM</b>	High Resolution Melt
<b>IFF</b>	Instituto Nacional da Saúde da mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
<b>IgI</b>	Imunoglobulina I
<b>IgII</b>	Imunoglobulina II
<b>IgIII</b>	Imunoglobulina III
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de Potássio
<b>M</b>	Molar
<b>MBR</b>	<i>Myelin Basic Protein</i> ; Proteína Básica da Mielina
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NCBI</b>	National Center of Biotechnology Information
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NGS</b>	<i>Next-Generation Sequencing</i> ; Sequenciamento de nova geração
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de Amónio
<b>P1</b>	Par de oligonucleotídeos da região 1
<b>P2</b>	Par de oligonucleotídeos da região 2
<b>P2N</b>	Par de oligonucleotídeos novo da região 2

<b>P3</b>	Par de oligonucleotídeos da região 3
<b>P4</b>	Par de oligonucleotídeos da região 4
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em cadeia pela polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pmol</b>	Picomol
<b>RE</b>	<i>Endoplasmic reticulum</i> ; Retículo endoplasmático
<b>rpm</b>	<i>Revolutions per minute</i> ; Rotações por minuto
<b>SC</b>	Sangue de cordão
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ; Dodecilsulfato de sódio
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ; Polimorfismo de nucleotídeo único
<b>SP</b>	Sangue periférico
<b>T</b>	Timina
<b>TAE</b>	Tampão Tris-Acetato EDTA
<b>TE</b>	Tampão EDTA
<b>TK I</b>	Tirosina cinase I
<b>TK II</b>	Tirosina cinase II
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>Tm</b>	Temperatura de meltint
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>U</b>	Unidade
<b>V</b>	Volts

<b>WT</b>	<i>Wild Type</i> ; Tipo selvagem
<b>X</b>	Vezes
<b>xg</b>	Vezes a força de gravidade
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micrômetro
<b>λ HIND III</b>	DNA do fago Lambda digerido com enzima de restrição <i>HindIII</i>

## Resumo

O gene *FGFR3* é um receptor do fator de crescimento do fibroblasto (FGFR), do tipo tirosina cinase, que desempenha um papel importante no desenvolvimento ósseo, atuando como um modulador negativo na placa de crescimento. Mutações neste gene são relacionadas a alguns tipos de displasias esqueléticas (DEs), como acondroplasia (ACH), hipocondroplasia (HCH) e displasia tanatofórica tipos I e II (DTI e DTII respectivamente). Embora o sequenciamento seja uma técnica precisa para a identificação de mutações, a técnica de HRM é uma estratégia economicamente mais acessível e rápida. Este trabalho teve como objetivo identificar mutações no gene *FGFR3* de pacientes encaminhados pelo Departamento de Genética Médica do Instituto Fernandes Figueira/IFF - Fiocruz com características compatíveis com displasias esqueléticas (DEs) relacionadas a esse gene e padronizar e implantar a técnica de HRM como um método de genotipagem para estas DEs. Para análise das alterações genéticas, amostras de DNA de pacientes foram obtidas a partir de sangue periférico ou de sangue de cordão umbilical. Regiões específicas do gene *FGFR3* foram amplificadas pela técnica de PCR, para serem sequenciados pelo método de Sanger. Os resultados foram submetidos ao alinhamento de sequências com o auxílio do programa *Align* (*Scientific & Educational Software* versão 3.0), para a verificação das similaridades entre as sequências obtidas e a sequência de referência do gene *FGFR3*. Para a genotipagem por HRM, utilizou-se o *Kit MeltDoctor HRM Master Mix*. Os produtos da PCR foram submetidos a um gradiente crescente de temperatura em presença de um intercalante de DNA dupla-fita e a comparação da curva de fusão de cada paciente em relação a um DNA controle foi realizada no aparelho *7500 FAST Real time System*. Neste estudo, relatamos sessenta e um casos de pacientes diagnosticados clinicamente com DEs relacionadas ao gene *FGFR3*. Trinta pacientes com ACH apresentaram a mutação g.16081 G>A, três apresentaram a mutação g.16081 G>C, já conhecidas por sua relação com ACH, e três pacientes apresentaram resultado negativo. Posteriormente, uma revisão clínica excluiu a possibilidade desse diagnóstico para estes pacientes. Dos quinze pacientes com HCH, cinco apresentaram a mutação g.17333 C>A, cinco apresentaram a mutação g.17333 C>G e os outros cinco apresentaram resultado negativo para as mutações relacionadas a essa DE. Uma revisão clínica desses casos excluiu a possibilidade desse diagnóstico, reforçando o resultado obtido pela análise molecular. Dentre os dez pacientes com DT, seis apresentaram a mutação g.13526 C>T relacionada à DTI, dois pacientes com fenótipo típico para DTI apresentaram resultado negativo e novas alterações estão sendo investigadas, e dois pacientes apresentaram a mutação g.17852 A>G relacionada à DTII. Os pacientes com as mutações já discriminadas foram utilizados como controle positivo para a padronização da técnica de HRM. Os pacientes que apresentaram resultado positivo confirmaram a etiologia molecular associada ao diagnóstico clínico e a técnica de HRM mostrou-se eficiente para discriminar os tipos de DEs.

**Palavras chave:** FGFR3, displasia esquelética, HRM.

## Abstract

The *FGFR3* gene is a fibroblast growth factor receptors (FGFR) tyrosine kinase type, that plays an important role in bone development, acting as a negative modulator to the growth plate. Mutations in this gene have been related with some types of skeletal dysplasias, which stand out achondroplasia (ACH), hypochondroplasia (HCH) and thanatophoric dysplasia type I and II (TDI and TDII respectively). Although sequencing is an accurate technique for identifying mutations, the HRM technique is an economically more accessible and faster strategy. This research aimed to trace mutations in *FGFR3* gene in patients forwarded by medical genetics department of Instituto Fernandes Figueira/IFF - Fiocruz with features consistent with skeletal dysplasia (SD) related to this gene and standardize and to implant the HRM technique as a genotyping method for these SDs. For the analysis of genetic alterations, DNA samples from patients were obtained from peripheral blood or umbilical cord blood. Specific regions of the *FGFR3* gene were amplified by PCR, to be sequenced by *Sanger* method. The results were submitted to sequence alignment with the Align software (*Scientific & Educational Software 3.0* version), to verify the similarities between the sequences obtained and the *FGFR3* gene reference sequence. For HRM genotyping, the MeltDoctor HRM Master Mix Kit was used. The PCR products were subjected to an increasing temperature gradient in the presence of a double-stranded DNA intercalating and the comparison of the melting curve of each patient in relation to a control DNA was performed on the equipment 7500 *FAST Real time System*. In this research, we reported sixty-one cases of patients clinically diagnosed with SD related to the *FGFR3* gene. Thirty patients with ACH presented the mutation g.16081 G> A, three presented the mutation g.16081 G> C, mutations known for its relation with ACH, and three patients presented negative results. Subsequently, a new clinical review excluded the possibility of this diagnosis for these patients. Among fifteen HCH patients, five showed the g.17333 C>A mutation, five showed the g.17333 C>G mutation and five others were negative for known mutations related to this SD. A new clinical review of these cases excluded the possibility of this diagnosis, reinforcing the results obtained by molecular analysis. Among the ten patients with TD, six presented a g.13526 C>T mutation related to TDI, two patients with phenotype typical for TDI presented negative results and new alteration are being investigated, and two patients presented the g.17852 A>G mutation related to TDII. These patients with the already discriminated mutations were used as positive control for the standardization of the HRM technique. The patients who presented positive results confirmed the molecular etiology associated with clinical diagnosis and the HRM technique proved to be efficient to discriminate the types of SDs.

**Keywords:** FGFR3, skeletal dysplasia, HRM.



## 1. INTRODUÇÃO

As Displasias Esqueléticas (DEs) são um grupo genética e clinicamente heterogêneos, e podem ser classificadas de acordo com os genes envolvidos e/ou por suas características clínicas (Warman *et al.*, 2011).

A incidência global do nascimento de indivíduos que possuam alguma displasia esquelética é estimada em 1/5000. Existem aproximadamente 456 DEs, que estão divididas em 40 grupos. Esses grupos são classificados com base em critérios clínicos, radiológicos e moleculares. Dentre as características fenotípicas compreende-se o encurtamento nos ossos das pernas e/ou braços, encurtamento das costelas, duplicação dos dedos das mãos ou dos pés e muitas outras deformidades que resultam na alteração do processo de ossificação intramembranosa ou endocondral (Krakow *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2012).

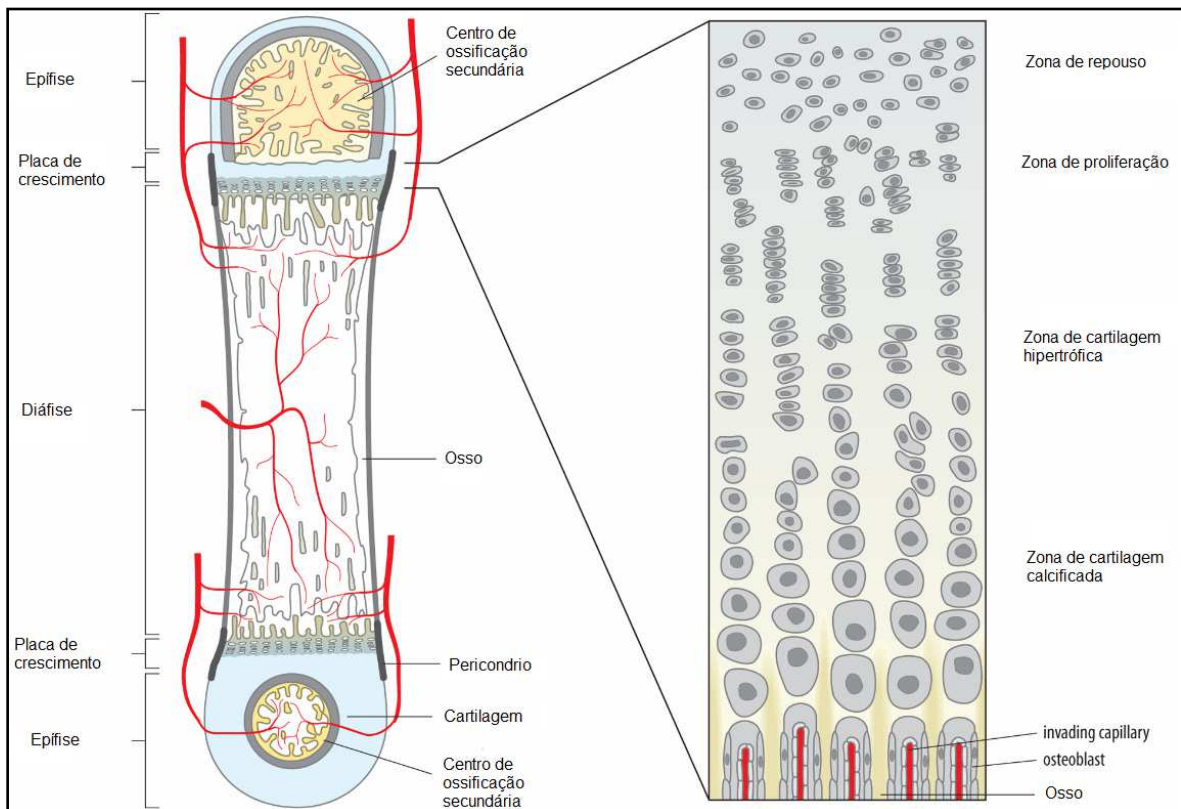
### 1.1 Crescimento endocondral do osso

A ossificação endocondral é responsável pelo desenvolvimento dos ossos longos, coluna vertebral, bacia e a base do crânio (Aires *et al.*, 2008). O crescimento dos ossos longos é um processo complexo e ocorre na placa de crescimento, que está localizada entre o tecido ósseo das epífises e da diáfise (Junqueira *et al.*, 2013). As placas de crescimento estendem o osso, mas permanecem do mesmo tamanho por muitos anos, pois as células da cartilagem que elas produzem são substituídas por osso (Wolpert, 2010).

Na placa de crescimento, a ossificação endocondral é dividida em duas etapas. Na primeira etapa, a cartilagem hialina é utilizada como um molde e não sofre nenhuma alteração na sua morfologia, e essa região corresponde à zona de repouso. Assim, os condrócitos rapidamente se dividem e formam no sentido longitudinal do osso colunas paralelas de células achatadas, formando a zona de cartilagem seriada ou zona de proliferação. Em seguida, a cartilagem hialina sofre algumas modificações ocorrendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finas trabéculas e os condrócitos começam a entrar em apoptose, sendo esta a zona de cartilagem hipertrófica. Posteriormente, ocorre a mineralização da cartilagem hialina e término da apoptose dos condrócitos, levando ao surgimento da zona de cartilagem calcificada (Junqueira *et al.*, 2013; Naski *et al.*, 1998).

Já na segunda etapa, as cavidades que eram anteriormente ocupadas pelos condrócitos sofrem invasão de capilares sanguíneos e de células osteogênicas. Essas células se diferenciam em osteoblastos, que irão posteriormente depositar matriz óssea sobre as trabéculas de cartilagem calcificada. Assim, onde havia tecido cartilaginoso, surge tecido ósseo. A matriz óssea calcificada aprisiona os osteoblastos, que são transformados em osteócitos. O tecido ósseo aparece na zona de ossificação endocondral (Junqueira *et al.*, 2013) (Figura 1).

**Figura 1:** Imagem de um osso longo e esquema da placa de crescimento.



Em detalhe ao lado, o processo do crescimento dos ossos longos na placa de crescimento.

**Fonte:** Adaptado de Wolpert, 2010.

O centro de ossificação descrito acima é chamado de centro primário de ossificação e é localizado na diáfise. Mais tarde, é formado um centro secundário em cada epífise. Quando o tecido ósseo ocupa as epífises, ocorre a redução do tecido cartilaginoso limitando-se a duas regiões: a cartilagem articular e ao disco epifisário, que será responsável pelo crescimento longitudinal do osso. O que determina a parada do crescimento dos ossos longos é o desaparecimento do disco epifisário por ossificação, que ocorre aproximadamente aos 20 anos de idade (Junqueira *et al.*, 2013).

Qualquer alteração que ocorra em alguma das etapas do crescimento endocondral dos ossos pode resultar em anormalidades do esqueleto compatíveis com as DEs (Krakow *et al.*, 2009).

Foi observado que a maior parte das DEs, cerca de 316 tipos são resultantes de alterações genéticas, em 226 genes diferentes, dentre eles, estão os Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGFs) e os seus receptores (FGFRs) (Warman *et al.*, 2011; Alanay *et al.*, 2011).

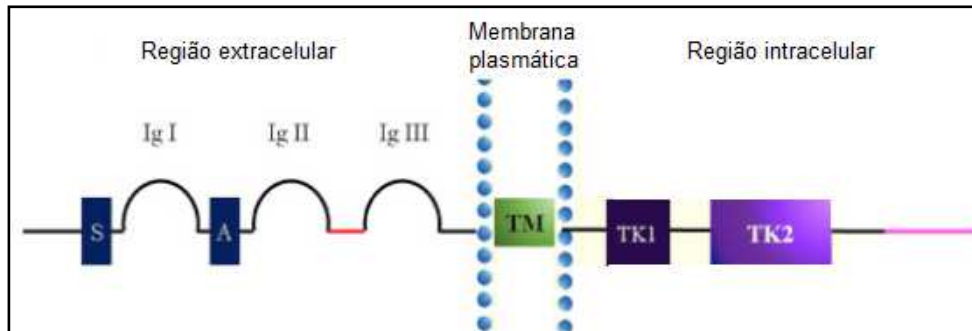
## **1.2 Fatores de Crescimento de Fibroblastos e de seus receptores**

Os fatores de crescimento de fibroblastos são responsáveis por regularem diversos processos de desenvolvimento, como a proliferação celular, padronização de tecidos, desenvolvimento dos membros e organogênese durante o período embrionário (Beenken *et al.*, 2009).

Na literatura, já foram descritos 18 fatores de crescimento de fibroblastos em mamíferos (FGF1-FGF10 e FGF16-FGF23), que estão organizados em 6 subfamílias, que se distinguem com base nas diferenças de homologia de sequência entre espécies diferentes: FGF1 e FGF2; FGF3, FGF7, FGF10 e FGF22; FGF4, FGF5 e FGF6; FGF8, FGF17 e FGF18; FGF9, FGF16 e FGF20; e FGF19, FGF21 e FGF23 (Beenken *et al.*, 2009).

A família dos FGFR abrange quatro receptores (FGFR1-4), do tipo tirosina cinase altamente conservados que possuem três domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina (Igl, IgII e IgIII), um domínio transmembrana (TM) e dois domínios intracelulares do tipo tirosina quinase (TK1, TK2) (Figura 2). O domínio IgII é o sítio de ligação de FGFs específicos, que se ligam em conjunto com heparina e promovem a dimerização de duas moléculas de FGFR3s. Já o domínio TK1 fosforila o domínio TK2 do outro receptor, desencadeando uma cascata de sinais que, em última análise, influenciam a mitose e diferenciação (Harada *et al.*, 2009).

**Figura 2:** Esquema da estrutura da proteína FGFR3 humana.



Domínios da proteína FGFR3: três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina (IgI, IgII e IgIII); domínio transmembrana (TM); Dois domínios intracelulares de tirosina cinases (TK1 e TK2).

**Fonte:** Adaptada de Chen *et al.*, 2017

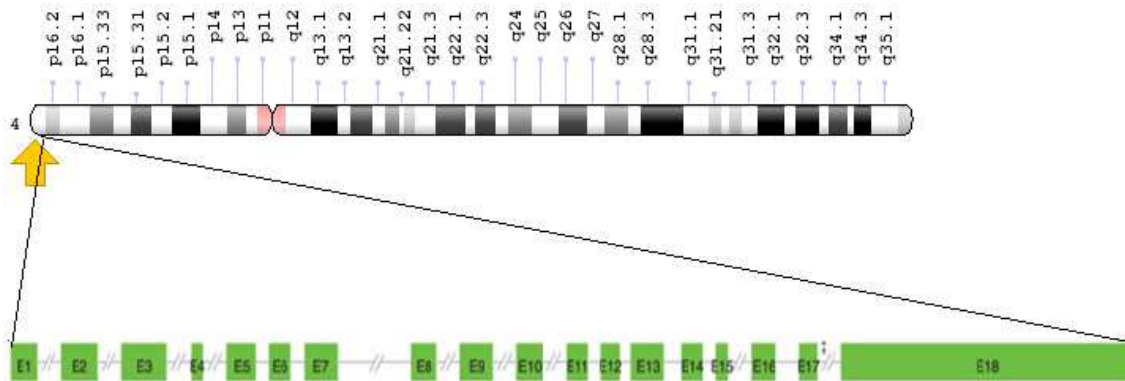
Dentre os FGFRs, destaca-se o Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos 3 (FGFR3) que é ativado pelos fatores de crescimento de Fibroblastos (FGFs). O FGFR3 desempenha um importante papel no desenvolvimento ósseo, atuando como um modulador negativo do crescimento do esqueleto na placa de crescimento ósseo (Liang *et al.*, 2012). Além disso, possui papel essencial na regulação da diferenciação, proliferação e apoptose de condrócitos (Mustafa *et al.*, 2014).

As mutações da linha germinal FGFR3 causam distúrbios esqueléticos autossômicos dominantes, enquanto suas mutações somáticas foram identificadas em neoplasias epiteliais e lesões cutâneas benignas (Mustafa *et al.*, 2014).

Todas as mutações conhecidas nesse gene relacionadas as DEs são do tipo ganho-de-função, fazendo com que os mutantes, embora em diferentes graus, sejam constitutivamente ativos. A ativação de FGFR3 leva a autofosforilação do receptor e conseqüentemente a inibição da proliferação dos condrócitos na placa de crescimento (Harada *et al.*, 2009; Mustafa *et al.*, 2014).

O gene *FGFR3* está localizado no cromossomo 4p16.3 e é composto por 18 éxons e 17 íntrons que se estendem por uma sequência de 22.561 pb (Figura 3).

