



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Geral



**TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE *FOXC2*  
EM UMA FAMÍLIA COM A SÍNDROME  
LINFEDEMA-DISTIQUÍASE**

Flávia de Figueiredo Ribeiro

Belo Horizonte

Minas Gerais

2016

Flávia de Figueiredo Ribeiro

**TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE *FOXC2* EM UMA FAMÍLIA COM  
A SÍNDROME LINFEDEMA-DISTIQUÍASE**

**Versão Final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial do grau de Mestre em Genética.

Área de Concentração: Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG  
2016

043      Ribeiro, Flávia de Figueiredo.  
            Triagem de mutações no gene FOXC2 em uma família com a síndrome  
            Linfedema-Distiquíase [manuscrito] / Flávia de Figueiredo Ribeiro. – 2016.  
            78 f. : il. ; 29,5 cm.

            Orientador: Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho.

            Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
            Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

            1. Genética. 2. Mutação. 3. Linfedema. I. Carvalho, Maria Raquel Santos. II.  
            Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III.  
            Título.

CDU: 575



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**Flávia de Figueiredo Ribeiro**

237/2016  
entrada  
2º/2014  
CPF:  
117.135.256-58

Às quinze horas do dia **31 de outubro de 2016**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE FOXC2 EM UMA FAMÍLIA COM A SÍNDROME LINFEDEMADISTIQÍASE**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Maria Raquel Santos Carvalho**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Maria Raquel Santos Carvalho	UFMG	34965173015	Aprovada
Luciana Werneck	UFMG	03923557604	APROVADA
Marcelo Rizzatti Luizon	UFMG	27730818892	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: aprovada  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 31 de outubro de 2016.**

Maria Raquel Santos Carvalho - Orientadora

Luciana Werneck

Marcelo Rizzatti Luizon

Maria Raquel Santos Carvalho

Luciana Werneck

Marcelo Rizzatti Luizon



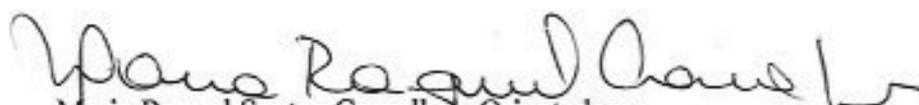
Pós-Graduação em Genética  
Departamento de Biologia Geral, ICB  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



## "TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE FOXC2 EM UMA FAMÍLIA COM A SÍNDROME LINFEDEMA-DISTIQUIÁSE"

**Flávia de Figueiredo Ribeiro**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Maria Raquel Santos Carvalho - Orientadora  
UFMG

  
Luciana Werneck  
UFMG

  
Marcelo Rizzatti Luizon  
UFMG

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2016.

À toda minha família e amigos, por todo  
apoio, compreensão, incentivo, força,  
aprendizado e diversão

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus por me fazer sempre acreditar em meus sonhos e jamais desistir, e aos meus pais, Walter e Olinda, que nunca mediram esforços para me oferecer as melhores oportunidades de estudos, por sempre enfrentarem as dificuldades ao meu lado, me oferecendo um apoio incondicional em todos os momentos, pela paciência ao me suportarem em momentos de estresse e compreenderem isso, pelo carinho e amor imensurável, por me lerem nas entrelinhas e dizerem as palavras certas, por me ajudar sempre que eu precisava e fazer tudo que estava em seu alcance por mim. Obrigada por serem esse exemplo de pais, jamais chegaria aonde estou se não tivesse vocês ao meu lado, AMO VOCÊS!

À Professora Doutora Maria Raquel Santos Carvalho, por ter aberto as portas do laboratório e acreditado em minha capacidade quando eu pedi para realizar o mestrado sem nunca sequer ter pisado num laboratório de genética anteriormente. Devo a ela meu aperfeiçoamento no meio científico e as experiências adquiridas durante o percurso.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Genética Humana e Médica, Marlene, Izinara Gabriela, Aline, Fernanda, Fernando, Carol Castro, Carol Matosinho, Ana Cristina, Aninha, Andrezza, João, Fernando, Pedro, Keity, Marlon, Hilan, Luiza e Lucas por toda ajuda, pelo incentivo, por vibrarem com minhas pequenas conquistas e pelos momentos de descontração tão importantes para relaxar e aliviar o estresse do dia-a-dia. Agradeço em especial a Aline, que esteve comigo no início do meu trabalho, que me ensinou muitas coisas e sempre me ajudou; à Fernanda que estava sempre disponível para ajudar na parte da bancada e que foi de extrema importância; ao Pablo, pelo imenso auxílio e disponibilidade durante esse processo, tirando minhas dúvidas até durante viagens e sábados à noite; por todo o conhecimento compartilhado; a Ana Cristina que sempre se preocupa comigo e é tão amiga para todos momentos, tão doce, que me faz sempre sentir especial; e por fim ao Lucas e Luiza, companheiros de todos momentos, que conseguem me entender pelo olhar, capaz de perceber qualquer sutileza na minha fisionomia, seja de tristeza ou alegria, que me ajudam além da pesquisa, que me fazem rir mesmo quando o mundo parece desabar, que sempre me incentivam e que estão dispostos a me ajudar a qualquer momento. Vocês foram essenciais para que esse trabalho saísse e confesso que sentirei muitas saudades, mas todos têm seu lugar guardado no meu coração.