**Figura 3:** Localização genômica do gene *FGFR3* no cromossomo 4 (seta amarela).



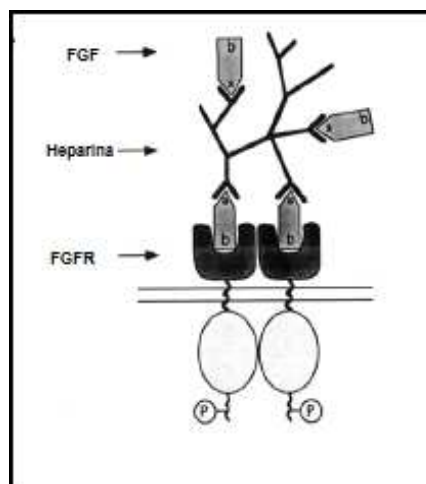
Em detalhe (em verde) a estrutura do gene mostrando os 18 éxons.

**Fonte:** Esquema adaptado de *Genetics Home Reference* (<http://www.genecards.org/>); Guo G *et al.* 2013.

### 1.3 Sinalização do *FGFR3*

A ligação de ligantes FGFs juntamente com a heparina ao domínio extracelular do *FGFR3* induz a dimerização e justaposição desses receptores para iniciar a transfosforilação sequencial (Ornitz *et al.*, 2015). Após a formação dos dímeros, o domínio tirosina cinase I fosforila o domínio de tirosina cinase II do outro receptor, promovendo a ativação de uma cascata de sinalização (Harada *et al.*, 2008; Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2011).

**Figura 4:** Esquema da estrutura do dímero de *FGFR3* com seu ligante FGF.



**Fonte:** Figura adaptada de Spivak-Kroizman *et al.*, 1994.

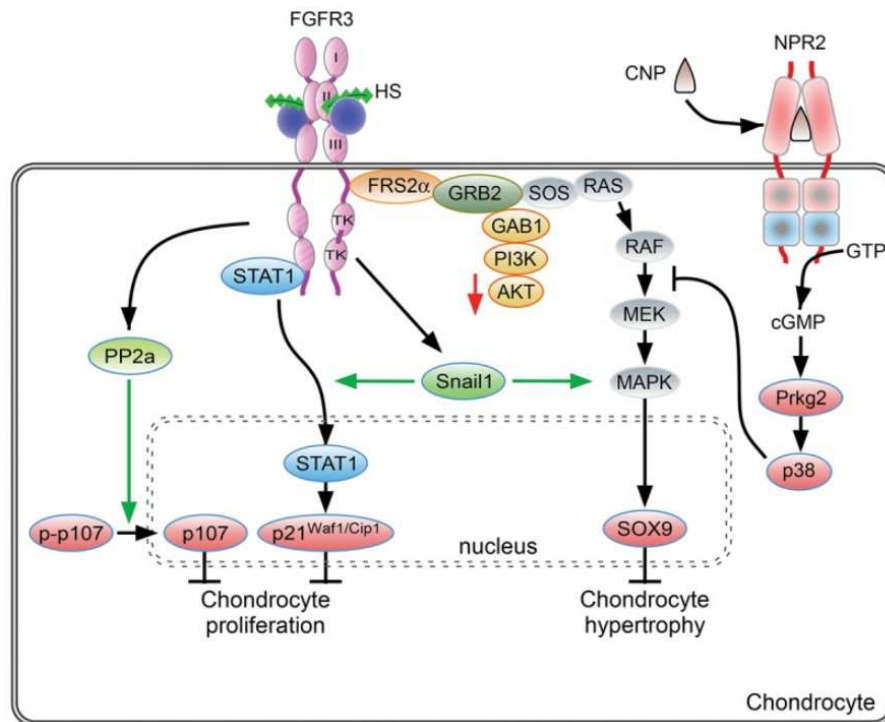
Todas as mutações conhecidas ativam o FGFR3, facilitando a sua dimerização, embora o mecanismo exato varie dependendo da localização da mutação dada (Harada *et al.*, 2008).

A sinalização através de FGFR3 em condrócitos da placa de crescimento ativa os sinais intracelulares STAT1; aumenta a expressão de *Snail1*; regula o AKT; ativa a proteína fosfatase 2a (PP2a) (Ornitz *et al.*, 2015) (Figura 5).

O módulo de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK representa uma via importante utilizada pelo FGFR3. A ativação ERK sustentada é observada na presença de mutações ACH e DT, e está associada à diminuição da proliferação de condrócitos, à diminuição da produção da matriz, ao aumento da degradação da matriz e a forma e diferenciação de células alteradas, enquanto que a inibição da MEK pode aumentar o tamanho das células hipertróficas e a produção da matriz. Recentemente, ERK foi considerado responsável por outro efeito da sinalização aberrante de FGFR3 na cartilagem, ou seja, fusão prematura das síncondroses (duas placas de crescimento de cartilagem opostas nas vértebras em desenvolvimento e crânio). Esta fusão leva ao estreitamento do canal espinhal no forame magno e pode contribuir para estenose espinhal, ambas complicações neurológicas significativas de ACH.

Nos condrócitos, ao contrário da maioria dos outros tipos de células, a ativação de FGFR3 provoca uma ativação ERK prolongada com duração de até 24 horas. Acreditamos que o único resultado inibitório de crescimento da ativação de FGFR3 observado em condrócitos reside na capacidade de manter a ativação prolongada de ERK. O mecanismo molecular subjacente a esse recurso é desconhecido (Harada *et al.*, 2009).

**Figura 5:** Vias de sinalização de FGF em condrócitos em proliferação.



Fonte: Adaptada de Ornitz *et al.*, 2015.

#### 1.4 Efeito de alterações no gene *FGFR3* no desenvolvimento ósseo

O receptor *FGFR3* atua como um modulador negativo do crescimento fisiológico do esqueleto na placa de crescimento óssea. A inibição da proliferação dos condrócitos e sua prematura diferenciação limitam a placa de crescimento e consequentemente os ossos tem seu comprimento diminuído (Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2012).

Corroborando com essa ideia, estudos utilizando modelos animais tem demonstrado que camundongos portadores de mutações ativadoras (do tipo ganho-de-função) de *FGFR3* apresentam um retardo no crescimento dos ossos longos e estrutura morfológica anormal das placas de crescimento. Isto ocorre porque há um estímulo excessivo independente de ligante para a ativação do receptor, levando a autofosforilação e consequente inibição da proliferação e aumento da diferenciação dos condrócitos na placa de crescimento (Chen *et al.*, 1999).

Os casos de pacientes com a síndrome CATSHL (Camptodactyly, Tall Stature and Hearing Loss) humana também demonstram a função de *FGFR3* no

desenvolvimento e crescimento ósseo, pois esta síndrome apresenta uma perda parcial da função de FGFR3, o que resulta em indivíduos com alta estatura, dentre outros achados clínicos e radiológicos (Toydemir *et al.*, 2006).

Em indivíduos com DEs relacionadas ao ganho de função de FGFR3, a ativação pode ocorrer através da facilitação da formação de dímeros ou pela autofosforilação em diferentes graus dependendo do tipo de mutação envolvida. Isso ocorre porque as mutações em domínios diferentes da proteína podem resultar na sua ativação por diferentes mecanismos (Harada *et al.*, 2018).

### **1.5 Mecanismos de ativação de FGFR3**

Os ligantes FGF extracelulares ativam a sinalização de FGFR através da formação de dímeros de FGFR, que é auxiliada por proteoglicanos de sulfato de heparina e mediada pela interação ligante-receptor. Todas as mutações conhecidas ativam o FGFR3 facilitando sua dimerização, entretanto, o mecanismo exato varia dependendo da localização da mutação na proteína. Apesar de nem todos os mecanismos serem bem conhecidos, sabe-se que a mutação G380R (ACH) leva à estabilização dos dímeros de FGFR3 independente de ligante via ligações de hidrogênio formadas entre as cadeias laterais dos dois resíduos de arginina (Webster *et al.*, 1996).

As alterações Y373C e R248C associadas à DTI ativam FGFR3 por meio da formação de dímeros covalentemente unidos por uma ponte de dissulfeto entre os resíduos livres de cisteína livres introduzidos na região que liga dois domínios Ig na região extracelular do FGFR3, ativando este receptor. Já a mutação p.Y373C ativa FGFR3 pela mesma forma, porém os resíduos de cisteína livres são introduzidos no domínio justamembrana (Webster *et al.*, 1996).

As mutações no domínio intracelular de tirosina cinase, K650M (TDI) e K650E (TDII), reproduzem as alterações conformacionais no domínio TK, que são normalmente induzidas pela dimerização e autofosforilação mediada por ligante, levando assim a ativação de FGFR3. As proteínas FGFR3 contendo estas duas mutações apresentam localização anormal dentro da célula, pois se acumulam no retículo endoplasmático (RE) em função do seu pouco amadurecimento após a síntese. A sinalização dessas proteínas mutadas no RE parece usar formas não



canônicas para ativar vias de sinalização intermediárias como as vias ERK e MAP cinase. No entanto, esta característica, parece não estar relacionada com o aumento da gravidade das displasias esqueléticas, uma vez que outros *FGFR3* mutantes como R248C e Y373C amadurecem normalmente e sinalizam a partir da membrana celular, mas causam fenótipos esqueléticos mais graves (Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2012).

### **1.6 Displasias Esqueléticas relacionadas ao gene *FGFR3***

Dentre as displasias relacionadas ao gene *FGFR3* as mais frequentes, a seguir listadas em ordem crescente de gravidade, são: Hipocondroplasia (HCH), Acondroplasia (ACH), Displasia Tanatofórica Tipo I (TDI) e Displasia Tanatofórica Tipo II (TDII).

O fenótipo das DEs genéticas é variável e está relacionado com mutações específicas no gene *FGFR3*. A acondroplasia é a forma de nanismo mais frequente enquanto que o nanismo tanatofórico representa a forma mais comum de nanismo letal.

#### **1.6.1 Acondroplasia**

A acondroplasia é uma doença genética rara com uma incidência estimada de 1/15.000 nascimentos (Miyazaki *et al.*, 2017). É uma condição autossômica dominante, é a forma mais comum de nanismo esquelético em seres humanos, e mais de 97% dos casos resultam de uma mutação heterozigota em *FGFR3*, decorrente de uma das mutações pontuais G>A ou G>C no nucleotídeo 16081 do DNA genômico (p.G380R), mas também podem ocorrer mutações em g.15980 (p.G346E) e g.16076 (p.G375C) (Vajo *et al.*, 2000; Ornitz *et al.*, 2015).

Fenotipicamente, a ACH é caracterizada por uma baixa estatura desproporcional, juntamente com macrocefalia, mãos em tridente e arqueamento dos membros inferiores. Complicações significativas da doença incluem cifose, infecções recorrentes do ouvido e acumulação de líquido espinhal devido ao estreitamento do forame magno. Baixa massa óssea e densidade óssea também são observadas em pacientes adultos e pediátricos com achondroplasia (Shazeeb *et al.*, 2018).

Em 90% dos casos, a mutação é esporádica sem história familiar e vem da mutação espontânea germinativa que afeta o alelo paterno. Como este tipo de mutação resulta frequentemente de erros de replicação, a origem paterna da ACH é explicada pelo número muito maior de divisões de células germinativas em homens do que em mulheres. Este efeito de idade paterna geralmente é atribuído a erros de replicação espermatogônica que se acumulam com o aumento da idade (Dakouane *et al.*, 2008).

**Figura 6:** Fotografias de indivíduos com acondroplasia.



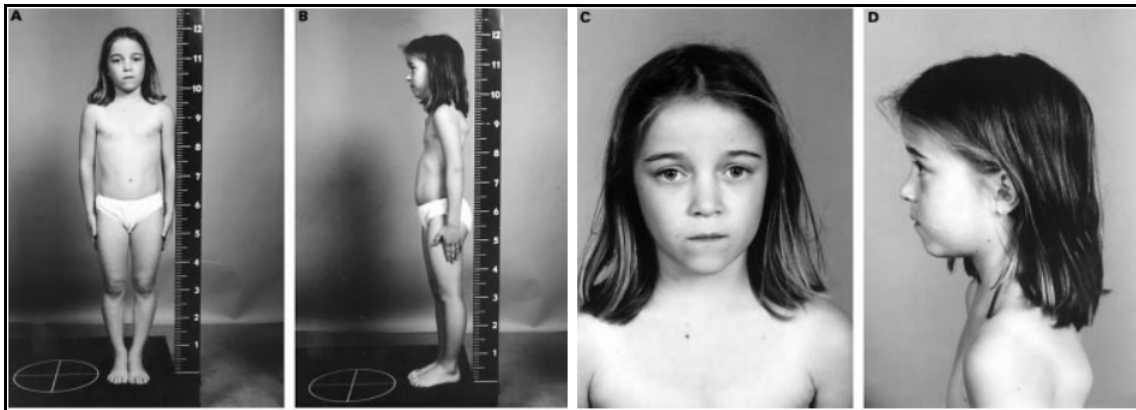
É possível observar o encurtamento dos membros, arqueamento dos membros inferiores, macrocefalia e mãos em tridente.

**Fonte:** RM Pauli, 2019.

### 1.6.2 Hipocondroplasia

A hipocondroplasia é uma doença autossômica dominante e compartilha algumas características fenotípicas com a ACH, como baixa estatura desproporcional, membros reduzidos, lordose lombar e macrocefalia (Figura 7). No entanto, essas características são menos perceptíveis do que as da ACH, o que pode dificultar o diagnóstico de HCH, especialmente até a primeira infância (Nagahara *et al.*, 2016). As características radiológicas mais importantes são o encurtamento de ossos longos, o estreitamento das distâncias interpediculares lombares, do pescoço femoral curto e ilia quadrada (Kant *et al.*, 2015).

**Figura 7:** Indivíduo com hipocondroplasia.



É possível observar a baixa estatura, testa proeminente e ponte nasal baixa.

**Fonte:** G. MORTIER et al., 2000

As mutações no gene *FGFR3* associadas a essa condição são g.17325 (p.I538V) ou g.17333 C>A ou g.17333 C>G (p.N540K) (Harada *et al.*, 2008; Vajo *et al.*, 2000).

### 1.6.3 Displasia Tanatofórica

A Displasia Tanatofórica é uma condição autossômica dominante que apresenta incidência em torno de 1 em 20.000 a 50.000 nascidos. Esta displasia caracteriza-se pelo grave encurtamento dos membros, macrocrania, hipoplasia pulmonar e micromelia (Sharma *et al.*, 2015).

É classificada em dois tipos: Displasia Tanatofórica tipo I (TDI) e Displasia Tanatofórica tipo II (TDII) e podem ser diferenciados de acordo com a forma do crânio e pela morfologia do fêmur (Sharma *et al.*, 2015). Ambas são letais no período intrauterino e/ou logo após o nascimento. A causa da morte pode ser devido a insuficiência respiratória em função da hipoplasia pulmonar, compressão do tronco cerebral pelo forame magno estreito ou uma combinação de ambos (Naveen *et al.*, 2011).

A DTI é caracterizada pelo fêmur em forma curvada semelhante a um gancho de telefone. Os ossos pélvicos e a coluna vertebral também têm o desenvolvimento comprometido (Figura 8). Essa displasia ocorre em função da substituição de aminoácidos nos domínios intra e extracelulares da proteína como resultado das mutações g.13526 C>T (p.R248C), g.13530 (p.S249C), g.16051 (p.G370C), g.16054

(p.S371C) g. 16061A>G (p.Y373C) ou g.17851A>T (p.K650M) (Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2011 & Piccolo *et al.*, 2015).

**Figura 8:** Radiografia de esqueleto e fotografia do paciente 38 com displasia tanatofórica tipo I.



A DTII apresenta fêmur reto, crânio em forma de trevo (trilobado) e os ossos não são tão curtos como no tipo I (Figura 9). Apenas uma alteração é conhecida como causa de DTII, e ela ocorre no domínio tirosina cinase do receptor FGFR3, por uma substituição p.K650E A>G (g.17852) (Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2011).

**Figura 9:** Radiografia de esqueleto e fotografia do paciente 41 com displasia tanatofórica tipo II.



### 1.7 Análise molecular no gene *FGFR3*

O indivíduo com suspeita de DE pode ser avaliado através de um exame de ultrassonografia pré-natal e da radiografia pós-natal. Entretanto, o tipo exato de displasia esquelética deve ser avaliado através da análise molecular (The Children's Hospital of Philadelphia - <http://www.chop.edu/>).

O diagnóstico ultrassonográfico pré-natal de DEs fetais é um desafio, pois existe uma variedade de diagnósticos diferenciais com características fenotípicas variáveis e sobrepostas.

Apesar de já terem sido descritas na literatura diversas alterações responsáveis por ocasionar ACH, HCH, DTI e DTII (Tabela 1), estas quatro displasias normalmente apresentam mutações recorrentes. A maioria dos indivíduos com ACH apresentam uma substituição heterozigótica de p.G380R no *FGFR3*, resultante de uma mutação pontual de G>A ou G>C no nucleotídeo 16081 do DNA genômico. Cerca de 70% dos casos de HCH são causados pela substituição p.N540K (g.17333 C> A ou C>G). A DTI se geralmente origina-se da mutação g.13526 C>T, enquanto a DTII é causada pela alteração g.17852 (Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2011).

**Tabela 1:** Relação das mutações em *FGFR3* e das displasias esqueléticas associadas.

Posição no DNA Genômico	Éxon	Mutação na Proteína	Posição no cDNA	Base Alterada	Displasia Esquelética
g.13526	7	p.R248C	c.742	C>T	DTI
g.13530	7	p.S240C	c.746	C>G	DTI
g.15980	10	p.G346E	c.1037	G>A	ACH
g.16051	10	p.G370C	c.1108	G>C	DTI
g.16054	10	p.G371C	c.1111	A>T	DTI
g.16061	10	p.Y373C	c.1118	A>T	DTI
g.16076	10	p.G375C	c.1123	G>T	ACH
g.16081	10	p.G380R	c.1138	G>A/G>C	ACH
g.17325	12	p.I538V	c.1612	A>G	HCH
g.17333	12	p.N540K	c.1620	C>A/C>G	HCH
g.17851	14	p.K60M	c.1649	A>G/A>T	DTI
g.17852	14	p.K650E	c.1949	A>G	DTII
g.18949	18	p.X807G	c.2419	T>G	DTI
g.18949	18	p.X807R	c.2419	T>A	DTI
g.18951	18	p.X807C	c.2421	A>T	DTI

Com a descoberta das bases moleculares de muitas DEs, a genética molecular tornou-se o padrão ouro para o diagnóstico deste grupo de patologias, sendo em alguns casos o único diagnóstico.

Para a detecção de mutações do gene *FGFR3* são utilizados métodos convencionais, como o sequenciamento, que é padrão ouro para o diagnóstico. Este método, apesar de ser amplamente utilizado e bastante preciso, ainda é um método demorado e de custo elevado para muitos laboratórios. Nos últimos anos, diversas novas técnicas têm sido desenvolvidas para tornar a análise de polimorfismos mais rápida, mais barata e menos trabalhosa. Uma delas é a técnica de análise das curvas de dissociação de alta resolução (do inglês *High Resolution Melting* – HRM) que tem se mostrado uma ferramenta promissora para a detecção de variações específicas no DNA, pois possibilita a triagem rápida de mutações em genes de interesse (todo o processo de detecção demora em torno de 2 horas), tornando a sua implantação no Centro de Genética Médica do Instituto Nacional da Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), um recurso muito importante para a genotipagem das DEs. O Centro de Genética Médica faz o acompanhamento clínico de patologias genéticas raras, de caráter evolutivo, crônico e de alta complexidade médica. Há anos vem aprimorando e desenvolvendo metodologias laboratoriais, como técnicas de genética molecular no estudo etiológico das malformações congênitas e doenças do desenvolvimento na criança. Neste sentido, tornou-se uma referência no Estado do Rio de Janeiro para o estudo destas doenças, entre elas as Displasias Esqueléticas (DEs).

### **1.8 Implantação da detecção de alterações no gene *FGFR3* através da técnica de HRM**

O HRM é uma técnica de rastreamento, baseado na análise da curva de dissociação (melting). Esta tecnologia caracteriza as amostras de DNA baseando-se no seu comportamento de dissociação para detectar pequenas diferenças, na composição de nucleotídeos, nas sequências amplificadas. (Sun *et al.*, 2016)

Esta técnica pode ser utilizada para identificar com precisão mutações que alteram a temperatura de melting ( $T_m$  - temperatura onde metade do produto da PCR está desnaturado) em aproximadamente 0,1 °C. Além disso, apresenta

diversas aplicações como a análise de variações em ácidos nucleicos para ensaios de metilação do DNA, rastreamento de polimorfismos desconhecidos, genotipagem, entre outros (Reed GH *et al.*, 2007).