Agradeço também ao Professor Doutor Frederico Soriani, por ter me auxiliado e aberto as portas do seu laboratório para mim, sempre com um sorriso no rosto, e não podia esquecer as meninas que faziam cada dia de trabalho algo feliz e leve, mesmo com as coisas dando errada, Naty, Bella, Karina e Jéssica vocês são incríveis, e Jéssica não sei nem como te agradecer, obrigada por me ensinar, me ajudar e pela paciência.

À toda minha família que sempre acreditou no meu sonho e me deu apoio: minha saudosa avó Edna, meus padrinhos Maria Helena e Aguiamar, todos os meus tios, em especial aos tios Inês e Marco Aurélio que me aturaram na infância, aos tios Lucimar e Marco Antônio que me receberam em sua casa de braços abertos durante um momento difícil, e aos meus tios Elaine e Wellerson por bancarem um sonho meu, sempre me ajudarem na minha luta acadêmica, sempre apoiando e incentivando. Agradeço também a todos os meus primos pelo apoio e pelos inúmeros momentos de diversão que foram fundamentais, em especial Bia, Carol, Felipe, Igor, Gui, Lu, Mateus, Nath, Renan, Primo, Vitor e Ton que sempre estiveram ao meu lado.

A todos meus amigos, da faculdade ou não, especialmente, Cinthia ou Filet, Jessiquinha, Pablo, Marcelo, Dutra, Mathias, Henrique, Marco, João Locke, Livia, Andrew, Pomp, Gian, Leão, Daniboy, Melina, Góes, Hugo, Lanza, Vanessa, Jean, Hanaísa, Naza, Fabio, Yeska, Pedro, Lucchesi, Renata, seu pequeno Ravi e meu amor Guará, e Dani Mendes por todo o apoio, paciência, momentos de descontração, por dividirem alegrias e tristezas desta caminhada.

E como não poderia faltar meus amigos mais que especiais, aqueles que são a família que eu escolhi Nath, Neris (e o Nens também, é claro), Mel, Lucinha, Fel, Luiza Mila, Bia, Laís, Natzinha, Camis, Carol, Vitor, Mateus, Gui, Igor, Lu, Renanzinho, Felipe, Primo, Ton, Lucas, Lukinhas e Renan. Mesmo que eu nem sempre demonstre muito, gosto mesmo de vocês, vocês me conquistam nas pequenas coisas, fazendo gracinhas, compartilhando momentos divertidos, me apoiando quando eu preciso - mesma que eu não peça, abrindo meus olhos, dando conselhos, puxando minha orelha se necessário, e sempre fazendo eu me sentir especial. Muito obrigada! “O caminho nunca é largo demais quando um amigo nos acompanha.”

A todos esses, de perto ou de longe, obrigada pelos passos dados juntos e por sempre vibrarem com as minhas conquistas.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho inicial.” (Albert Einstein)

## RESUMO

A Síndrome Linfedema-Distiquíase (LDS) se caracteriza por distúrbios do desenvolvimento do sistema linfático, que causam edema em diversas regiões do corpo, e distiquíase, ou seja, o nascimento de fileiras extra de cílios oculares junto à glândula Meibomiana ou na pálpebra superior. Também podem surgir fenda palatina, malformações congênitas cardíacas e oculares. A doença é monogênica, com um padrão de herança autossômica dominante, causada por mutações no gene *Forkhead Box Protein C2* (*FOXC2*). No presente estudo, foi feita a triagem de mutações no gene *FOXC2* em membros afetados (criança, mãe e tia materna) de uma família com diagnóstico clínico de LDS. Essa triagem foi feita através de sequenciamento Sanger de amplicons cobrindo *upstream*, 5'-UTR, região codante e parte da 3'-UTR. Além disto, os amplicons cobrindo a região *upstream* e *downstream* foram clonados TOPO TA Cloning Kit e sequenciados. Nenhuma mutação foi identificada na região codificadora da proteína. Duas mutações foram observadas, uma no promotor e a outra na 5'-UTR do gene. Uma delas é um polimorfismo (rs34221221), que causa uma substituição de uma citosina por uma timina na posição -512 (NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-512C>T). Esta mutação se localiza no promotor e afeta um nucleotídeo quatro posições acima do sítio de início da transcrição. Na literatura, já foi demonstrado experimentalmente que ela aumenta a expressão tanto do RNAm quanto da proteína em pacientes com (LDS). A segunda mutação (NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T) foi identificada pela primeira vez neste estudo. Através do sequenciamento de produtos de PCR clonados, foi possível identificar que estas mutações se encontram em *trans*. Como ambas se encontram *upstream* ao início da tradução, buscamos identificar o promotor de *FOXC2*, que ainda não havia sido descrito na literatura ou em bases de dados. Usando G2.Promoter, foi possível identificar um promotor atípico, com 1101 pares de bases, que se estende 1000 bp acima do sítio de início da transcrição e invade a 5'-UTR. Elementos típicos de promotor (TATA-box, CAAT-box) não foram identificados, mas um GC-box, presente no alelo selvagem é abolido pela mutação NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T. Também foi previsto, que esta mutação abole um G-quadruplex, mas o escore deste, embora alto, não ultrapassa o limiar estabelecido pelo programa usado (G4Hunter). Esta mutação também abole o sítio de reconhecimento de outros fatores de transcrição (ETV5, ZNF638, TFAP2A e nGRE) e cria um sítio (ETV4). Este conjunto de modificações sugere que esta mutação seja patogênica, embora com base nos dados que dispomos até o momento, não seja possível responder se há aumento ou diminuição da expressão de *FOXC2*. Estas mutações afetam também o íntron de *FOXC2-AS1*, mas não identificamos evidência específica de impacto funcional para este transcrito. Os achados deste estudo reforçam a necessidade de se incluir as regiões *upstream* e *downstream* dos genes nos estudos de triagem de mutações em distúrbios monogênicos.