A técnica de HRM se inicia com a amplificação por PCR da região de interesse na presença de um agente intercalante saturante de DNA dupla fita. O agente intercalante que é utilizado possui alta fluorescência quando ligado a moléculas de DNA dupla-fita e baixa fluorescência quando não ligado. A amplificação por PCR é seguida por uma etapa de desnaturação, onde a dupla fita de DNA se separa, ocorre a liberação do agente intercalante e uma diminuição crescente na fluorescência (Ruskova *et al.*, 2011).

A desnaturação, decorrente da alta temperatura, de uma molécula de DNA depende basicamente da composição e tamanho da sua sequência (Ruskova *et al.*, 2011). Sendo assim, cada produto de PCR que contenha pelo menos uma diferença em um nucleotídeo pode ser detectado pelo HRM.

No genoma humano podem ser encontrados diversos SNPs (Single Nucleotide Polymorphism – Polimorfismo de nucleotídeo único), que são classificados de acordo com a base nitrogenada alterada e a diferença esperada de  $T_m$ . Os SNPs de Classe 1 e 2 são mais fáceis de serem detectados através do HRM em comparação com os SNPs de Classe 3 e 4, que são mais difíceis de distinguir, devido a pequena alteração na  $T_m$  (Matsuda K, 2017). Essa diferença na sensibilidade na detecção é devido as variações de temperatura decorrentes das bases nitrogenadas dispostas na sequências submetidas ao HRM.

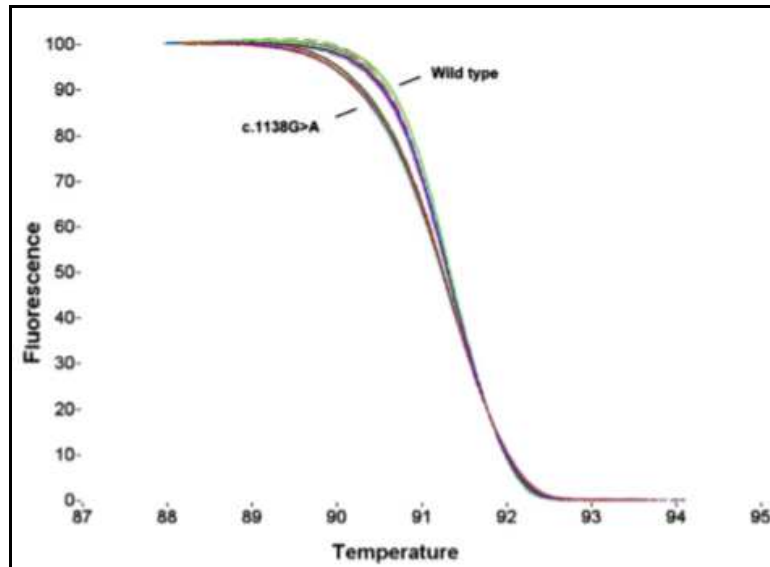
**Tabela 2:** Classificação dos SNPs mostrando a troca de nucleotídeo, mudança de T<sub>m</sub> que cada troca gera e a ocorrência no genoma humano.

<b>Classe de SNP</b>	<b>Mudança de Base</b>	<b>Mudança na curva de T<sub>m</sub></b>	<b>Ocorrência no Genoma Humano</b>
1	C/T e G/A	Grande (> 0,5 °C, média de 1,0 °C)	64%
2	C/A e G/T	Grande (> 0,5 °C, média de 1,0 °C)	20%
3	C/G	Pequena (0,2 - 0,5 °C)	9%
4	A/T	Muito pequena (< 0.2 °C)	7%

A análise de polimorfismos por HRM diminui o custo e o tempo das análises, pois associa a reação em cadeia pela polimerase (PCR) com a curva de dissociação de um DNA dupla-fita que detecta variações na sequência de DNA de indivíduos controles e pacientes (Taylor CF, 2009; Wittwer *et al.*, 2003). Neste caso, são gerados produtos de PCR específicos para investigar diferenças conformacionais nos éxons do gene de interesse. Estas diferenças são vistas pela alteração no formato da curva de dissociação entre indivíduos controle, sem a mutação, e o paciente (Figura 10). Diferenças de alteração de uma única base podem ser detectadas por HRM usando plataformas de PCR em tempo real convencionais (Zhou L *et al.*, 2005).



**Figura 10:** Gráfico de HRM mostrando a curva de dissociação de um indivíduo controle (wild type) e de um paciente com uma alteração (c.1138G>A).



**Fonte:** Hung et al., 2007

Uma vez conhecida a curva de dissociação de uma determinada mutação, pode-se identificar diretamente o tipo de alteração presente nos éxons investigados, sem a necessidade do sequenciamento. Esta genotipagem é feita através da comparação da curva de dissociação de mutações conhecidas, que servem como controle positivo ou padrão, com amostras de DNA de pacientes a serem investigados. Neste caso, quando a curva de dissociação do paciente coincidir com a curva de algum padrão, é possível determinar o tipo específico de mutação, tornando esta análise extremamente rápida e precisa. Desta forma, a técnica de HRM apresenta uma vantagem adicional, pois permite a criação de um painel de padrões de controles positivos, fazendo com que a genotipagem seja sempre ampliada à medida que novas mutações sejam detectadas e incorporadas ao painel de controles positivos.

Para a padronização da técnica, serão utilizados pacientes já sequenciados e com mutações já anteriormente determinadas.

A implantação da técnica de HRM é de extrema importância, pois constitui-se uma inovação no rastreamento de polimorfismos no IFF sendo uma técnica de baixo custo e de alto rendimento.

Neste sentido, a utilização das DEs para a implantação do HRM é importante, pois estas patologias apresentam diversas mutações recorrentes e que poderão ser utilizadas para a padronização da técnica. Além disso, a criação de um painel de controles positivos (contendo novas mutações) possibilitará um método mais ágil para a detecção de alterações no gene FGFR3.

A implantação desta técnica para genotipagem das DEs possibilita também que esta seja utilizada para o diagnóstico, acompanhamento e aconselhamento genético de diversas outras malformações congênitas reduzindo significativamente a quantidade de sequenciamentos a serem realizados resultando na diminuição do custo.

### **1.9 Fatores que afetam os ensaios de HRM**

Para uma boa análise, é importante ter alguns cuidados para que o experimento seja otimizado. Alguns fatores como a qualidade do DNA genômico, o comprimento do amplicon, o design do oligonucleotídeo, a seleção do corante intercalante de DNA e as condições de PCR afetam o comportamento de fusão (Montgomery J *et al.*, 2007).

Para a análise de HRM é recomendado que o comprimento do amplicon seja de 50-300 pb. Quanto maior o tamanho do amplicon, mais difícil é para discriminar as variantes da sequência. A obtenção da amplificação específica é fundamental para o sucesso do ensaio, pois qualquer amplificação não específica irá prejudicar a análise da técnica. (Montgomery J *et al.*, 2007)

Além do tamanho do amplicon, a qualidade da amostra também pode interferir no resultado. Amostras pouco concentradas podem favorecer a formação de dímeros de primers, enquanto amostras muito concentradas podem inibir a reação. Além disso, amostras que apresentam alta teor de sal podem alterar a interpretação dos resultados de HRM, pois alterará a termodinâmica da transição de fusão do DNA (von Ahsen N *et al.*, 2001).

Outro fator importante é a condição de PCR. Portanto, é aconselhável avaliar primeiramente os produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose. As

condições de PCR devem ser otimizadas para obter uma melhor amplificação (Wittwer CT, 2009).

## 2. OBJETIVOS

### **Geral:**

Avaliar a aplicação da técnica de HRM para a genotipagem de pacientes com displasias esqueléticas relacionadas ao gene *FGFR3*.

### **Específicos**

- Padronizar a técnica de HRM.
- Verificar a frequência das mutações encontradas relacionadas às DEs, em comparação com os dados descritos na literatura.
- Implantar a técnica de HRM como método de rastreamento para mutações no gene *FGFR3*.
- Gerar um painel de padrões de mutações do gene *FGFR3* para aumentar a eficácia e confiabilidade de genotipagem por HRM.
- Aplicar a técnica de HRM como método de genotipagem no gene *FGFR3* de indivíduos com DEs.

### **3. METODOLOGIA**

Este projeto foi cadastrado no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – IFF/FIOCRUZ (CAEE14346213.4.0000.5269).

#### **3.1 Local de estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Medicina Genômica e Laboratório de Alta Complexidade do IFF.

#### **3.2 Critérios de Inclusão**

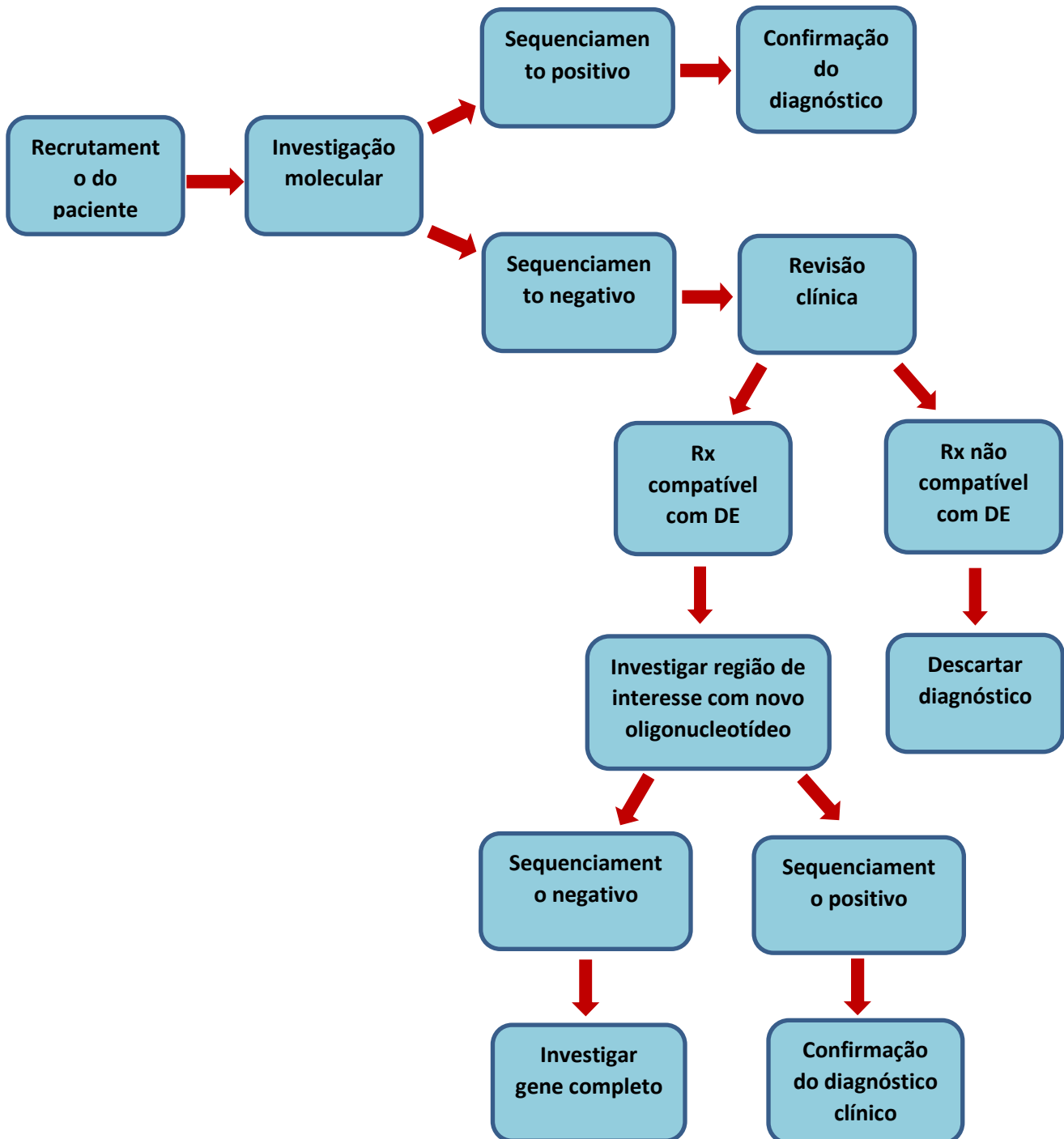
Foram considerados apenas indivíduos com diagnóstico clínico de displasias esqueléticas compatíveis com alterações no gene *FGFR3*. Estas displasias podem ser: acondroplasias, hipocondroplasias, displasia tanatofórica tipos I e II.

#### **3.3 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos do estudo indivíduos que apresentem outras formas de nanismo, indivíduos portadores de aberrações cromossômicas e indivíduos que apresentem displasias ósseas com herança autossômica recessiva.

### 3.4 Fluxograma

Figura 11: Fluxograma da análise molecular realizada no Laboratório de Medicina Genômica do IFF.



### 3.5 Pacientes

No presente estudo, 61 pacientes (Tabela 3), tiveram seu DNA investigado por HRM. Destes, 42 pacientes, diagnosticados clinicamente com suspeita de displasias esqueléticas relacionadas ao gene *FGFR3*, sendo 14 com hipocondroplasia, 22 com acondroplasia, 4 com displasia tanatofórica tipo I e 2 com displasia tanatofórica tipo II, tiveram seu DNA sequenciado em um estudo anterior do nosso grupo (Riba, Fernanda Rolemberg Gonçalves, 2016)

Os 19 pacientes restantes, tiveram seu DNA sequenciado no presente estudo, sendo 1 com hipocondroplasia, 14 com acondroplasia e 4 com displasia tanatofórica tipo I.

**Tabela 3:** Dados dos pacientes e de suas respectivas amostras analisadas neste estudo.

Paciente	Indicação Clínica	Tipo de Amostra
1	ACH	SP
2	ACH	SP
3	ACH	SP
4	ACH	SP
5	ACH	SP
6	ACH	SP
7	ACH	SP
8	ACH	SP
9	ACH	SP
10	ACH	SP
11	ACH	SP
12	ACH	SP
13	ACH	SP
14	ACH	SP
15	ACH	SP

Paciente	Indicação Clínica	Tipo de Amostra
32	HCH	SP
33	HCH	SP
34	HCH	SP
35	HCH	SP
36	HCH	SP
37	DTI	SC
38	DTI	SP
39	DTI	SC
40	DTI	SP
41	DTII	SP
42	DTII	SP
43	ACH	SP
44	ACH	SP
45	ACH	SP
46	ACH	SP

16	ACH	SP
17	ACH	SP
18	ACH	SP
19	ACH	SP
20	ACH	SP
21	ACH	SP
22	ACH	SP
23	HCH	SP
24	HCH	SP
25	HCH	SP
26	HCH	SP
27	HCH	SP
28	HCH	SP
29	HCH	SP
30	HCH	SP
31	HCH	SP

47	ACH	SP
48	ACH	SP
49	ACH	SP
50	ACH	SP
51	ACH	SP
52	ACH	SP
53	ACH	SP
54	ACH	SP
55	ACH	SP
56	ACH	SP
57	HCH	SP
58	DTI	SP
59	DTI	SP
60	DTI	SC
61	DTI	SP

SP: Sangue periférico. SC: Sangue de cordão umbilical. ACH: Acondroplasia. HCH: hipocondroplasia. DTI: Displasia tanatofórica tipo I. DTII: Displasia tanatofórica tipo II.

### 3.6 Extração de DNA

#### 3.6.1 Amostras de sangue periférico

A extração de DNA foi feita pelo método de salting out (Miller *et al.*, 1988), a partir de 1-5 mL de amostras de sangue periférico em tubos vacutainer contendo anticoagulante EDTA. O volume total de sangue foi transferido para um tubo cônico de 50 mL (Falcon), adicionado à solução de lise de hemácias (155 mM de NH<sub>4</sub>Cl pH 7,4; 10 mM de KHCO<sub>3</sub>; 1 mM de EDTA), seguido de homogeneização em vórtex (Thermolyne) e incubação no gelo durante 30 minutos. Após a incubação, o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 2.000 rpm



em centrífuga clínica (Fanen) e então o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao precipitado mais 20 mL de solução de lise de hemácias e a amostra foi novamente homogeneizada por vórtex. O tubo foi centrifugado por 20 minutos a 2.000 rpm e o sobrenadante descartado. Caso o precipitado ainda contivesse resíduos de hemácias era feita mais uma lavagem, adicionando mais 10 mL de solução de lise de hemácia seguida de homogeneização por vórtex e nova centrifugação conforme descrito acima. O sobrenadante foi descartado. Os núcleos das células foram lisados adicionando-se 3 mL de solução de lise de núcleo (10 mM de tris-HCl; 400 mM de NaCl pH 8,2; 2mM de EDTA) para 3-5 mL de sangue total, 300 µl de SDS 10% e 100µl de proteinase K (25 mg/mL). O lisado foi homogeneizado por inversão e incubado até o dia seguinte a 37 °C. Após a incubação foi adicionado 1 mL de NaCl saturado, misturado vigorosamente por inversão durante 15 segundos e centrifugado por 20 minutos a 3.000 rpm em centrífuga clínica. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico de 50 mL (Falcon) e para as amostras que ainda apresentavam aparência turva, o processo era repetido. Ao sobrenadante foi adicionado o dobro do seu volume de etanol absoluto gelado (Merck) para precipitar o DNA e em seguida a mistura foi homogeneizada lentamente por inversão até formar uma fibra. O DNA foi resgatado com o auxílio de uma alça de vidro, transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf), lavado 2 vezes em etanol 70% (Merck) e centrifugado por 5 minutos a 14.000 x g. Após a secagem da fibra, o DNA foi eluído em 200 µL de TE.

### **3.6.2 Amostras de cordão umbilical**

Para as amostras de cordão umbilical, a extração de DNA foi feita através do kit PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen) a partir de 200 µL de sangue. O sangue foi colocado em um tubo de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf), ao qual foram adicionados 20 µL de Proteinase K e 20 µL de RNase A, seguido de homogeneização em vórtex (Thermolyne) e incubação a temperatura ambiente durante 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de tampão de lise/ligação, a amostra foi novamente homogeneizada por vórtex e incubada por 10 minutos a 55 °C em banho maria. Após a incubação,

foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (Merck), seguido de homogeneização por vortex. O lisado foi transferido para uma coluna de sílica posicionada sobre um tubo de coleta para ser centrifugada por 1 minuto a 10000 x g. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo de coleta. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão 1 de lavagem à coluna e a amostra foi centrifugada por 1 minuto a 10000 x g. A coluna foi novamente transferida para um novo tubo de coleta, onde foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão 2 de lavagem seguido de centrifugação por 3 minutos a 10000 x g. Para a eluição, a coluna foi colocada em um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, e a ela foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição, seguido de incubação por 1 minuto a temperatura ambiente. Após a incubação, o material foi centrifugado por 1 minuto a 10000 x g. No segundo passo de eluição, a coluna foi colocada em um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, onde foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição, seguido de centrifugação a 10000 x g por 1,5 minutos. A coluna foi descartada e os 2 tubos de polipropileno, contendo o DNA foram armazenados a 4 °C.

### **3.7 Quantificação e avaliação do DNA genômico após extração**

Após a extração, o DNA genômico foi quantificado através da técnica de espectrofotometria, com a utilização do NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e a sua qualidade foi analisada em gel de agarose 0,8% dissolvida em TAE 1X (0,04 M de Tris-acetato, 0,01M de EDTA) contendo 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídeo (Invitrogen). A eletroforese foi realizada em aproximadamente 1h, a 5 V/cm. O DNA será mantido a 4°C, até a sua utilização.

### **3.8 Desenho dos oligonucleotídeos**

Os oligonucleotídeos sintéticos foram desenhados para amplificar segmentos de diferentes regiões conhecidas do DNA genômico envolvidas com as DEs relacionadas ao *FGFR3* (Tabela 3). A sequência do gene *FGFR3* (nº NG\_012632.1) foi obtida a partir banco de dados de nucleotídeos *genebank* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Tabela 4:** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar segmentos específicos do gene *FGFR3*. F: Sequência senso. R: Sequência anti-senso.