Palavras-chave: Síndrome Linfedema-Distiquíase, Linfedema, Distiquíase, *FOXC2*, mutação

## ABSTRACT

The Lymphedema-Distichiasis Syndrome (LDS) is a developmental disorder of the lymphatic system, which causes edema in several regions of the body and distichiasis, that is, the birth of extra rows of eyelashes originated from the Meibomian gland or in the upper eyelid. Cleft palate, congenital heart and eye malformations may also appear. The disease is monogenic, with an autosomal dominant inheritance pattern, caused by a mutation in the Forkhead Box Protein C2 (*FOXC2*) gene. In the present study, screening for mutations in the *FOXC2* gene was performed in affected members of a family (child, mother and maternal aunt) with a clinical diagnosis of LDS. Mutation screening was done using the Sanger sequencing of PCR amplicons representing the upstream region, the 5'-UTR, coding region, and part of the 3'-UTR. In addition, the amplicons covering upstream and downstream of the coding region of the gene were cloned using TOPO TA Cloning Kit and sequenced. No mutations were found in the protein coding region. However, two mutations were observed, one in the promoter and another in the 5'-UTR gene, by sequencing cloned PCR products, these mutations were detected to be in trans. The first one is a previously described polymorphism (rs34221221), which causes a cytosine to thymine substitution at position -512 (NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-512C>T). This mutation is located in the promoter and affects a nucleotide four positions upstream the transcription start site. In the literature, it has already been shown experimentally that this mutation increases the expression of both mRNA and protein in patients with LDS. The second mutation (NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T) was identified for the first time in this study. As both of these mutations map upstream to *FOXC2* coding region, the first effort was to identify *FOXC2* promoter, which has not been described in the literature or included in any databases. Using G2.Promoter, it was possible to identify an atypical promoter, with 1101 base pairs, which extends 1000 bp upstream the transcription start site and downstream in the 5'-UTR. Typical promoter elements (TATA box, CAAT box) were not detected, but a GC box was abolished by the NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T mutation. It was also predicted that this mutation abolished a G-quadruplex, whose score, although high, does not exceed the threshold established by the program used (G4Hunter). This mutation also abolishes the binding sites of some transcription factors (ETV5, ZNF638, TFAP2A, and nGRE) and creates a new one (ETV4). This set of changes suggests that (NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T) is a pathogenic mutation, although based on the data that is available so far, it will not be possible to assess if there is an increase or change in *FOXC2* expression. These mutations also affect the *FOXC2-AS1* intron, but we were not able to identify specific evidence of functional impact for this transcript. The findings of this study reinforce the necessity to include upstream and downstream regions of genes in mutation screening studies in monogenic disorders.

Key-words - Lymphedema-Distichiasis Syndrome, Lymphedema, Distichiasis, *FOXC2*, mutation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Linfedema dos membros inferiores e superiores em esquema .....	19
<b>Figura 2</b> - Fenótipo da distiquíase em esquema .....	20
<b>Figura 3</b> - Linfedema em um dos membros inferiores .....	21
<b>Figura 4</b> - Distiquíase em foto real .....	22
<b>Figura 5</b> - Domínios estruturais do gene (acima) e da proteína FOXC2 (abaixo) .....	24
<b>Figura 6</b> - Gráficos sobre a distribuição das mutações em relação ao tipo e a localização no <i>FOXC2</i> .....	29
<b>Figura 7</b> - Heredograma da família do presente estudo e os respectivos fenótipos .....	32
<b>Figura 8</b> - Sequência do gene <i>FOXC2</i> e a localização dos cinco pares de primers utilizados no presente trabalho .....	34
<b>Figura 9</b> - Gel de acrilamida 8% das amostras para sequenciamento dos primers FOXC2-1, FOXC2-2 e FOXC2-3 .....	41
<b>Figura 10</b> - Gel de acrilamida 8% das amostras para sequenciamento dos Primers FOXC2-4 e FOXC2-5 .....	42
<b>Figura 11</b> - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-1 .....	43
<b>Figura 12</b> - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-2 .....	43
<b>Figura 13</b> - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-3 .....	44
<b>Figura 14</b> - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-4 .....	45
<b>Figura 15</b> - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-5 .....	46
<b>Figura 16</b> - Gel de agarose 1% das colônias que foram clonadas .....	47
<b>Figura 17</b> - Eletroferograma do sequenciamento do produto de PCR, obtido com o primer FOXC2-5 (promotor e 5'-UTR) .....	49
<b>Figura 18</b> - SNP2 Primer FOXC2-5 localizado a -150 pares de base do início da região traduzida do gene <i>FOXC2</i> .....	51
<b>Figura 19</b> - Sequência do gene <i>FOXC2</i> , mostrando as mutações detectadas neste estudo .....	52
<b>Figura 20</b> - Análise da conservação evolutiva ao longo do gene <i>FOXC2</i> .....	53

<b>Figura 21</b> - Resultados da busca de promotores no entorno de <i>FOXC2</i> usando-se o Promoter2.0 .....	54
<b>Figura 22</b> – Análise, usando o Gene2Promoter, da região promotora do gene <i>FOXC2</i>	55
<b>Figura 23</b> - Promotor do gene <i>FOXC2</i> , conforme identificado pelo G2Promoter.....	56
<b>Figura 24</b> - Análise do impacto da mutação NM_005251.3( <i>FOXC2</i> ):c.-150C>T de sítios de ligação mais comuns.....	57
<b>Figura 25</b> - Predição de G-quadruplexes usando o <i>software Greglist</i> .....	60
<b>Figura 26</b> - Localização do polimorfismo em relação ao G-quadruplex.....	61
<b>Figura 27</b> – Resultados da análise feita com o G4Hunter, da sequência do gene <i>FOXC2</i> e da sequência mutada .....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Substituição de aminoácidos já descritas no gene <i>FOXC2</i> associadas à LDS .....	26
<b>Tabela 2</b> - Deleções e inserções já descritas no gene <i>FOXC2</i> , associadas à LDS.....	27
<b>Tabela 3</b> - Sequências Forward e Reverse dos cinco primers utilizados no presente trabalho para a amplificação do gene <i>FOXC2</i> .....	33
<b>Tabela 4</b> - Frequências alélicas do alelo de menor frequência do rs34221221 em diversas populações/Projetos.....	50
<b>Tabela 5</b> - Sítios de reconhecimento de fatores de transcrição observados na presença do alelo da referência e do alelo mutado .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl - microlitro

A – adenina

bp – pares de base

C – citosina

Cl – cloro

DCV – doenças cardiovasculares

dNTP – Desoxirribonucleotídeos T Fosfatados

ERM – *ETS-Related Molecule*

ETV4 – *ETS Variant Gene 4*

ETV5 – *EST Variant Gene 5*

F – forward

Fig. – figura

*FKHL14 – Forkhead Drosophila Homolog-like 14*

*FOX - Forkhead Box*

*FOXC2- Forkhead Box Protein C2*

G – guanina

*GRE – Glucocorticoid Response Element*

LD – Síndrome Linfedema-Distiquíase

*MFH1 – Mesenchyme Forkhead 1*

Mg – Magnésio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ng – nanogramas

nGRE – *Negative Glucocorticoid Response Element*

nt – nucleotídeos

°C – graus Celcius

P – primer

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

q – braço longo

R – reverse

SNP – *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

T – timina

t – translocação

TFP2A – *Transcription factor AP-2 alpha*

UTR - untranslated region (região não traduzida)

ZNF658 – *Zinc Finger Protein 658*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Linfedema.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2. Distiquíase .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Síndrome Linfedema-Distiquíase.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4. FOXC2.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5. Justificativa e relevância .....</b>	<b>30</b>
<b>1.6. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>1.6.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>30</b>
<b>1.6.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>31</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1. Amostra .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2. Estudos moleculares .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3. Padronização.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.2. FOXC2 Par de Primer 2.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3.3. FOXC2 Par de Primer 3.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3.4. FOXC2 Par de Primer 4.....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.5. FOXC2 Par de Primer 5.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4. Separação eletroforética e sequenciamento Sanger dos produtos de PCR..</b>	<b>37</b>
<b>2.5. Clonagem dos produtos de PCR .....</b>	<b>37</b>
<b>2.6. Análise dos resultados dos Sequenciamentos Sanger.....</b>	<b>38</b>