Designação	Tamanho (pb)	Sequência do Oligonucleotídeo	Doença relacionada
P1	121	F: 5'-TGGCCCCTGAGCGTCATCTG-3' R: 5'-GAGTTCCACTGCAAGGTG-3'	DT I
P1N	366	F: 5'-TGGAGCCTGGTCATGGAAAG-3' R: 5'-CCCACCTTGAGCACGGTAAC-3'	DT I
P2	199	F: 5'-CTCAACGCCCATGTCTTT-3' R: 5'-GGAAGCGGGAGATCTTGT-3'	ACH
P2N	331	F: 5'-CTCAACGCCCATGTCTTT-3' R: 5'-GGAAGCGGGAGATCTTGT-3'	ACH
P3	96	F: 5' TGGTGTCTGAGATGGAGATG-3' R: 5'-GCAGGGCGGTAGGTGCGGT-3'	HCH
P4	86	F: 5'-TGCACAACCTCGACTACTAC-3' R: 5'-CATGCCAGTAGGACGCCT-3'	DT II
P5	185	F: 5'-CCAGCTCCAGCTCCTCAG-3' R: 5'-TCCATCTGCACTGAGTCT-3'	TDI

Foram desenhados com a utilização do *software Primer Design (Scientific & Educational Software versão 3.0)*, cinco conjuntos de oligonucleotídeos sintéticos ao longo dos éxons do gene *FGFR3*. Para obtenção dos oligonucleotídeos, foram considerados os seguintes parâmetros: o comprimento do amplicon, a temperatura de *melting* (TM), a temperatura de anelamento, auto-complementaridade, estabilidade da região 3', percentual do conteúdo das bases G/C, formação de estruturas secundárias, a formação de dímeros e o comprimento dos oligonucleotídeos sintéticos.

Após selecionar as regiões a serem amplificadas, foi utilizado o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no site NCBI para analisar a especificidade dos iniciadores.

### 3.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Inicialmente a PCR foi utilizada para a padronização da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos para serem analisados por HRM.

Para amplificar as regiões do gene *FGFR3*, foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na tabela 3. As amplificações foram feitas utilizando 100 ng de DNA genômico, tampão 1X apropriado para a enzima Taq DNA polimerase, concentração de MgCl<sub>2</sub> de acordo com o oligonucleotídeo utilizado (tabela 3), 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,25 U de

enzima Taq DNA polimerase e 10 pmol de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso). As reações foram realizadas em volume final de 50 µl e incubadas a 94°C por 5 minutos, e 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 54°C e 30 segundos a 72°C e por último uma incubação a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, dissolvida em TAE 1X e a eletroforese realizada nas mesmas condições do item 3.7.

### **3.10 Purificação dos produtos de PCR**

Os produtos provenientes das reações de PCR foram purificados utilizando o kit *Easy Gen (Easypath)*. Foram transferidos aproximadamente 50 µl do produto de PCR para um microtubo de 1,5 mL e então foram adicionados 5x o volume de tampão de lise/ligação e em seguida a amostra foi homogeneizada e então transferida para uma coluna posicionada em um tubo de coleta. A coluna foi centrifugada por 30 segundos a 10.000 x g e em seguida o filtrado descartado. A coluna foi lavada com 750 µl de tampão de lavagem, centrifugada por 30 segundos a 10.000 x g e o filtrado novamente descartado. Em seguida, foi realizada uma centrifugação de 3 minutos a 10.000 x g e a coluna foi colocada em um novo microtubo de 1,5 mL, foram então adicionados 40 µl de tampão de eluição no centro da membrana da coluna, seguido de incubação a temperatura ambiente por 2 minutos. Após esse período, o produto de PCR foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 x g, quantificado com a utilização do NanoDrop® 2000 e a sua qualidade analisada em gel de agarose 2,0%.

Os produtos de PCR purificados foram armazenados a -20°C até serem analisados por sequenciamento.

### **3.11 Sequenciamento de Sanger**

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados na Unidade de Sequenciamento da Rede de Plataformas da Fundação Oswaldo Cruz, utilizando o equipamento ABI PRISM TM 3100 *Capillary DNA Sequencer Applied Biosystems*. As reações de sequenciamento foram realizadas de

acordo com Sanger et al., 1997 utilizando-se o *Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems).

O sequenciamento de cada paciente foi realizado com os oligonucleotídeos senso e antisenso descritos anteriormente.

### 3.12 Análise das Sequências

A sequência de referência do gene *FGFR3*, disponível no banco de dados NCBI (número de acesso NG\_012632.1) foi alinhada com as sequências obtidas através do sequenciamento, para verificar as similaridades entre as mesmas. Foi utilizado o programa *BioEdit* (versão 7.1.9.0) para realizar estas análises.

### 3.13 Dissociação em Alta Resolução (HRM)

Foi realizada a padronização das reações para definição das concentrações ideais de primers e de DNA genômico (gDNA). As condições que resultaram em amplificações mais eficientes (menor Ct - *Cycle threshold*) seguem listadas na tabela abaixo. Cada reação foi preparada tendo como volume final 20  $\mu$ L.

**Tabela 5:** Concentração do DNA genômico e dos oligonucleotídeos utilizados para cada DE.

<b>Displasia esquelética</b>	<b>Concentração dos oligonucleotídeos</b>	<b>Concentração gDNA</b>
ACH	0,8 $\mu$ M	30 $\mu$ g/mL
HCH	0,4 $\mu$ M	30 $\mu$ g/mL
TDI	0,4 $\mu$ M	30 $\mu$ g/mL
TDII	0,4 $\mu$ M	30 $\mu$ g/mL

Foi utilizado o aparelho 7500 FAST Real time System (Life Technologies) para a obtenção das curvas de melting referentes às amostras de cada paciente em relação a um DNA controle (selvagem). A calibração do sistema foi feita com o MeltDoctor™ HRM Calibration Plates (Life Technologies). Para as amplificações foi utilizado o kit comercial MeltDoctor™ HRM Master Mix (Life Technologies), seguindo as recomendações do

fabricante. Foram utilizados os oligonucleotídeos descritos no quadro 1, 30 ng de DNA genômico e 10 pmol de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso). Foram feitas reações em triplicata para cada amostra. Foram utilizadas placas ópticas de reação de 96 poços (Applied 45 Biosystems, Foster City, CA, USA), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems), que foram acopladas ao aparelho 7500 FAST Real time System (Life Technologies). Para a amplificação do material, as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, para desnaturação da fita, e 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos primers e extensão da nova fita. A curva de melting foi obtida através dos seguintes passos: 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto, aumento lento da temperatura (rampa de aquecimento a 1%), permanecendo por 15 segundos a 95°C, finalizando com 60°C por 15 segundos. Os resultados foram analisados através do High Resolution Melt Software v3.0.1 (Life Technologies), que contém funcionalidades que tornam a análise dos resultados do HRM extremamente rápidas e precisas. Os padrões de dissociação foram definidos através da análise convencional e normalizados através de intervalos de análise determinados para cada produto alvo da PCR.

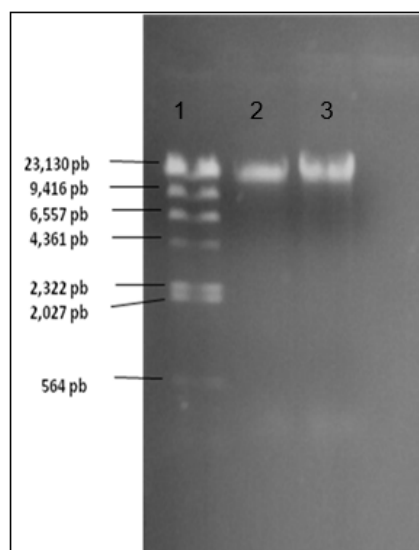
Para as reações de HRM, os produtos da PCR foram submetidos a um gradiente crescente de temperatura em presença de um intercalante fluorescente saturante que possui afinidade pela molécula de DNA dupla-fita (Type-IT Assay Kit- Qiagen).

## 4. RESULTADOS

Este trabalho teve como objetivo identificar alterações genéticas no gene *FGFR3* em pacientes com suspeita de acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatofórica tipo I e displasia tanatofórica tipo II encaminhados pelo serviço de Genética Médica do Instituto Nacional da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira e padronizar e implantar a técnica de HRM como um método de genotipagem para estas DEs.

A extração de DNA das 61 amostras foi realizada com sucesso. Através da técnica de eletroforese em gel de agarose, foi possível visualizar a qualidade do DNA genômico, demonstrando que os DNAs extraídos não apresentavam degradação, estavam com a solubilização adequada e com boa qualidade para serem utilizados na técnica de PCR e de HRM (Figura 12).

**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% representativa de DNA genômico extraído pelo método de *salting out*. Poço1: padrão de peso molecular  $\lambda$  *HIND III*; poço 2: paciente 27; poço3: paciente 28.

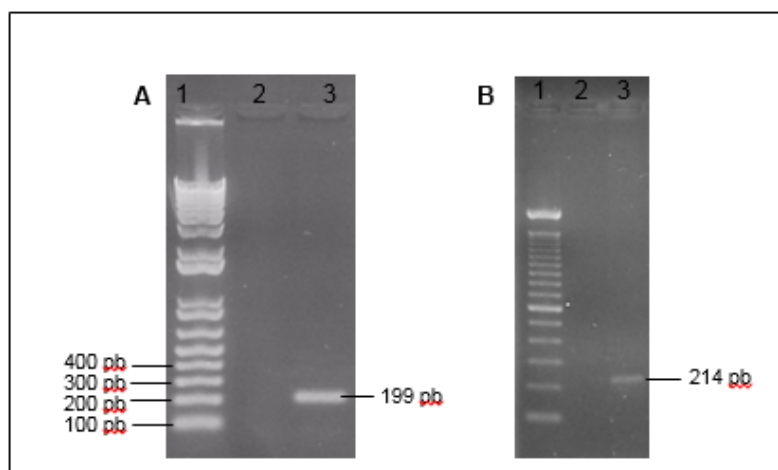


### 4.1 Amplificação de regiões do gene *FGFR3*

Antes da utilização da técnica de HRM, os DNAs dos pacientes foram amplificados por PCR e sequenciados, para que suas mutações fossem discriminadas, possibilitando posteriormente a utilização destas amostras como controles positivos para padronização e realização da técnica de HRM.

Após a padronização da técnica de PCR, todas as 61 amostras de DNA foram amplificadas. Posteriormente, os produtos de PCR foram analisados em um gel de agarose, permitindo verificar que os fragmentos amplificados apresentavam o tamanho esperado (Tabela 3) quando comparados com o padrão de peso molecular (Figura 13).

**Figura 13:** Eletroforese realizada em gel de agarose 1,5% dos produtos provenientes da padronização da amplificação de regiões do gene *FGFR3* relacionadas com as DEs.

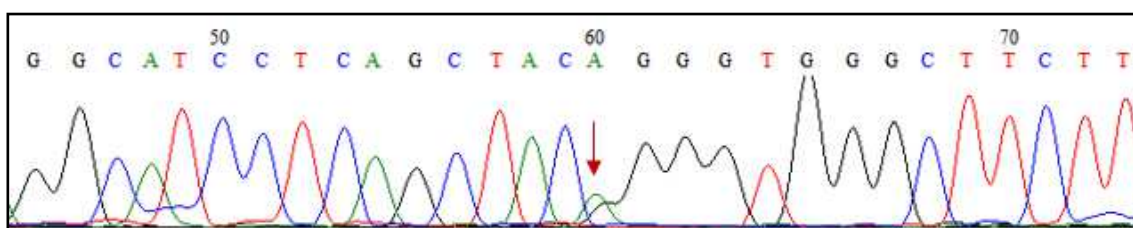


(A) Poço 1: padrão de peso molecular 1kb ladder; poço 2: branco; poço 3: fragmento amplificado com o conjunto de oligonucleotídeos P2. (B) Poço 1: padrão de peso molecular Low mass; poço 2: branco; poço 3: fragmento amplificado com o conjunto de oligonucleotídeos P1.

#### 4.2 Pacientes com suspeita de Acondroplasia

O par de oligonucleotídeos 2 (P2) (Tabela 3) foi utilizado para amplificar e sequenciar a amostra de DNA dos pacientes com suspeita de acondroplasia. Trinta pacientes, sendo 2 membros da mesma família e 28 apresentando uma mutação *de novo*, apresentaram a substituição g.16081 G>A (p.G380R) em heterozigose, associada ao fenótipo de acondroplasia e já descrita na literatura (Figura 14).

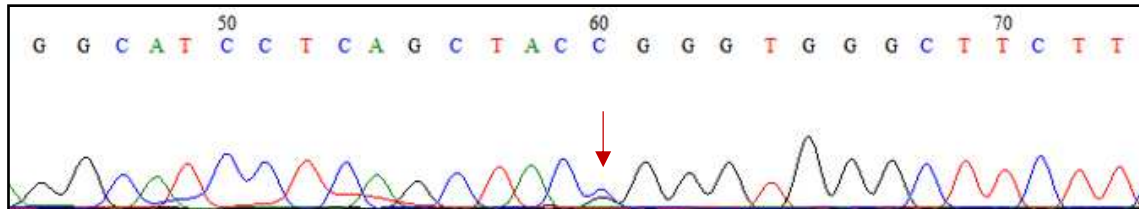
**Figura 14:** Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.16081 G>A.





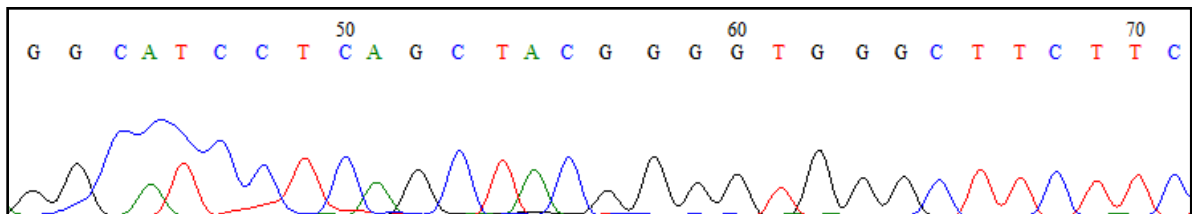
Três pacientes, sendo 2 membros da mesma família e 1 apresentando uma mutação *de novo*, apresentaram resultado positivo para a mutação g.16081 G>C (p.G380R) (Figura 15).

**Figura 15:** Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.16081 G>C.



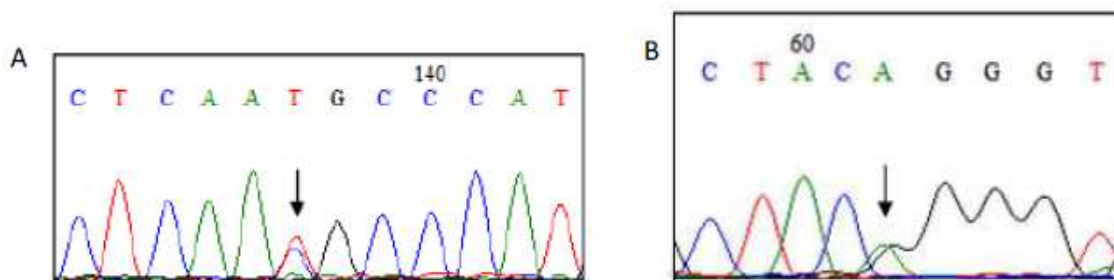
Os pacientes 2, 7 e 46 apresentaram polimorfismo na região de anelamento do oligonucleotídeo P2 no alelo mutado, o que resultou em um sequenciamento negativo para as mutações no gene *FGFR3*, pois na reação de PCR somente o alelo selvagem foi amplificado (Figura 16). Após a revisão clínica destes 3 casos, foi visto através da radiografia que os pacientes apresentavam fenótipo típico para ACH. Com o objetivo de tentar solucionar o problema, foi sintetizado um oligonucleotídeo (P2 N) para amplificar novamente o DNA destes pacientes.

**Figura 16:** Eletroferograma negativo do paciente 2.



Com a utilização do oligonucleotídeo P2 N, foi possível identificar além da mutação heterozigota g.16081 G>A, um polimorfismo na posição g.16002 C>T, que está presente na região de anelamento do oligonucleotídeo 2 (P2) (Figura 17). Após estes resultados, foi pesquisado no dbSNP (banco de dados de variações genéticas curtas) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), que é um banco de dados que contém variações genéticas já identificadas na literatura, e foi visto que esta é uma região comum de polimorfismo.

**Figura 17:** A: Eletroferograma do sequenciamento do paciente 2 evidenciando o polimorfismo na posição g.16002 C>T. B: Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.16081 G>A do mesmo paciente.

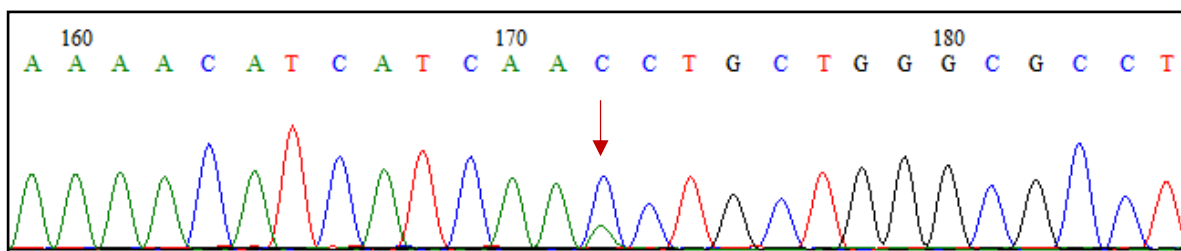


Três pacientes com suspeita de ACH apresentaram resultado negativo para essas mutações recorrentes nesta doença. Após revisão clínica destes casos, foi descartada a possibilidade desse diagnóstico.

#### 4.3 Pacientes com suspeita de Hipocondroplasia

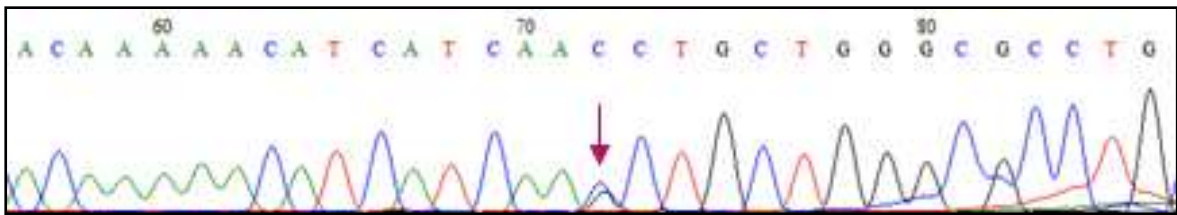
Para amplificar as amostras de DNA dos 15 pacientes com suspeita de hipocondroplasia, foi utilizado o par de oligonucleotídeos P3 (Tabela 3). Cinco pacientes apresentaram resultado positivo para a mutação g.17333 C>A (p.N540K) (Figura 18).

**Figura 18:** Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.17333 C>A.



Cinco pacientes, sendo 3 membros da mesma família e dois pacientes apresentando uma mutação *de novo*, apresentaram resultado positivo para a mutação g.17333 C>G (p.N540K) (Figura 19).

**Figura 19:** Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.17333 C>G.

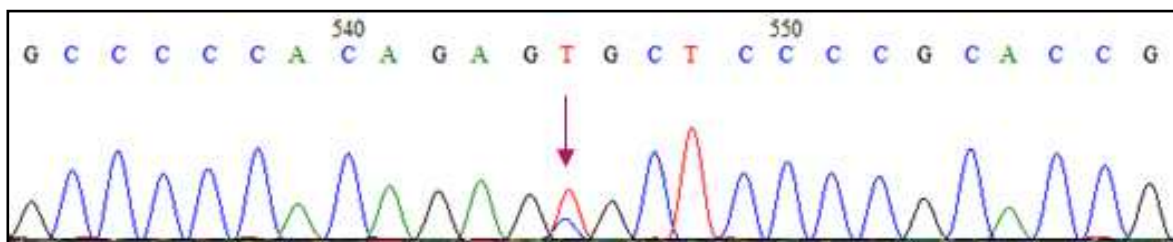


Cinco pacientes com suspeita de HCH apresentaram resultado negativo para as mutações relacionadas a esta doença. Após revisão clínica destes casos, foi descartada a possibilidade desse diagnóstico.

#### 4.4 Pacientes com suspeita de Displasia Tanatofórica Tipo I

Para amplificar as amostras de DNA de pacientes com displasia tanatofórica tipo I foi utilizado o par de oligonucleotídeos P1 (Tabela 3). Seis pacientes apresentaram a mutação g.13526 C>T (p.R248C) (Figura 20).

**Figura 20:** Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.13526 C>T.



Os pacientes 58 e 61, com suspeita de DTI, apresentaram resultado negativo para a mutação mais recorrente associada a esta DE. Primeiramente, foi investigada a mutação descrita na literatura como a mais recorrente. Posteriormente, foram investigadas outras alterações também já descritas utilizando os oligonucleotídeos (P2, P3, P4 e P5) disponíveis no laboratório. Após a revisão clínica, foi visto que as radiografias dos dois pacientes eram compatíveis com o fenótipo típico para DTI (Figura 21). Com o objetivo de tentar solucionar o problema, foi sintetizado um novo oligonucleotídeo P1N, para amplificar novamente os DNAs destes pacientes. Após a amplificação com o P1N, o paciente 58 teve resultado negativo através do sequenciamento de *sanger*. Segundo a literatura, nestes casos é recomendado sequenciar todo

o genoma para a busca de novas mutações no mesmo gene ou em outro gene (Seok *et al.*, 2016). Por isso, a amostra deste paciente será encaminhada para investigação de outras alterações através do sequenciamento de nova geração (do inglês *Next-Generation Sequencing* - NGS). A amostra do paciente 61 foi enviada para sequenciamento e ainda não há resultado.

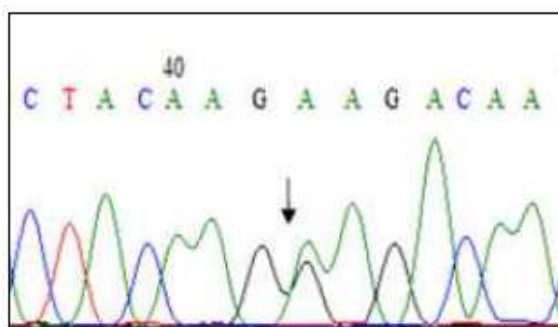
**Figura 21:** Radiografia do paciente 58 compatível com DTI, que apresenta fêmur em forma curvada.



#### 4.5 Pacientes com suspeita de Displasia Tanatofórica Tipo II

As 2 amostras de DNA dos pacientes com DTII foram amplificadas utilizando o par de oligonucleotídeos P4 (Tabela 3) e apresentaram resultado positivo para a mutação g.17852 A>G (p.K650E) (Figura 22).

**Figura 22:** Eletroferograma representativo da alteração heterozigota g.17852 A>G.



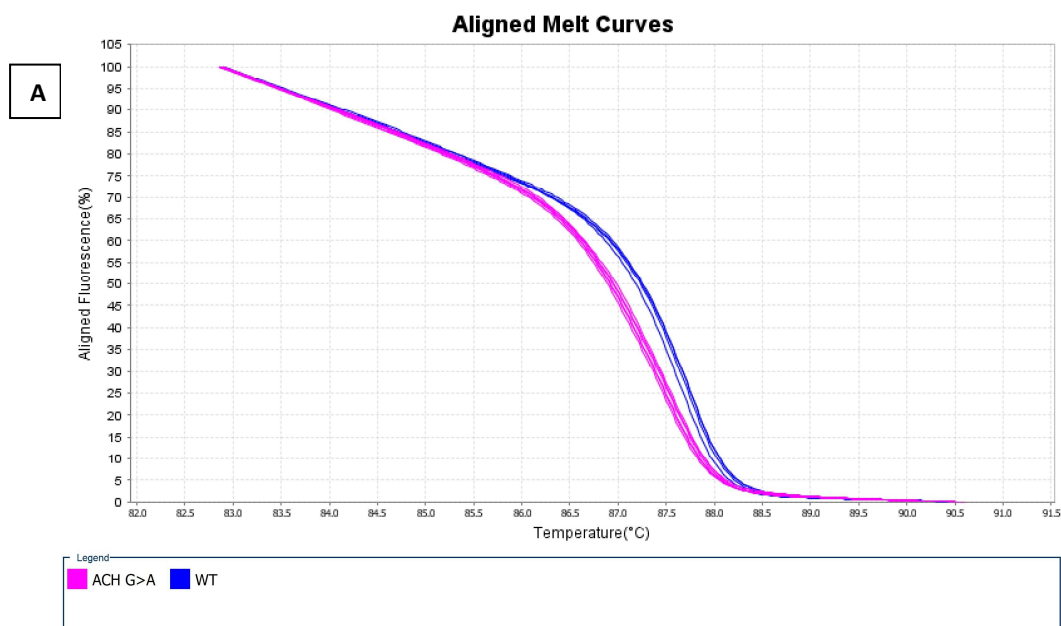
## 4.6 Dissociação em Alta Resolução (HRM)

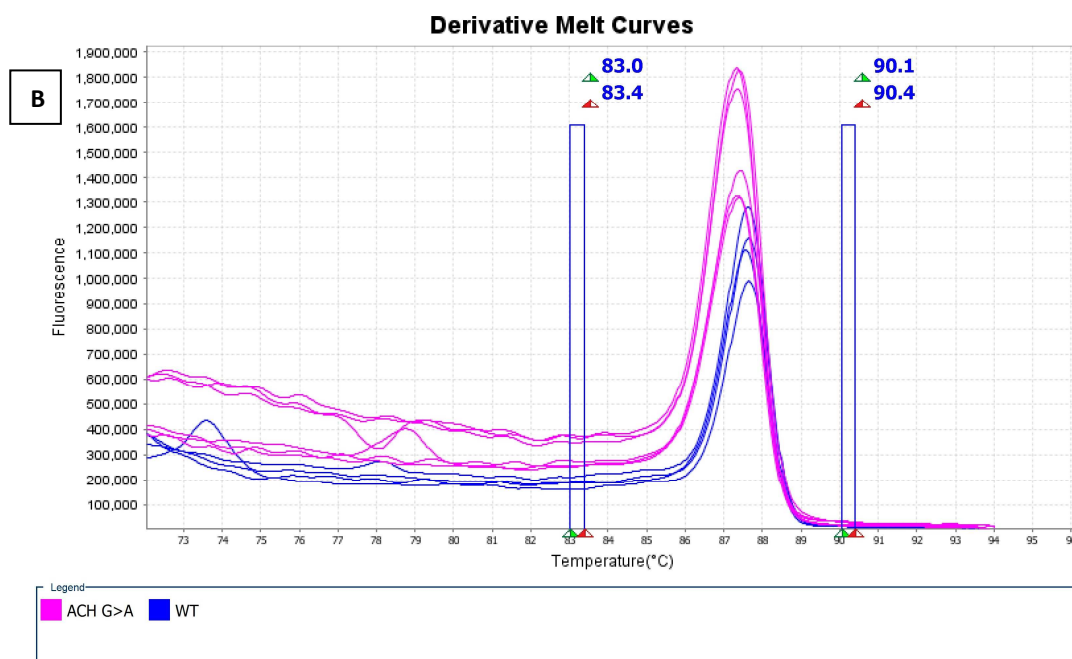
Após a amplificação e discriminação das mutações através do sequenciamento de *Sanger*, as amostras de DNA dos pacientes foram utilizadas para a padronização da técnica de HRM.

### 4.6.1 Acondroplasia

Para a padronização da técnica de HRM, foi utilizado o par de oligonucleotídeos P2 (Tabela 3) e foram utilizadas amostras de 6 pacientes que apresentaram a substituição g.16081 G>A (p.G380R) em heterozigose (Figura 23). A técnica foi realizada em triplicata e foi utilizada uma amostra de um indivíduo que não apresenta mutação como controle negativo.

**Figura 23:** Análise de HRM dos pacientes com ACH que apresentam a alteração g.16081 G>A.

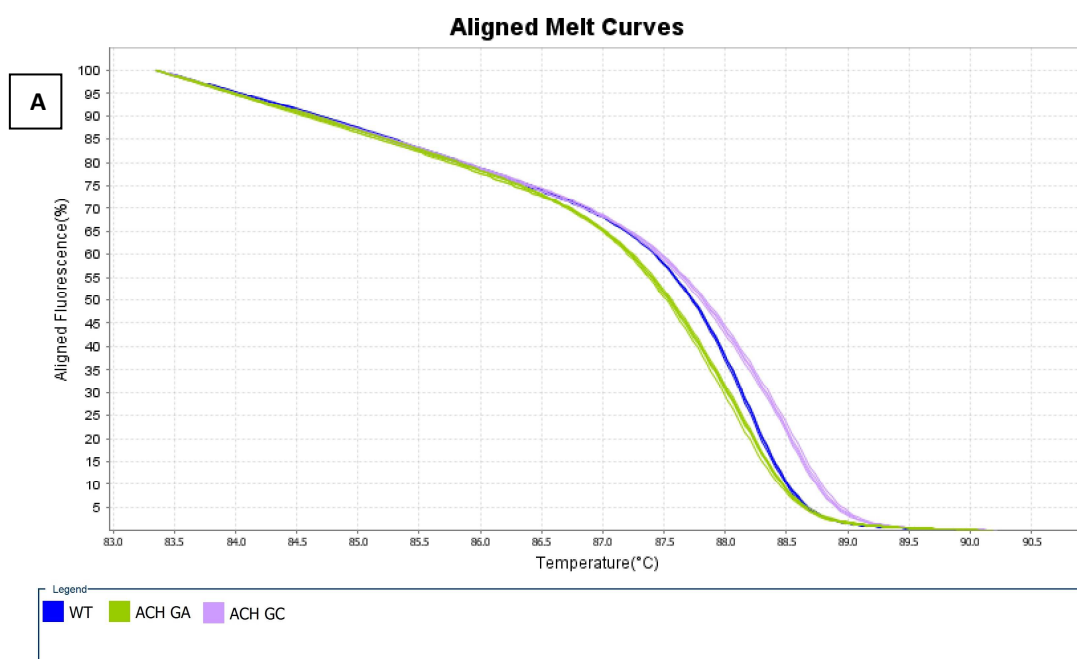


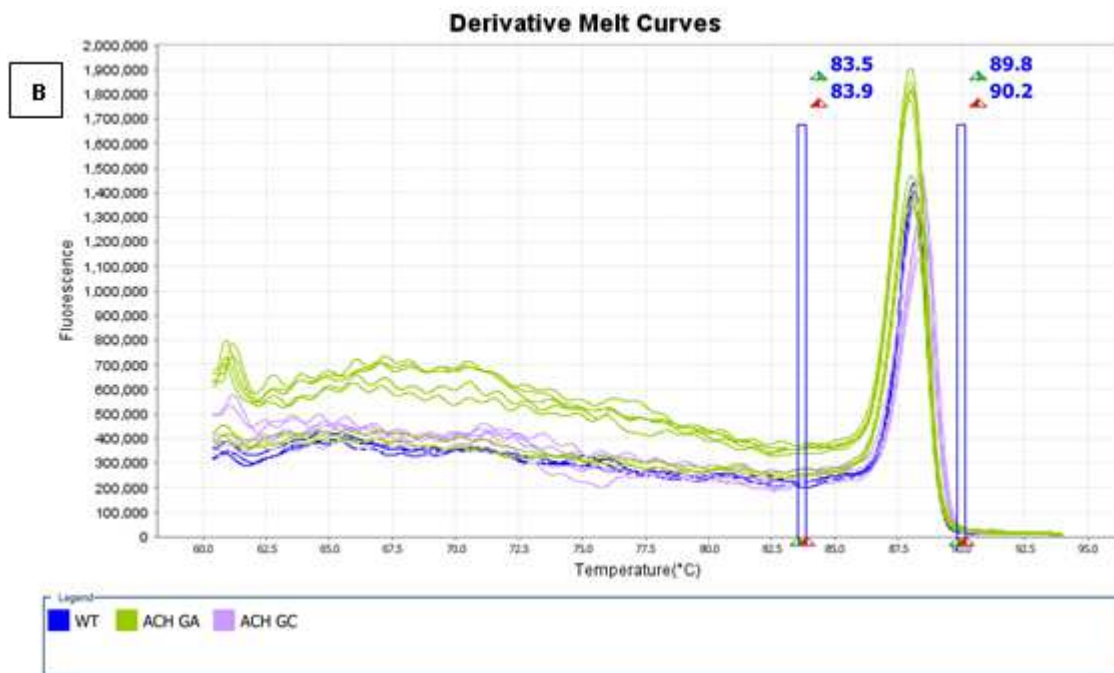


A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. ACH G>A: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>A. WT: Selvagem.

Posteriormente, foi realizada a análise das amostras dos 3 pacientes que apresentaram resultado positivo para a mutação g.16081 G>C, a mutação menos frequente em pacientes com ACH (1%) (Figura 24). Foi utilizado como controle a amostra de um paciente com a mutação g.16081 G>A e um controle negativo.

**Figura 24:** Análise de HRM dos pacientes com ACH que apresentam as alterações g.16081 G>A e g.16081 G>C.

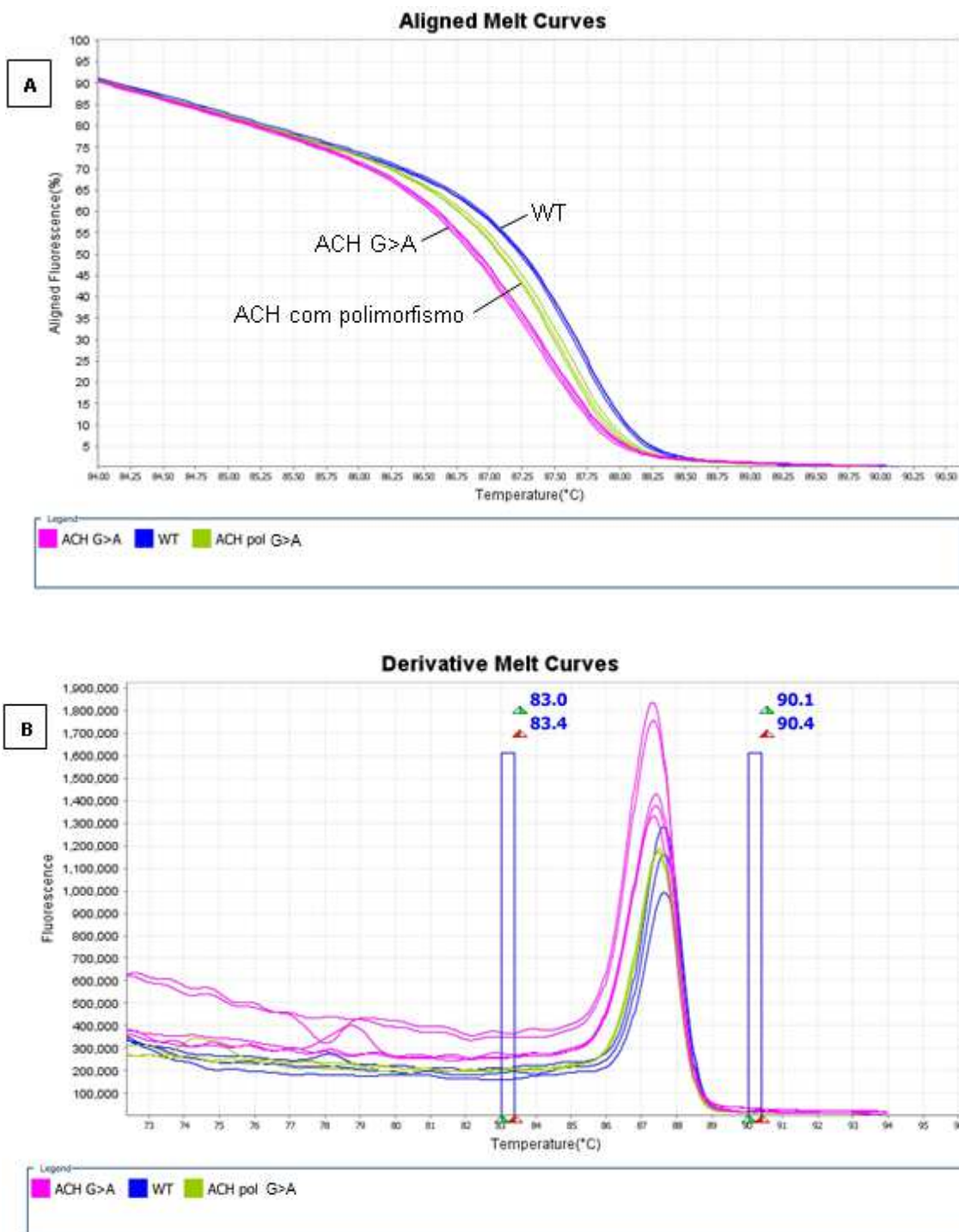




A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. ACH G>A: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>A. ACH G>A: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>C. WT: Selvagem.

O DNA dos pacientes que apresentaram polimorfismo na região de anelamento do par de oligonucleotídeos P2 (Tabela 3) foi utilizado para testar a eficácia técnica de HRM. Para realizar este experimento, foi utilizado o mesmo par de oligonucleotídeos (P2). Utilizando a técnica de HRM foi possível discriminar os pacientes ACH que possuem polimorfismo, dos pacientes com ACH que não apresentam polimorfismo e dos pacientes controles, sem a mutação (Figura 25).

**Figura 25:** Análise de HRM de pacientes com ACH que apresentam a alteração g.16081 G>A e polimorfismo.

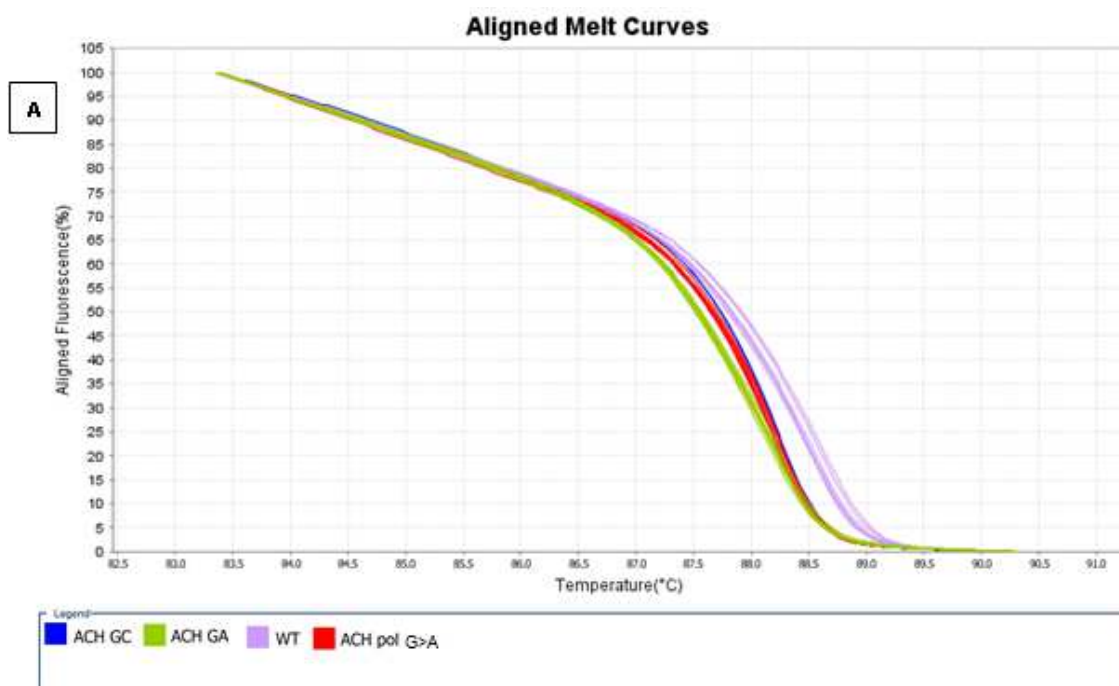


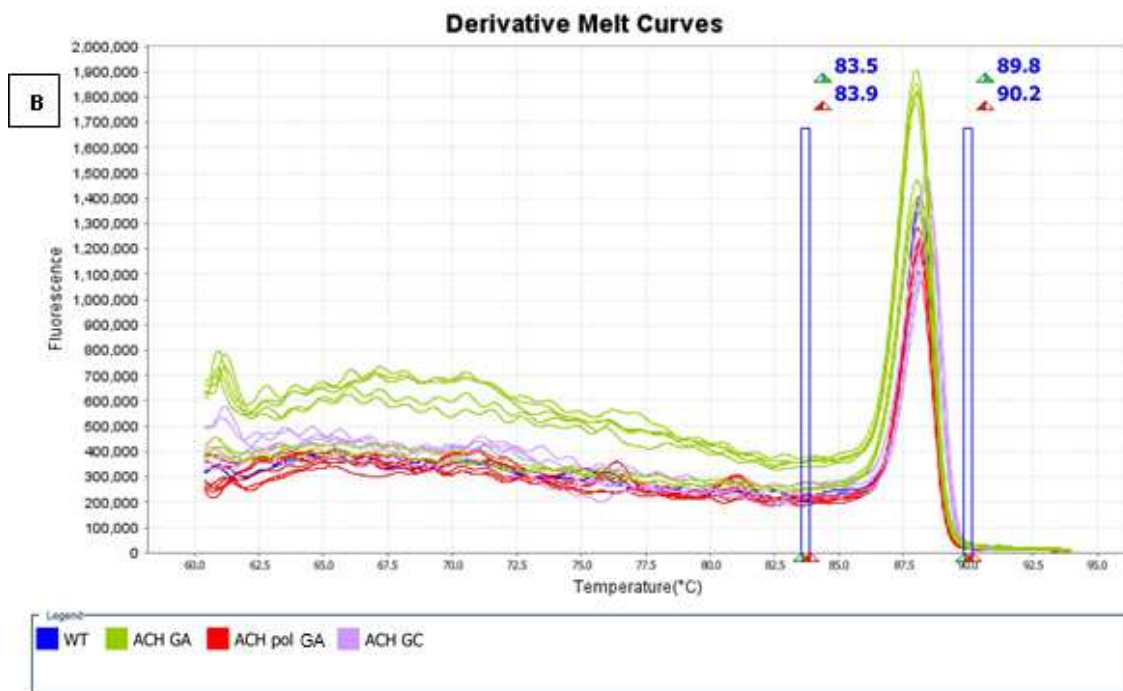
A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. ACH G>A: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>A. ACH pol G>A: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>A e polimorfismo. WT: Selvagem.