2.7.	Avaliação da região promotora e regiões conservadas evolutivamente .....	38
2.8.	Avaliação do potencial funcional das variantes encontradas .....	39
2.9.	Análise de G-Quadruplex .....	39
3.	RESULTADOS .....	40
3.1.	Produtos de PCR .....	40
3.2.	Sequenciamento Sanger dos Amplicons .....	42
3.3.	PCR de colônia.....	46
3.4.	Mutações observadas.....	47
3.4.1.	rs34221221:c.-512C>T .....	48
3.4.2.	NM_005251.3(FOXC2):c.-150C>T.....	50
3.5.	Análises bioinformáticas .....	52
3.5.1.	Como é a conservação evolutiva do gene FOXC2?.....	52
3.5.2.	O gene FOXC2 tem um promotor?.....	53
3.5.3.	Neste estudo, existe evidência para mutações causadas pelas repetições GCCGCCGC? .....	57
3.5.4.	NM_005251.3(FOXC2):c.-150C>T afeta sítios de ligação de fatores de transcrição?.....	58
3.5.5.	A mutação NM_005251.3(FOXC2):c.-150C>T afeta um G-quadruplex? .....	59
4.	DISCUSSÃO .....	63
5.	CONCLUSÃO.....	69
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome linfedema-distiquíase (SLD) é a combinação de dois achados raros. A seguir, vamos descrever cada um deles separadamente e depois passamos à descrição da Síndrome.

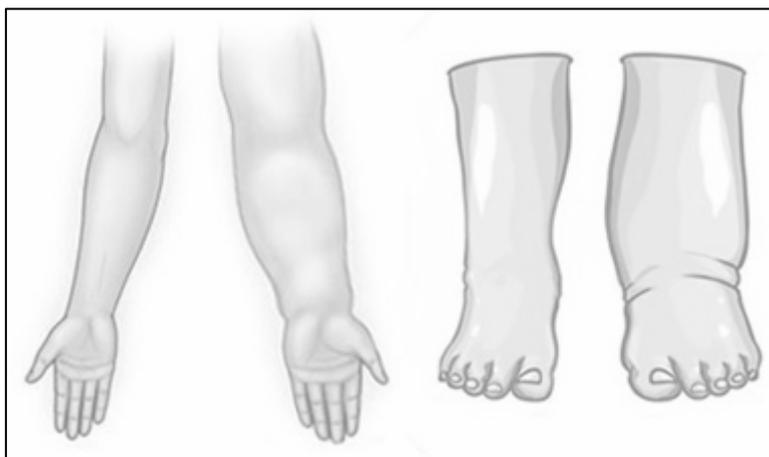
### 1.1.Linfedema

Linfedema é o edema resultante de falhas ou sobrecarga funcional do sistema linfático. O transporte capilar fica prejudicado, acarretando um volume de linfa excedente à capacidade de reabsorção e, por fim, levando a uma retenção de líquido, no local, e inchaço dos tecidos (Fig. 1) (ERICKSON et al., 2001; KOCAK; OVERGAARD, 2000).

O linfedema pode ser classificado quanto ao tempo de duração, agudo ou crônico, e à origem, primário ou secundário. Quando agudo, dura cerca de três a seis meses e geralmente é limitado; sendo crônico, apresenta alterações cutâneas perceptíveis e dura no mínimo três meses. O primário pode ser ocasionado pela ausência congênita ou anormalidade do tecido linfático, enquanto o secundário ocorre devido a uma obstrução ou interrupção do sistema causado por infecção, tumores, cirurgia ou radiação (KOCAK; OVERGAARD, 2000; MARCKS, 1997).

O linfedema primário é o edema, que ocorre devido a uma falha na drenagem linfática e surge de uma anormalidade intrínseca do sistema linfático (MORTIMER, 1995). Assume-se as vias linfáticas como congenitamente anormais, mesmo que ele não tenha aparecido antes na vida. Cerca de 35% de todos os pacientes com linfedema primário tem um histórico familiar positivo (DALE, 1985). Aparecendo logo após o nascimento, é chamado de Doença de Milroy, porém pode aparecer posteriormente, em geral depois da puberdade, sendo, então, chamado de Doença de Meige, que corresponde a cerca de 80% dos casos. Acredita-se, que isso seja devido a obliteração progressiva do sistema linfático periférico (MANGION et al., 1999).

**Figura 1** - Linfedema dos membros inferiores e superiores em esquema



Legenda: A figura mostra membros com dimensões normais à esquerda e à direita, como os membros são modificados pela Síndrome Linfedema-Distiquíase.