Posteriormente, a técnica de HRM foi realizada para testar todas as alterações encontradas nos pacientes com ACH. Quando a amostra que apresentava a mutação g.16081 G>C foi testada em conjunto com as amostras que tinham a alteração g.16081 G>A e g.16081 G>A com polimorfismo, não foi possível discriminar a curva de dissociação dos pacientes g.16081 G>C dos que apresentavam a mutação g.16081 G>A acrescida de polimorfismo (Figura 26).

**Figura 26:** Análise de HRM dos pacientes com ACH.



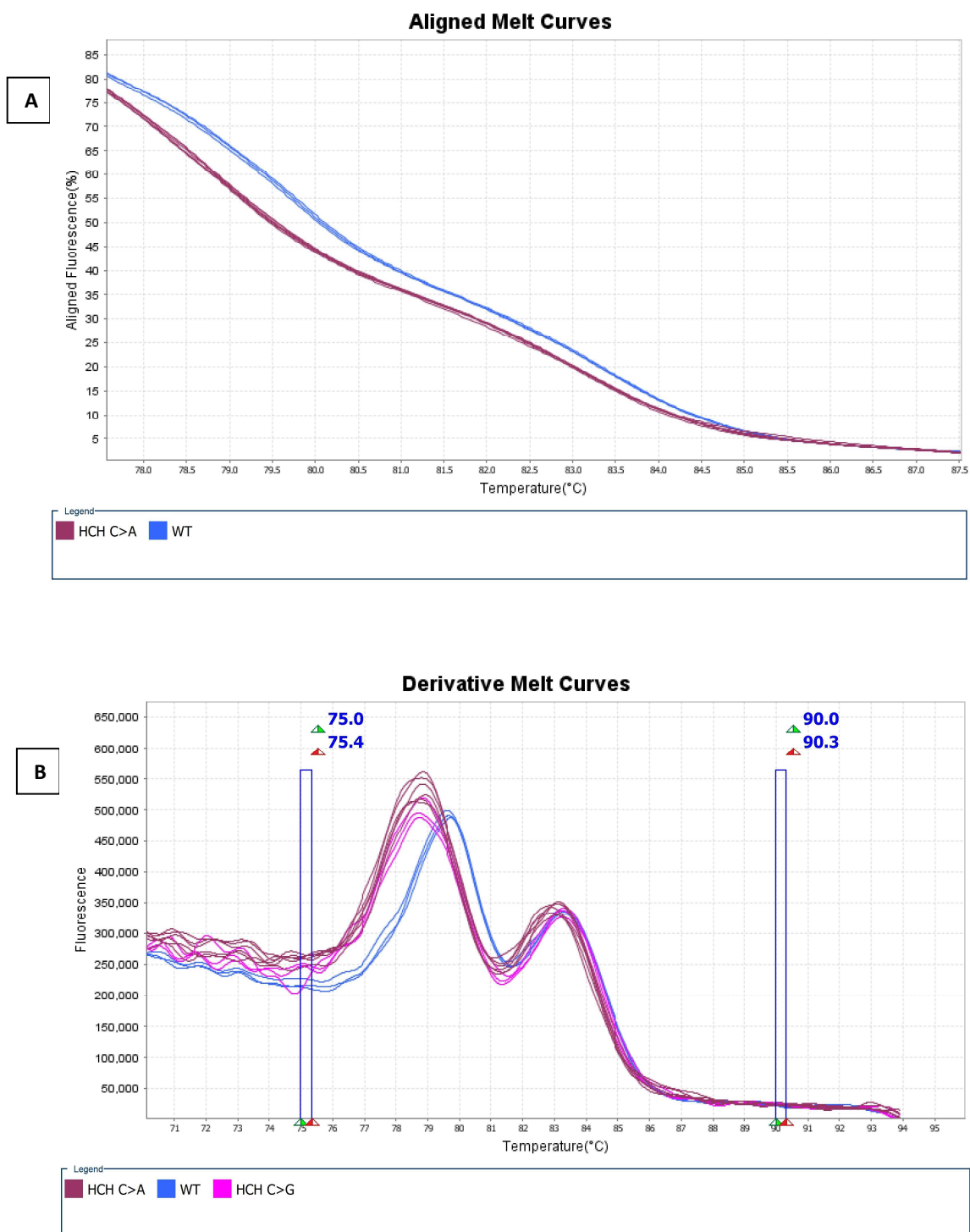


A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. ACH GA: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>A. ACH pol GA: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>A e polimorfismo. ACH GC: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>C. WT: Selvagem.

#### 4.6.2 Hipocondroplasia

Para amplificar as amostras de DNA dos pacientes com suspeita de hipocondroplasia foi utilizado o par de oligonucleotídeos P3 (Tabela 3). Para a padronização da técnica de HRM, foram utilizadas amostras de 6 pacientes que apresentaram a substituição g.17333 C>A (p.N540K) em heterozigose (Figura 27). A técnica foi realizada em triplicata e foi utilizada uma amostra como controle negativo.

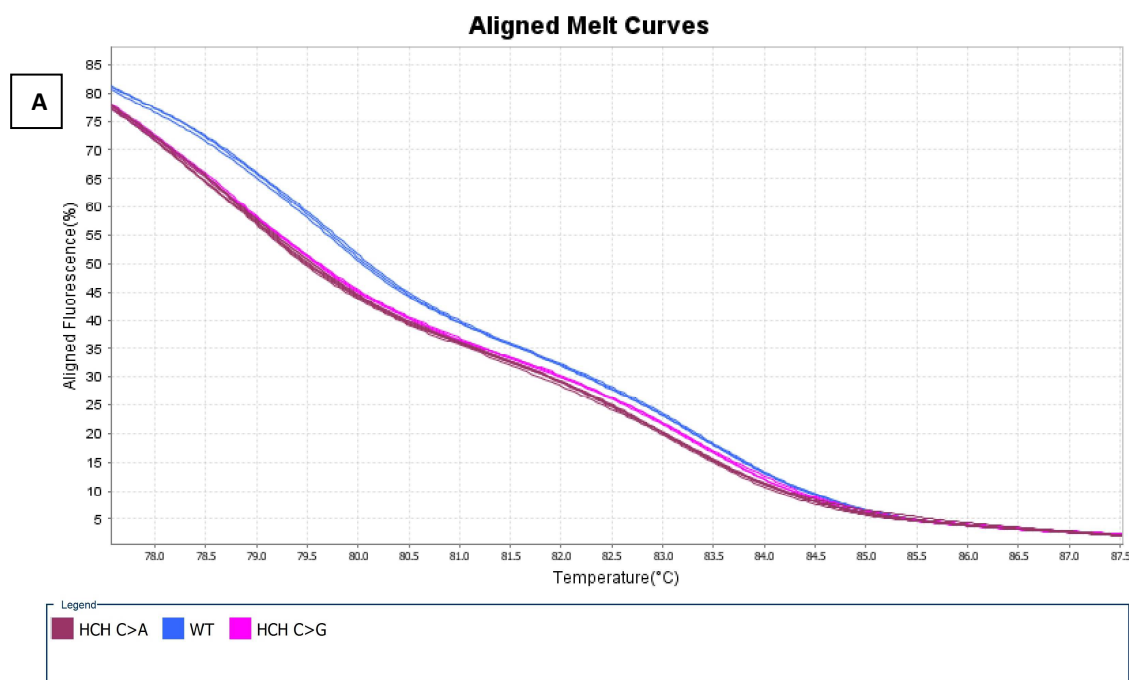
**Figura 27:** Análise de HRM dos pacientes com HCH que apresentam a alteração g.17333 C>A.

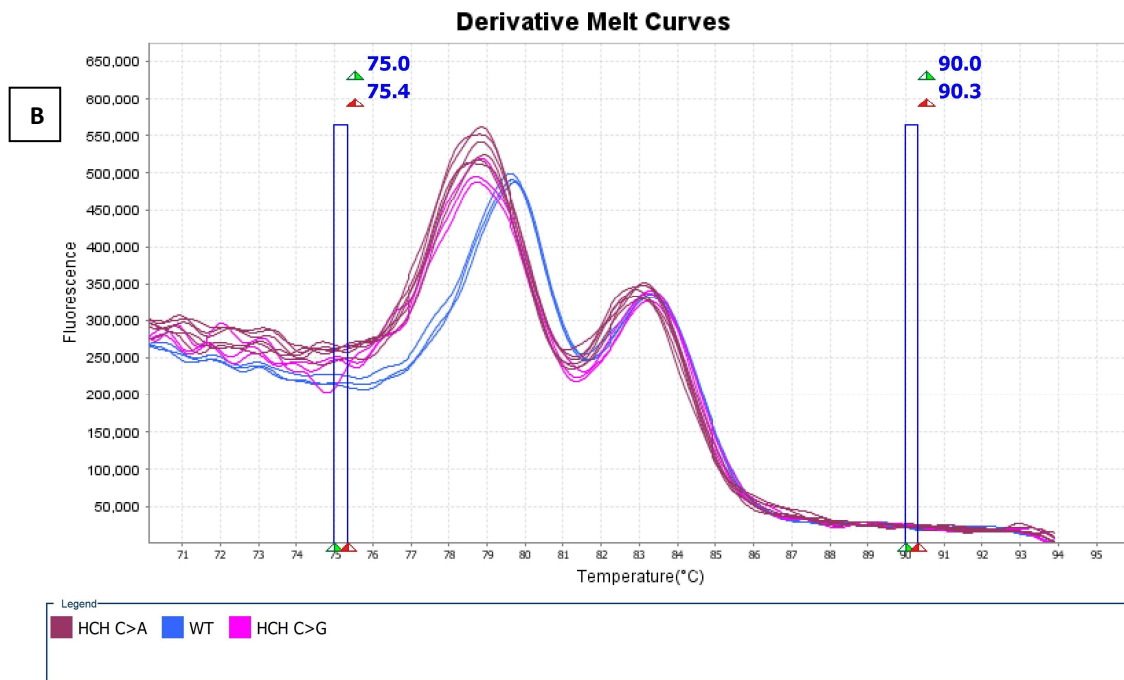


A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. HCH C>A: Hipocondroplasia com a alteração g.17333 C>A. WT: Selvagem.

Posteriormente, foi realizada a análise das amostras dos 4 pacientes que apresentaram resultado positivo para a mutação g.17333 C>G (p.N540K) (Figura 28). Foi utilizado como controle a amostra de um paciente com a mutação g.16081 C>A e um controle negativo.

**Figura 28:** Análise de HRM dos pacientes com HCH que apresentam a alteração g.17333 C>A e g.17333 C>G.

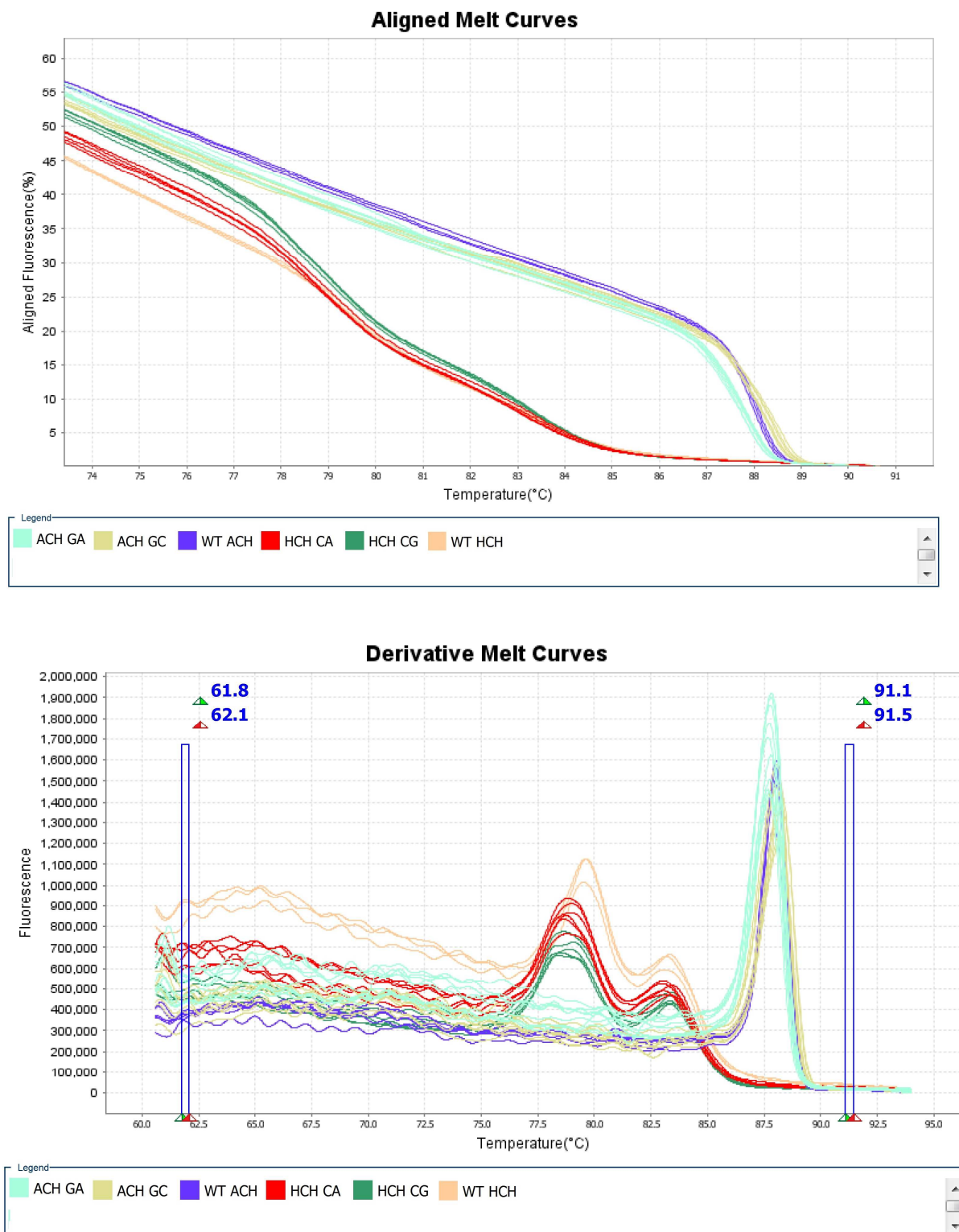




A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. HCH C>A: Hipocondroplasia com a alteração g.17333 C>A. HCH C>G: Hipocondroplasia com a alteração g.17333 C>G. WT: Selvagem.

Como pode existir sobreposição fenotípica entre ACH e HCH, as amostras dos pacientes que apresentam estas DEs foram analisadas em conjunto, onde foi possível discriminar a curva de dissociação das duas displasias. (Figura 29).

**Figura 29:** Análise de HRM dos pacientes com ACH e HCH. A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada.

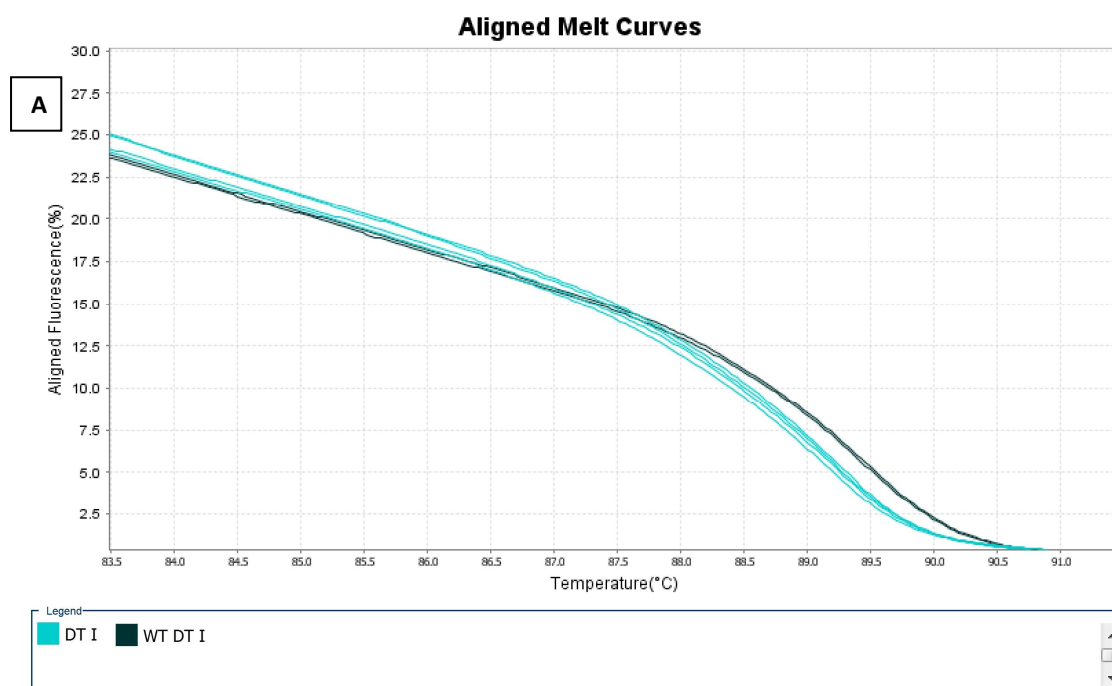


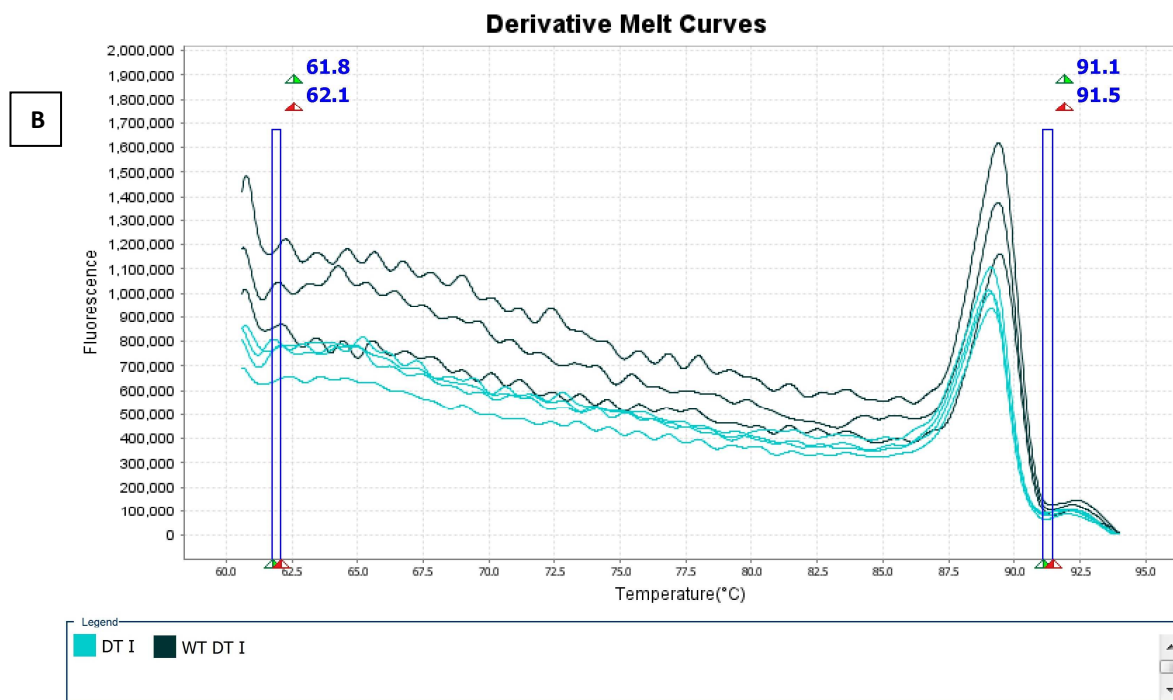
A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. ACH GA: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>A. ACH GC: Acondroplasia com a alteração g.16081 G>C. WT ACH: Selvagem ACH. HCH CA: Hipocondroplasia com a alteração g.17333 C>A. HCH CG: Hipocondroplasia com a alteração g.17333 C>G. WT HCH: Selvagem HCH.