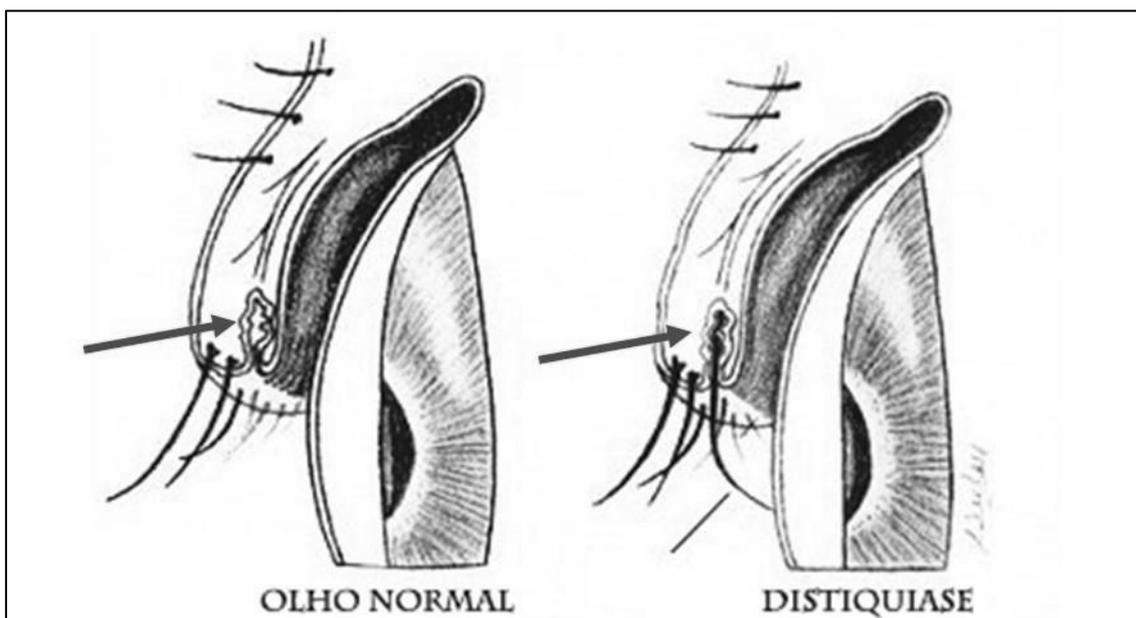
FONTE: <http://clinchomeostase.com.br/blog/o-que-e-linfedema-e-quais-os-seus-riscos>

## 1.2. Distiquíase

Distiquíase é uma rara anomalia, em sua maioria congênita, caracterizada por uma fileira extra de cílios, parcial ou completa, que se origina nos orifícios da glândula Meibomiana (Fig. 2). Nessa condição, as unidades pilossebáceas embrionárias diferenciam-se em folículos pilosos, ao invés de se diferenciarem em glândulas meibomianas. Devido à localização posterior da glândula, os cílios anormais podem crescer voltados para dentro dos olhos, causando irritação ocular e danos à córnea. Algumas complicações oculares dessa anomalia incluem fotofobia, irritação da córnea, ulceração da córnea e ectrópio parcial (BARTLEY; JACKSON, 1989; CHOO, 2002; O'DONNELL; COLLIN, 1993; SAMLASKA, 2002).

A distiquíase também pode ser observada como uma desordem adquirida, ocorrendo a partir de irritação ou inflamação crônica da margem da pálpebra, tal como em blefarite, disfunção da glândula meibomiana, síndrome de Stevens-Johnson, cirurgia e trauma (FOX, 1962; CHOO, 2002; SAMLASKA, 2002). De modo geral, distiquíase ocorre de forma isolada, entretanto, algumas associações são bem estabelecidas, como, por exemplo, a Síndrome de Linfedema-Distiquíase (BARTLEY; JACKSON, 1989).

**Figura 2** - Fenótipo da distiquíase em esquema



Legenda: Na figura à esquerda, é apresentado um olho normal e à direita, um com distiquíase. Ambos, contendo uma seta indicando a glândula Meibomiana, que à direita se desenvolve em folículo piloso.

FONTE: <https://jornaloguri.wordpress.com/materias/problemas-de-palpebras-distiquiase-e-pelos-ectopicos/>

### 1.3. Síndrome Linfedema-Distiquíase

Síndrome Linfedema-Distiquíase (LDS) é uma desordem autossômica dominante, caracterizada por linfedema dos membros (Fig.3), com idade de início variável, e uma fileira extra de cílios nascendo da glândula Meibomiana (Fig.4) (ERICKSON et al., 2001). Essa combinação de linfedema e distiquíase foi primeiramente descrita por Neel e Schull, em 1954, e por Falls e Kertesz, em 1964 (revisto por FANG et al., 2000). Após isso, outros relatos surgiram associando outras complicações a essa síndrome como problemas cardíacos, fenda palatina e cisto extradural (CORBETT et al. 1982; ROBINOW et al. 1970; SCHWARTZ et al. 1980). Além da distiquíase, são relatados também outros problemas oculares como fotofobia, ptose palpebral, catarata congênita, exotropia e entrópio congênito (ERICKSON et al., 2001). Recentemente, pesquisadores reportaram outras complicações associadas à síndrome. Em 2016, Papoff e colaboradores relataram duas irmãs com LDS confirmadas por uma mutação no gene *FOXC2* que apresentaram, ao nascimento, obstrução grave das vias aéreas relacionada à sequência de Robin (PAPOFF *et al.*, 2016). No ano seguinte, Jones e colaboradores apresentaram duas

famílias com LDS, não aparentadas. Na primeira família, cinco indivíduos afetados da geração mais nova tinham anomalias congênitas renais e, na segunda família, o probando e seu filho também tinham anomalias renais congênitas (JONES *et al.*, 2017).