### 4.6.3 Displasia Tanatofórica tipo I

Para amplificar as amostras de DNA dos pacientes com suspeita de displasia tanatofórica tipo I foi utilizado o par de oligonucleotídeos P1 (Tabela 3). Para a padronização da técnica de HRM, foram utilizadas amostras de 3 pacientes que apresentaram a mutação g.13526 C>T (p.R248C) (Figura 30).

**Figura 30:** Análise de HRM dos pacientes com DTI que apresentam a alteração g.13526 C>T.



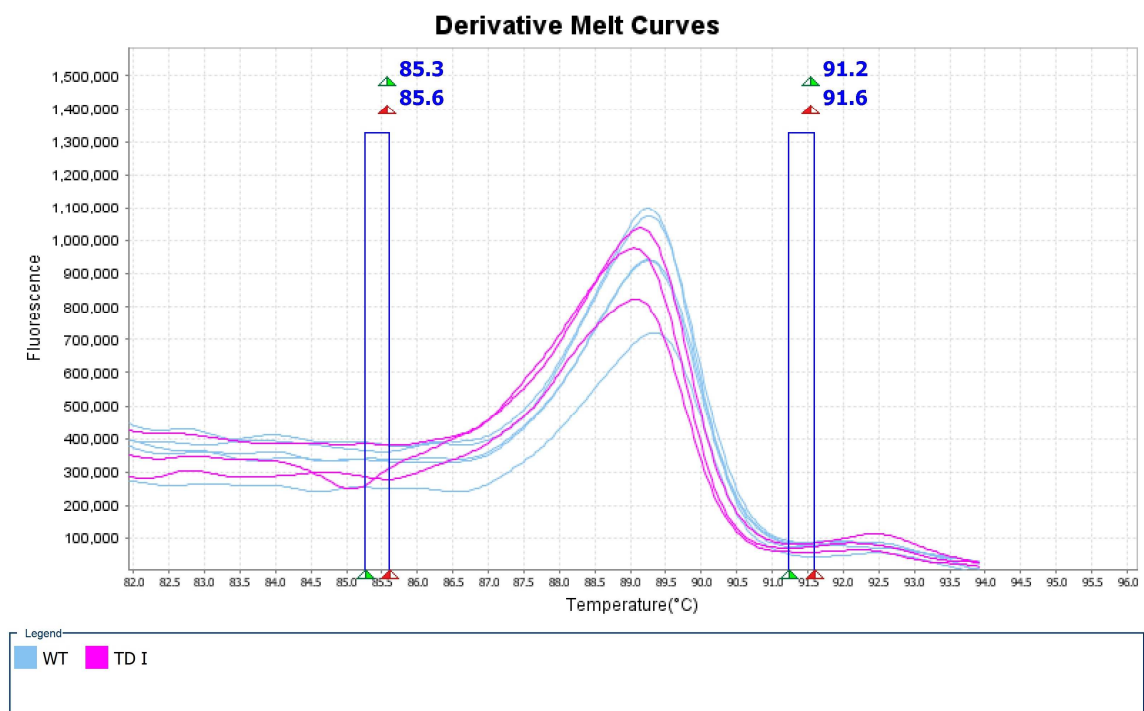
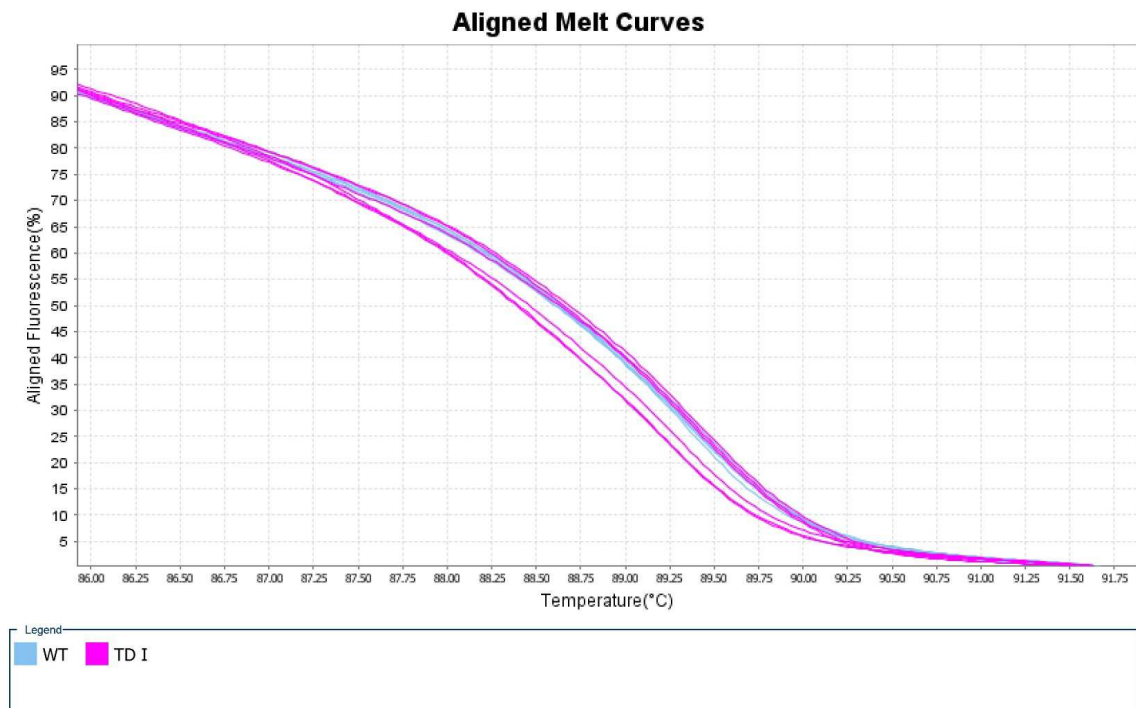


A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. DTI: Displasia Tanatofórica I com a mutação g.13526 C>T. WT DTI: Selvagem Displasia Tanatofórica I.

A amostra do paciente 58, que teve como resultado sequenciamento negativo, foi utilizada no HRM. Nesta técnica também houve resultado negativo, onde a curva de dissociação do paciente foi semelhante à curva do controle negativo (Figura 31).



**Figura 31:** Análise de HRM do paciente 58 com suspeita de DTI.

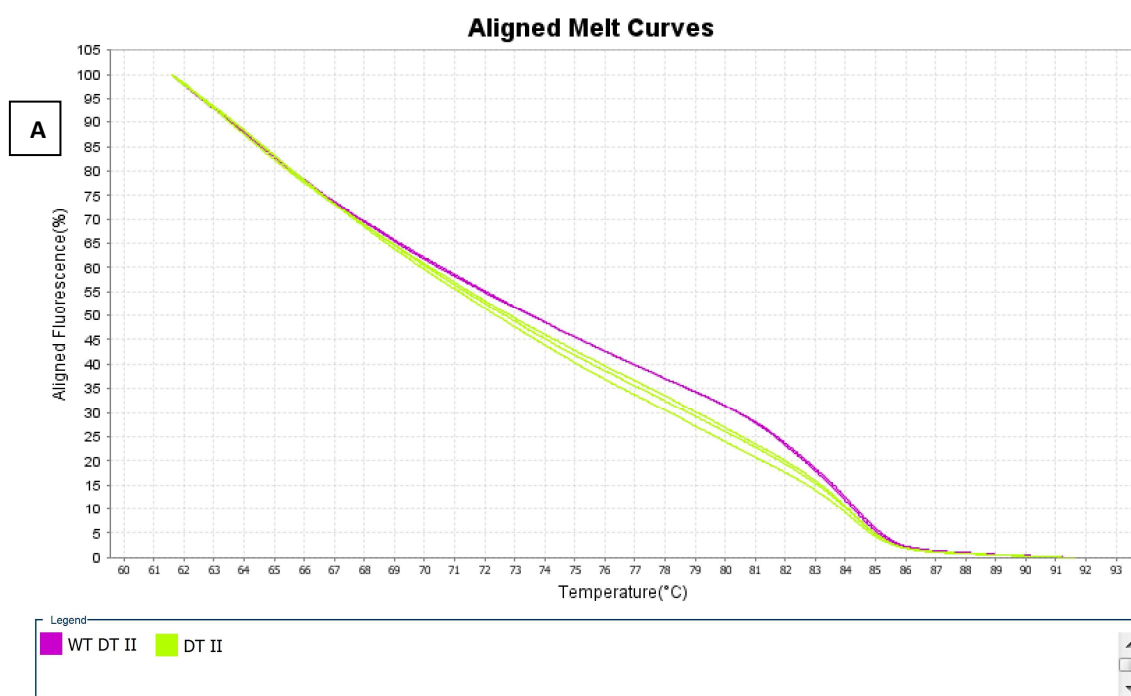


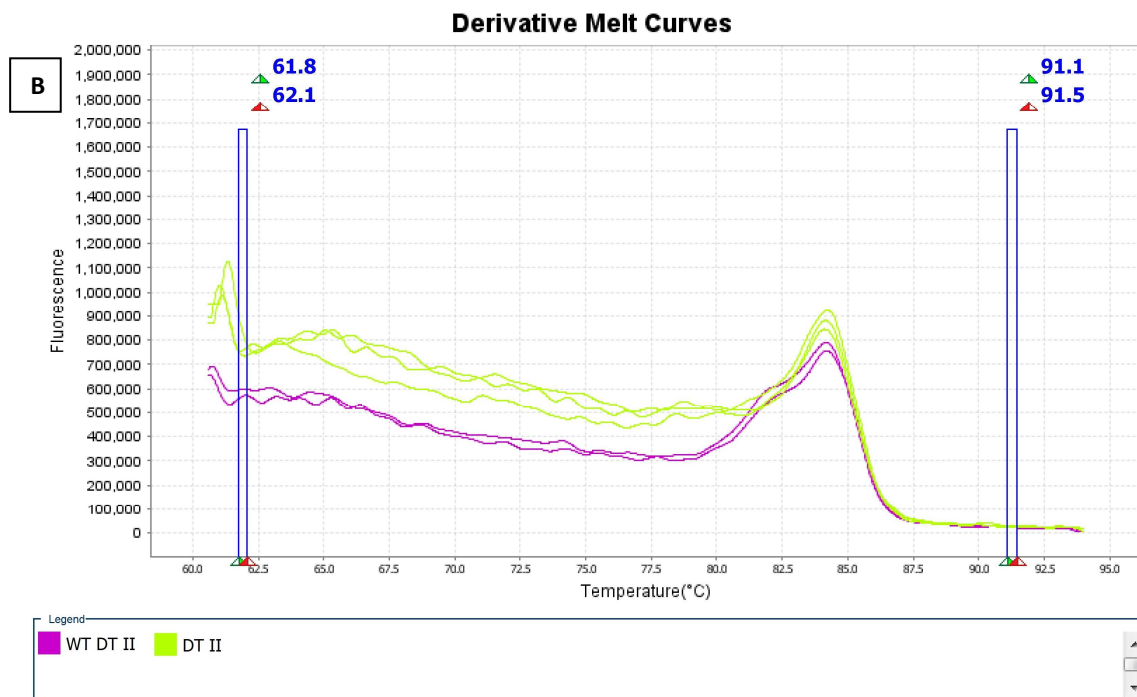
A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. DTI: Displasia Tanatofórica I com a mutação g.13526 C>T. WT DTI: Selvagem Displasia Tanatofórica I.

#### 4.6.4 Displasia Tanatofórica tipo II

Para amplificar as amostras de DNA dos pacientes com suspeita de displasia tanatofórica tipo II foi utilizado o par de oligonucleotídeos P4 (Tabela 3). Para a padronização da técnica de HRM, foram utilizadas amostras de 3 pacientes que apresentaram a alteração g.17852 A>G (p.K650E) (Figura 32).

**Figura 32:** Análise de HRM dos pacientes com DTII que apresentam a alteração g.17852 A>G.



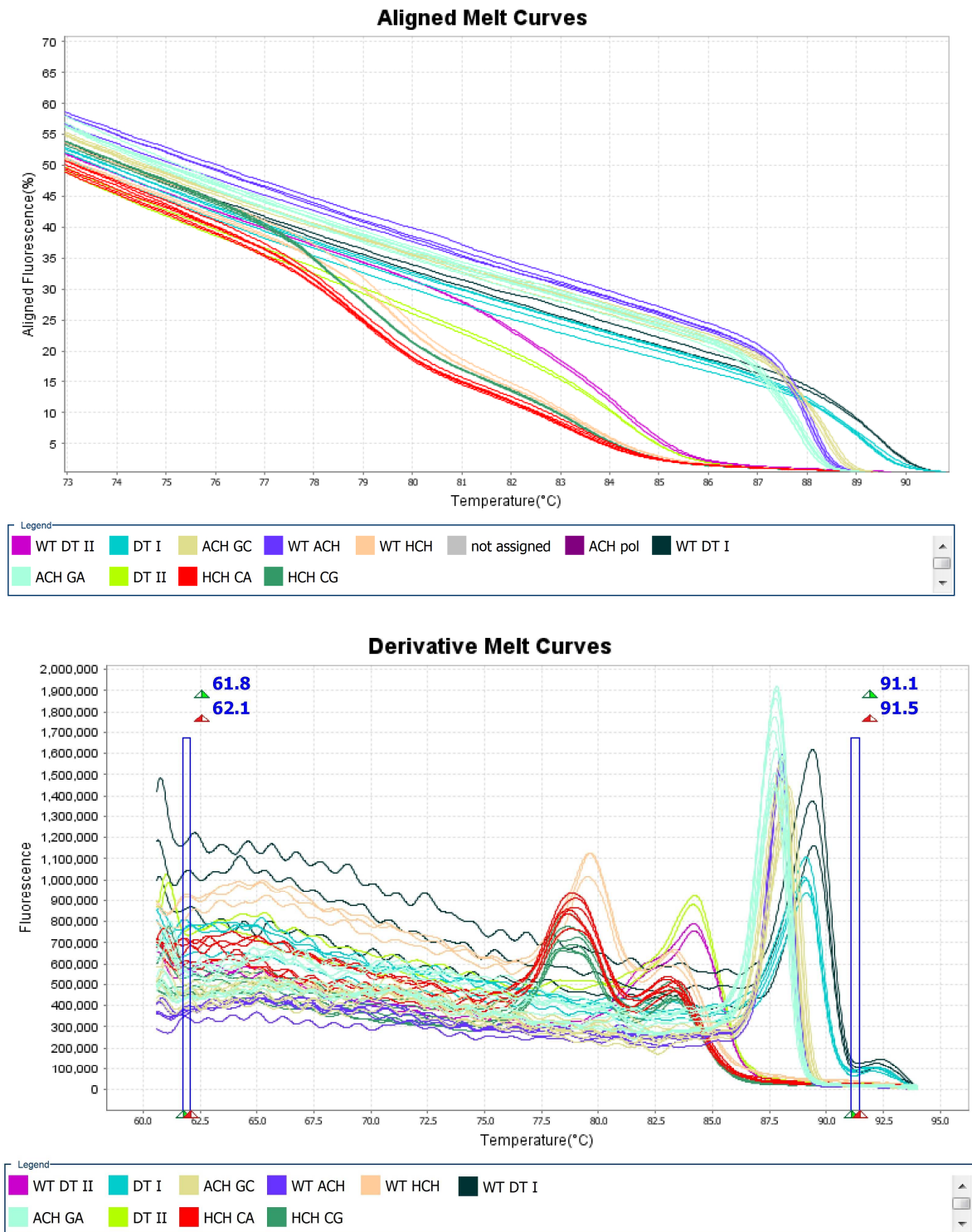


A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada. DTII: Displasia Tanatofórica II com a mutação g.17852 A>G. WT DTII: Selvagem Displasia Tanatofórica II.

#### 4.6.5 HRM com todas as DEs

A técnica de HRM foi realizada utilizando, em conjunto, as amostras dos pacientes que apresentavam todas as mutações encontradas para as 4 displasias, onde foi possível diferenciar a curva de fusão referente a cada alteração (Figura 33).

Figura 33: Análise de HRM com todas as DEs.



A) Curva de dissociação mostrando as alterações na curva de melting normalizada. B) Curva de dissociação derivada.

O resumo dos resultados de todos os pacientes pode ser visto na tabela abaixo:

**Tabela 6:** Tabela mostrando os resultados encontrados no sequenciamento de *sanger*.

<b>Displasia Esquelética</b>	<b>N° de pacientes</b>	<b>Resultado Positivo</b>	<b>Resultado Negativo</b>	<b>Aguardando Resultado</b>
ACH	36	30 -> g.16081 G>A 3 -> g.16081 G>C	3	-
HCH	15	5 -> g.17333 C>A 5-> g.17333 C>G	5	-
DT I	8	6 -> g.13526 C>T	1	1
DT II	2	2 -> g.17852 A>G	-	-

## 5. DISCUSSÃO

Mutações em diferentes domínios da proteína FGFR3 são responsáveis por causar algumas displasias esqueléticas como a acondroplasia, hipocondroplasia e displasias tanatofóricas do tipo I e tipo II (Krejci P; 2013).

A análise molecular para acondroplasia deve ser primeiramente direcionada para investigar duas variantes patogênicas: g.16081 G>A e g.16081 G>C. A mutação g.16081 G>A é responsável por aproximadamente 98% dos indivíduos com esta displasia, levando à troca de uma glicina por arginina no domínio transmembrana da proteína FGFR3. Corroborando com os dados encontrados na literatura, 30 pacientes (93,55%) com ACH estudados neste trabalho, apresentaram esta mutação no gene *FGFR3* (Pauli, 2014).

A mutação g.16081 G>C é a segunda alteração mais recorrente, sendo encontrada em aproximadamente 1% dos casos, e leva a mesma substituição de aminoácidos da mutação mais frequente. Neste estudo, 3 pacientes, sendo 2 familiares (6,45%), apresentaram esta mutação (Pauli, 2014).

Com a análise da técnica de HRM, foi possível discriminar as amostras que apresentavam as mutações g.16081 G>A e g.16081 G>C, quando comparadas com a amostra selvagem (sem alteração). Esse resultado foi corroborado ao obtido no sequenciamento.

A mutação g.17333 C>A relacionada à hipocondroplasia é a mais frequente relacionada a essa DE, ocorrendo em cerca de 70% dos casos. Neste trabalho esta mutação foi identificada em 5 pacientes (62,5%), sendo 3 familiares (37,5%), foi identificada a mutação g.17333 C>G, que é a segunda mutação mais frequente, ocorrendo em 30% dos casos (Kanazawa TY *et al.*, 2014).

Foi possível observar que através da análise da técnica de HRM, as amostras dos pacientes com HCH apresentaram dois picos nas curvas de dissociação durante a corrida. Este resultado sugere dois domínios de dissociação em um único produto de PCR. Um resultado semelhante foi observado por Dos Santos Rocha A *et al.* (2017) que descreveu dois domínios de dissociação em uma única sequência de DNA, onde foram observadas duas

regiões ricas em GC que se dissociaram em diferentes temperaturas, resultando em dois picos. Uma alternativa para resolver este problema seria reduzir o tamanho dos amplicons utilizados na HRM. Reed GH et al (2004) demonstrou que ao aumentar o comprimento do fragmento utilizado, a diferença entre as curvas de tipo selvagem e com mutação torna-se menor. E ao diminuir o tamanho do fragmento, houve uma melhora significativa da curva de dissociação durante a realização da técnica de HRM.

Cinco pacientes encaminhados ao Laboratório de Medicina Genômica com suspeita de HCH e 3 pacientes com suspeita de ACH apresentaram resultado negativo para as mutações já descritas a estas DEs. Após revisão clínica destes casos, foi descartada a possibilidade desses diagnósticos, mostrando que o teste genético molecular é importante para confirmar o diagnóstico clínico.

Vale ressaltar que existe uma sobreposição fenotípica entre acondriplasia e hipocondroplasia, podendo levar a uma dificuldade de se classificar os critérios clínicos e radiológicos como forma mais branda de ACH ou mais grave de HCH (Horton *et al.*, 2007). Portanto, as amostras de pacientes com suspeita clínica de HCH e ACH eram rotineiramente investigadas para ambas displasias.

Por este motivo, as amostras dos pacientes com ACH e HCH foram testadas em conjunto na técnica de HRM. Foi visto que houve uma alteração na curva de fusão quando comparadas com os resultados separados para cada displasia. Entretanto, é possível claramente diferenciar as amostras que apresentam a mutação g.16081 (ACH) das amostras com a alteração g.17333 (HCH).

Existem diversas alterações que são responsáveis por causar a DTI que estão localizadas em diferentes domínios da proteína FGFR3, sendo mais comum a mutação g.13526 C>T. Esta alteração foi encontrada em 6 pacientes do presente estudo. Até o momento, apenas a mutação g.17852 A>G relacionada a DTII foi mencionada na literatura, sendo localizada no domínio

tirosina cinase da proteína FGFR3. Esta alteração foi identificada nos 2 pacientes (Noe *et al.*, 2010).

Os 3 pacientes com ACH que em um primeiro momento tiveram resultado negativo para as mutações no gene *FGFR3*, e que apresentavam fenótipo típico para esta DE, levaram a hipótese de que poderia se tratar de uma nova mutação neste gene, ou poderia haver algum polimorfismo na região de anelamento do oligonucleotídeo P2, impedindo que o alelo mutado fosse amplificado durante a PCR. Após a síntese de um novo oligonucleotídeo (P2N), foi possível identificar através do sequenciamento de *Sanger*, a mutação g.16081 G>A em heterozigose, além de um polimorfismo na posição de anelamento do oligonucleotídeo utilizado anteriormente (P2). Após a pesquisa no banco de dados dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), esta hipótese foi confirmada mostrando que esta é uma região comum de polimorfismo. De fato, Gusmão *et al.*, 1996 já havia descrito esse resultado falso negativo no gene da Proteína Básica da Mielina (Myelin Basic Protein - MBR) devido ao polimorfismo na região de anelamento do oligonucleotídeo utilizado durante a amplificação por PCR.

Entretanto, quando as amostras destes pacientes foram testadas na técnica de HRM utilizando o oligonucleotídeo P2, foi possível identificar uma alteração na curva de dissociação quando comparada com a curva da amostra controle (sem mutação). Zemtsova *et al.* (2015) relata que a técnica de PCR em tempo real é mais sensível quando comparada com a PCR convencional. Isso poderia explicar o fato de a técnica de HRM que utiliza a PCR em tempo real detectar o alelo mutado, e a PCR convencional não.

Através da análise de HRM, foi observado que não é possível discriminar a curva de dissociação das amostras dos pacientes com ACH que apresentam a alteração g.16081 G>A e polimorfismo, das amostras positivas para a mutação g.16081 G>C. Nas condições utilizadas neste estudo, o ideal seria realizar corridas separadas para cada alteração, ou tentar solucionar o problema com a utilização de um novo par de oligonucleotídeos, onde o tamanho do amplicon fosse menor do que o utilizado.

O comprimento do fragmento utilizado na técnica de HRM é a limitação mais discutida na literatura. O grupo Słomka M *et al* (2017) descreve que ao



utilizar inicialmente oligonucleotídeos com comprimento de 108 pb, houve uma baixa resolução na dissociação e sobreposição parcial na curva de dissociação das amostras. Com isso, foram sintetizados novos oligonucleotídeos com amplicon de 74 pb, melhorando significativamente a dissociação. Para trabalhos de rotina, recomenda-se a utilização de fragmentos pequenos, de 150 a 250 pb para varredura de genes e de 80 a 100 pb para genotipagem (Vossen *et al.*, 2009).

O paciente 58 com suspeita de DTI obteve resultado negativo tanto no sequenciamento de *Sanger* quanto no HRM, após terem sido investigadas todas as mutações já descritas relacionadas a essa displasia, utilizando todos os oligonucleotídeos (P1, P1N, P2, P3, P4 e P5) disponíveis no laboratório. Entretanto, este paciente apresenta fenótipo compatível com este tipo de DE. Segundo a literatura, nestes casos é recomendado sequenciar todo o genoma para a busca de novas mutações no mesmo gene ou em outro gene. O NGS é uma técnica que realiza o sequenciamento do genoma humano e tem sido bastante utilizada para a identificação de novas mutações (Seok *et al.*, 2016). Por isso, a amostra deste paciente será encaminhada para investigação de outras alterações através do NGS.

Alguns métodos para determinação de mutações pontuais foram desenvolvidos para detectar diferenças na sequência de DNA. Muitas destas técnicas requerem grande automação, separação das amostras em gel e para algumas ainda é necessário o processamento enzimático ou químico. Por isso, o HRM é uma técnica que apresenta baixo custo e necessita de pouco tempo para ser realizada, o que reduz a quantidade desnecessária de sequenciamento e aumenta o número de amostras analisadas. O HRM pode ser considerado uma alternativa simples, confiável, barata e rápida para estudos de genotipagem (Reed *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014).

Segundo a literatura, um dos principais fatores que alteram os resultados da técnica é o DNA com alto teor de sal. Portanto, é recomendado que estas amostras sejam extraídas a partir de kits comerciais e ressuspendidas em um tampão com baixo teor de sal, como o TE (Reed GH *et al.*, 2007). Entretanto, os DNAs dos pacientes utilizados na técnica de HRM foram extraídos através

do método de *salting out*, que é uma técnica para separar o DNA genômico utilizando altas concentrações de sal. No presente estudo, não foi vista a diferença na curva de dissociação das amostras que foram extraídas por kit das amostras obtidas por *salting out*, conforme relatado por outros grupos na literatura (Ghasemi *et al.*, 2016; Abidi *et al.*, 2017).

Como os casos de DEs normalmente apresentam mutações que são recorrentes, a técnica de HRM pode ser utilizada como um método de genotipagem para a detecção de alterações recorrentes usando genótipos específicos como controle (He *et al.*, 2012).

Neste estudo, o HRM se mostrou uma técnica eficaz para discriminar amostras de indivíduos selvagens de amostras de indivíduos que apresentavam alguma das quatro displasias estudadas.

## 6. CONCLUSÃO

- A frequência das mutações identificadas em pacientes com suspeita de DEs relacionadas ao gene *FGFR3* nesse estudo está de acordo com o encontrado na literatura.

- A revisão clínica e radiológica dos casos de pacientes que apresentaram resultado negativo para ACH e HCH permitiu descartar estes diagnósticos, demonstrando a importância do teste molecular para confirmar o diagnóstico clínico.

- Foi gerado um painel de padrões de mutações encontradas no gene *FGFR3*.

- A técnica de HRM foi padronizada com sucesso e possibilitou a confirmação das mutações encontradas pela técnica de sequenciamento, nos pacientes com ACH, HCH, DTI e DTII.

- A técnica de HRM mostrou-se eficiente para a genotipagem das DEs relacionada ao gene *FGFR3*.

- Através da análise da sequência do gene *FGFR3* foi possível identificar um polimorfismo que impedia o anelamento do oligonucleotídeo P2 e a amplificação do alelo mutado. A mutação relacionada à ACH foi confirmada com a utilização de um novo par de oligonucleotídeo na PCR.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidi M, Fayaz Sh, Fard Esfahani P. Association of the Asp1312Gly Thyroglobulin Gene Polymorphism with Susceptibility to Differentiated Thyroid Cancer in an Iranian Population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Feb 1;18(2):503-506.

Aires, Margarida de Mello. *Fisiologia*; colaboração de Ana Maria de Lauro Castrucci, et al. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Página: 1142 a 1143.

Alanay Y, Lachman RS (2011). A Review of the Principles of Radiological Assessment of Skeletal Dysplasias. *J Clin Res PediatrEndocrinol.* 2011;3(4):163-78.

Beenken A, Mohammadi M (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat RevDrugDiscov.* 2009 Mar;8(3):235-53.

Chen L, Adar R, Yang X, Monsonogo EO, Li C, Hauschka PV, Yayan A, Deng C (1999). Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest.* Dec 1, 1999; 104(11): 1517–1525.doi: 10.1172/JCI6690

Chen SW, Chen CP, Wang LK, Chern SR, Wu PC, Chen YN, Lin CJ, Chen WL, Wang W. Perinatal imaging findings and molecular genetic analysis of thanatophoric dysplasia type 1 in a fetus with a c.2419T>G (p.Ter807Gly) (X807G) mutation in FGFR3. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2017 Feb;56(1):87-92.

Cui Y, Zhao H, Liu Z, Liu C, Luan J, Zhou X, Han J (2012). A systematic review of genetic skeletal disorders reported in Chinese biomedical journals between 1978 and 2012. *Orphanet J RareDis.* 2012 Aug22;7:55.

Dakouane Giudicelli M, Serazin V, Le Sciellour CR, Albert M, Selva J, Giudicelli Y. Increased achondroplasia mutation frequency with advanced age and evidence for G1138A mosaicism in human testis biopsies. *Fertil Steril.* 2008 Jun;89(6):1651-6. Epub 2007 Aug 13.

Dos Santos Rocha A, de Amorim ISS, Simão TA, da Fonseca AS, Garrido RG, Mencialha AL. High-Resolution Melting (HRM) of Hypervariable Mitochondrial DNA Regions for Forensic Science. *J Forensic Sci.* 2018 Mar;63(2):536-540. doi: 10.1111/1556-4029.13552. Epub 2017 Aug 23.

Foldynova-Trantirkova S, Wilcox WR, Krejci P (2011). Sixteen Years and Counting: The Current Understanding of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Signaling in Skeletal Dysplasias. *Hum Mutat.* 2012 Jan;33(1):29-41.

G. MORTIER, L. NUYTINCK, M. CRAEN, J. RENARD, J. LEROY, and A. DE PAEPE. Clinical and radiographic features of a family with hypochondroplasia owing to a novel Asn540Ser mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *J Med Genet.* 2000 Mar; 37(3): 220–224.

Genetics Home Reference. Disponível em:< <http://ghr.nlm.nih.gov/> > Acesso em: 30 de janeiro de 2018.

Ghasemi Z, Hashemi M, Ejabati M, Ebrahimi SM, Kheiri Manjili H, Sharafi A, Ramazani A. Development of a High-Resolution Melting Analysis Method for CYP2C19\*17 Genotyping in Healthy Volunteers. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2016 Oct-Dec;8(4):193-199.

Gonzalez-Bosquet J, Calcei J, Wei JS, Garcia-Closas M, Sherman ME, Hewitt S, Vockley J, Lissowska J, Yang HP, Khan J, Chanock S. Detection of Somatic Mutations by High-Resolution DNA Melting (HRM) Analysis in Multiple Cancers. *PLoS One.* 2011; 6(1): e14522. Published online 2011 Jan 17. doi: 10.1371/journal.pone.0014522

Guo G, Sun X, Chen C, Wu S, Huang P, Li Z, Dean M, Huang Y, Jia W, Zhou Q, Tang A, Yang Z, Li X, Song P, Zhao X, Ye R, Zhang S, Lin Z, Qi M, Wan S, Xie L, Fan F, Nickerson ML, Zou X, Hu X, Xing L, Lv Z, Mei H, Gao S, Liang C, Gao Z, Lu J, Yu Y, Liu C, Li L, Fang X, Jiang Z, Yang J, Li C, Zhao X, Chen J, Zhang F, Lai Y, Lin Z, Zhou F, Chen H, Chan HC, Tsang S, Theodorescu D, Li Y, Zhang X, Wang J, Yang H, Gui Y, Wang J, Cai Z (2013). Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1459-63.

Gusmão L, Amorim A, Prata MJ, Pereira L, Lareu MV, Carracedo A. Failed PCR amplifications of MBP-STR alleles due to polymorphism in the primer annealing region. *Int J Legal Med.* 1996;108(6):313-5.

Harada D, Yamanaka Y, Ueda K, Tanaka H, Seino Y (2008). FGFR3-related dwarfism and cell signaling. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(1):9-15. Epub 2008 Dec 9.

He X, Xie F, Ren Z. Rapid detection of G1138A and G1138C mutations of the *FGFR3* gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16:297–301.

Hung CC, Lee CN, Chang CH, Jong YJ, Chen CP, Hsieh WS, Su YN, Lin WL. Genotyping of the G1138A mutation of the *FGFR3* gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. *Clin Biochem.* 2008 Feb;41(3):162-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.08.014. Epub 2007 Sep 6.

Junqueira L. C.; Carneiro J. In: *Tecido Ósseo. Histologia Básica.* 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Página: 132 a 142.

Kanazawa TY, Bonadia LC, Cavalcanti DP. Frequency of the allelic variant c.1150T > C in exon 10 of the fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) gene is not increased in patients with pathogenic mutations and related chondrodysplasia phenotypes. *Genet Mol Biol.* 2014 Oct;37(4):622-4. doi: 10.1590/S1415-47572014005000014. Epub 2014 Oct 21.

Kant SG, Cervenkova I, Balek L, Trantirek L, Santen GW, de Vries MC, van Duyvenvoorde HA, van der Wielen MJ, Verkerk AJ, Uitterlinden AG, Hannema SE, Wit JM, Oostdijk W, Krejci P, Losekoot M. A novel variant of *FGFR3* causes proportionate short stature. *Eur J Endocrinol.* 2015 Jun;172(6):763-70.

Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL (2009). Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias. *Genet Med.* 2009 Feb;11(2):127-33.

Krejci P. The paradox of *FGFR3* signaling in skeletal dysplasia: why chondrocytes growth arrest while other cells over proliferate. *Mutat Res Rev*

Mutat Res. 2014 Jan-Mar;759:40-8. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.11.001. Epub 2013 Dec 1.

Liang G, Liu Z, Wu J, Cai Y, Li X (2012). Anticancer molecules targeting fibroblast growth factor receptors. Trends Pharmacol Sci. 2012 Oct;33(10):531-41. doi: 10.1016/j.tips.2012.07.001. Epub 2012 Aug 9.

Matsuda K. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. Adv Clin Chem. 2017;80:45-72. doi: 10.1016/bs.acc.2016.11.002. Epub 2017 Jan 4.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16:1215.

Miyazaki M, Kanezaki S, Notani N, Ishihara T, Tsumura H. Spondylectomy and lateral lumbar interbody fusion for thoracolumbar kyphosis in an adult with achondroplasia: A case report. Medicine (Baltimore). 2017 Dec;96(49):e8983.

Mustafa M, Moghrabi N, Bin-Abbas B. Hypochondroplasia, Acanthosis Nigricans, and Insulin Resistance in a Child with FGFR3 Mutation: Is It Just an Association?. Case Rep Endocrinol. 2014;2014:840492.

Nagahara K, Harada Y, Futami T, Takagi M, Nishimura G, Hasegawa Y. A Japanese familial case of hypochondroplasia with a novel mutation in FGFR3. Clin Pediatr Endocrinol. 2016 Jul;25(3):103-6.

Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM (1998). Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. Development. 1998 Dec;125(24):4977-88.

Noe EJ, Yoo HW, Kim KN, Lee SY. A case of thanatophoric dysplasia type I with an R248C mutation in the FGFR3 gene. Korean J Pediatr. 2010 Dec;53(12):1022-5. doi: 10.3345/kjp.2010.53.12.1022. Epub 2010 Dec 31.

Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.* 2015 Jul 15;29(14):1463-86.

Pauli, RM, editor. *GeneReviews\_* [Internet]. Seattle, WA: University of Washington, Seattle; 1993 e 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1152>< Submetido em 16 de fevereiro de 2012. Acesso: 29 de janeiro de 2019.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 2007 Jun;8(6):597-608.

Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem.* 2004 Oct;50(10):1748-54. Epub 2004 Aug 12.

Riba, Fernanda Rolemberg Gonçalves. Análise de mutações no gene *FGFR3* em pacientes com Displasias Esqueléticas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - IBMR, Rio de Janeiro, 2016.

RM Pauli. Achondroplasia: a comprehensive clinical review. *Pauli Orphanet Journal of Rare Diseases* (2019) 14:1. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0972-6>

Ruskova L, Raclavsky V. The potential of high resolution melting analysis (hrma) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Sep;155(3):239-52. doi: 10.5507/bp.2011.045.

Seok Min Ahn, Young Han Kim, Jun Woo Baek, Eun Ju Bae, and Hong Jin Lee. A diagnosis of hypochondroplasia by next generation sequencing. *J Genet Med* 2016;13(1):46-50. <http://dx.doi.org/10.5734/JGM.2016.13.1.46> ISSN 1226-1769 (Print) 2383-8442 (Online)

Sharma M, Jyoti, Jain R, Devendra. Thanatophoric Dysplasia: A Case Report. *J Clin Diagn Res.* 2015 Nov;9(11):QD01-3. doi: 10.7860/JCDR/2015/13201.6702. Epub 2015 Nov 1.



Shazeeb MS, Cox MK, Gupta A, Tang W, Singh K, Pryce CT, Fogle R, Mu Y, Weber WD, Bangari DS, Ying X, Sabbagh Y. Skeletal Characterization of the Fgfr3 Mouse Model of Achondroplasia Using Micro-CT and MRI Volumetric Imaging. *Sci Rep*. 2018 Jan 11;8(1):469.

Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G, Strapagiel D. High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies. *Int J Mol Sci*. 2017 Nov 3;18(11). pii: E2316. doi: 10.3390/ijms18112316.

Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I (1994). Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell*. 1994 Dec 16;79(6):1015-24.

Sun W, Li JJ, Xiong C, Zhao B, Chen SL. The Potential Power of Bar-HRM Technology in Herbal Medicine Identification. *Front Plant Sci*. 2016 Mar 30;7:367. doi: 10.3389/fpls.2016.00367. eCollection 2016.

Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochem Soc Trans*. 2009 Apr;37(Pt 2):433-7. doi: 10.1042/BST0370433.

The Children's Hospital of Philadelphia; Center for Fetal Diagnosis and Treatment; Skeletal Dysplasias. Disponível em: <http://www.chop.edu/service/fetal-diagnosis-and-treatment/fetal-diagnoses/skeletal-dysplasias.html> > Acesso em: 06 de outubro de 2018

Toydemir RM, Brassington AE, Bayrak-Toydemir P, Krakowiak PA, Jorde LB, Whitby FG, Longo N, Viskochil DH, Carey JC, Bamshad MJ. A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. *Am J Hum Genet*. 2006 Nov;79(5):935-41. Epub 2006 Sep 26.

Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ (2000). The Molecular and Genetic Basis of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Disorders: The Achondroplasia Family of Skeletal Dysplasias, MuenkeCraniosynostosis, and Crouzon Syndrome with Acanthosis Nigricans. *Endocr Rev*. 2000 Feb;21(1):23-39.

Vossen R.H., Aten E., Roos A., den Dunnen J.T. High-resolution melting analysis (HRMA): More than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* 2009;30:860–866. doi: 10.1002/humu.21019.

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.* 2011 May; 155(5): 943–968.

Webster MK, Donoghue DJ (1996). Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J.* 1996; 15:520–7.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 2003 Jun;49(6 Pt 1):853-60.

Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat.* 2009 Jun;30(6):857-9. doi: 10.1002/humu.20951.

Wolpert L. Arms and the man: the problem of symmetric growth. *PLoS Biol.* 2010 Sep 7;8(9). pii: e1000477.

Yang M, Yue YJ, Guo TT, Han JL, Liu JB, Guo J, Sun XP, Feng RL, Wu YY, Wang CF, Wang LP, Yang BH. Limitation of high-resolution melting curve analysis for genotyping simple sequence repeats in sheep. *Genet Mol Res.* 2014 Apr 8;13(2):2645-53. doi: 10.4238/2014.April.8.7.

Zemtsova GE, Montgomery M, Levin ML. Relative sensitivity of conventional and real-time PCR assays for detection of SFG Rickettsia in blood and tissue samples from laboratory animals. *PLoS One.* 2015 Jan 21;10(1):e0116658. doi: 10.1371/journal.pone.0116658. eCollection 2015.

Zhou L, Wang L, Palais R, Pryor R, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clin Chem.* 2005 Oct;51(10):1770-7.