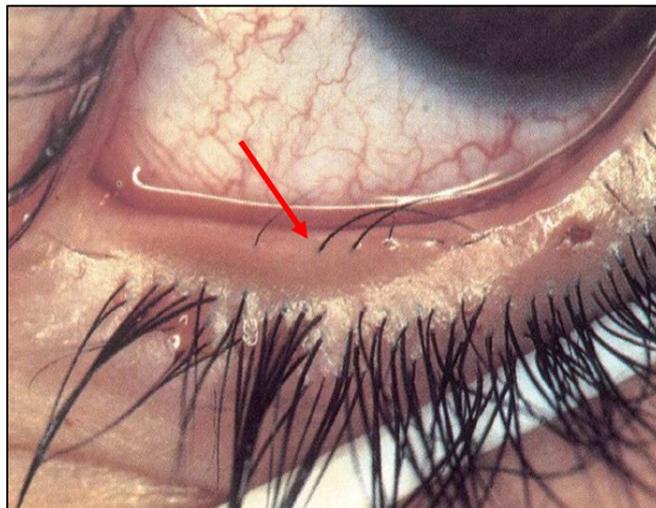
**Figura 3** - Linfedema em um dos membros inferiores



Legenda: Linfedema no membro inferior esquerdo. O membro inferior direito tem dimensões normais, apresentando, entretanto, sobreposição do quinto sobre o quarto artelho.

FONTE: <http://m.eldiario.net/?n=6&a=2015&m=10&d=01>

**Figura 4** - Distiquíase em foto real



Legenda: Podemos observar um olho com a presença de uma fileira extra de cílios oriunda da glândula Meibomiana, que está indicada pela seta vermelha.

FONTE: <http://slideplayer.com.br/slide/7312316/>

Fang e colaboradores (2000) sugeriram, que o gene responsável por todos esses distúrbios fosse um gene relacionado ao desenvolvimento e, provavelmente, de efeito pleiotrópico. Eles analisaram um caso relatado por Erickson e colaboradores (1995), onde um paciente com linfedema neonatal, semelhante ao observado na Síndrome de Turner, tinha uma translocação  $t(Y;16)(q11.2;q24.3)$ . Mediante isto, os cientistas buscaram inicialmente por um gene no braço longo do cromossomo Y (que não tivesse associado a Turner), entretanto, nenhum gene candidato foi encontrado próximo ao ponto de quebra do cromossoma Y. Portanto, um segundo esforço foi feito no intuito de encontrar um gene candidato no ponto de quebra no braço longo do cromossomo 16. É importante ressaltar que, Mangion e colaboradores (1999) já haviam mapeado a LDS em uma região distal do cromossomo 16 (FANG et al., 2000).

Dessa forma, Fang e colaboradores (2000) avaliaram os genes vizinhos à região do ponto de quebra da translocação e encontraram três genes da família *Forkhead Box* (*FOX*). Dentre estes, o gene *Forkhead Box Protein C2* (*FOXC2*) já era conhecido – tanto pelo seu papel no desenvolvimento craniofacial, vertebral e do coração em camundongos, quanto pelo fato de ser fortemente expresso no desenvolvimento de vasos sanguíneos também em camundongos (KAESTNER et al. 1996). Fang e colaboradores (2000) descreveram mutações em *FOXC2* em duas famílias com LDS autossômica dominante. Estes resultados demonstraram que as mutações no gene *FOXC2* poderiam ser causadoras

de LDS, determinando, assim, um papel crucial do *FOXC2* no desenvolvimento da LDS (FANG et al., 2001).

#### **1.4. *FOXC2***

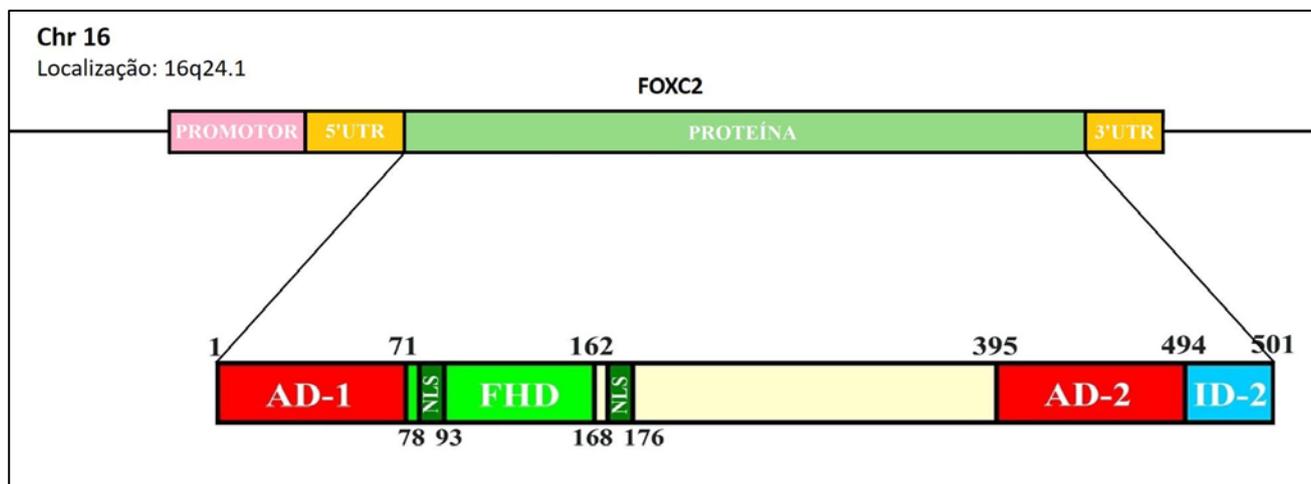
*Forkhead Box C2 (FOXC2)*, também conhecido como *Forkhead Drosophila Homolog-like 14 (FKHL14)* ou *Mesenchyme Forkhead 1 (MFH1)*, é um gene da família *Forkhead Box (FOX)*. Um grande número de membros da família *FOX* foi identificado, especialmente nos vertebrados, desde de sua descoberta em *Drosophila*, em 1989, por Weigel e colaboradores. Hoje são conhecidos, aproximadamente, 50 genes *FOX* no genoma humano, divididos em 19 subfamílias (JACKSON et al., 2010). A nomenclatura da família *FOX* foi organizada em 2000 por Kaestner e colaboradores, que dividiram os genes em subclasses, que vão de *FOXA* até *FOXS* baseada em análises filogenéticas dos domínios *FOX* (JACKSON et al., 2010; KAESTNER et al., 2000; WEIGEL et al., 1989). Os fatores de transcrição da família *FOX* são caracterizados por um domínio de ligação de DNA de aproximadamente 100 aminoácidos, conhecido como domínio *FOX* – altamente conservado entre os genes da família *FOX* e entre as espécies, com poucas exceções (HANNENHALLI; KAESTNER, 2009; JACKSON et al., 2010).

As proteínas originadas dos genes *FOX* possuem um papel fundamental na regulação da expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação, crescimento celular e longevidade, e no processo de organogênese para regulação do metabolismo e do sistema imune. Além disso, muitas dessas proteínas são importantes no desenvolvimento embrionário, sendo capazes de se ligar à cromatina condensada durante a diferenciação celular (JACKSON et al., 2010; TUTEJA; KAESTNER, 2007a, 2007b).

As sequências da proteína *FOXC2* de camundongos e de humanos foram comparadas e observou-se uma identidade de 94%. Em humanos, a proteína *FOXC2* tem 501 aminoácidos (Fig. 5), sete a mais do que a de camundongo. No nível do mRNA, observa-se homologia também: as regiões 5'- e 3'- não traduzidas (5'-UTR e 3'-UTR) têm uma identidade de 90 e 84%, respectivamente. Todos resultados indicaram que esse gene é altamente conservado entre as duas espécies. A única diferença marcante é que o gene em camundongos apresenta um intron (Genome Browser, UCSC). Considerando essa alta conservação evolutiva, foi proposto que *FOXC2* exercesse em humanos um

papel semelhante ao observado em camundongos, ou seja, como fator de transcrição no desenvolvimento mesenquimal (MIURA et al., 1993; MIURA et al., 1997).

**Figura 5** - Domínios estruturais do gene (acima) e da proteína FOXC2 (abaixo)



Legenda: Representação esquemática do gene *FOXC2* e sua proteína (aminoácidos 1-501). Pode-se observar, na região N-terminal, o Domínio de Ativação 1 (AD-1, aminoácidos 1-71), o Domínio Forkhead (FHD, aminoácidos 71-162), inserido nele contém o primeiro sinal nuclear (NLS1, aminoácido 78-93), posteriormente tem o segundo sinal nuclear (NLS2, aminoácidos 168-176). Na região C-terminal, estão o Domínio de Ativação 2 (AD-2, aminoácidos 395-494) e o Domínio Inibidor (ID-2, aminoácidos 494-501). Além da estrutura da proteína, pode-se observar também a região 5'-UTR e 3'-UTR do gene, bem como sua região promotora.

FONTE: Adaptada de Tavian et al., 2016

As evidências obtidas até o momento mostram que *FOXC2* está envolvido em proliferação e diferenciação celular, assim como na transição epitélio-mesenquimal. Consequentemente, *FOXC2* participa da especificação celular durante o desenvolvimento de rins, coração, ureter e esqueleto. Em consequência do seu papel na proliferação celular e na transição epitélio-mesenquimal, *FOXC2* é um fator determinante da capacidade de metástase de células cancerosas (MANI et al., 2007; SARGENT et al., 2015; TUTEJA; KAESTNER, 2007a). Por exemplo, esse gene foi identificado na indução da transição epitélio-mesenquimal no câncer de próstata (BORRETZEN et al., 2019) e de pulmão (HE et al., 2018), e sua superexpressão foi considerada um sinal de mau prognóstico para carcinoma hepatocelular (SHIMODA et al., 2018), gliomas (WANG et al., 2014), câncer de nasofaringe (NISHIDA et al., 2011) e câncer gástrico (ZHU et al., 2013). Além disso, ele é um regulador importante do metabolismo dos adipócitos e é crucial para o

desenvolvimento normal e manutenção de válvulas venosas e linfáticas (CEDERBERG et al., 2001; MELLOR et al., 2007). Mutações em *FOXC2* estão associadas a câncer de mama agressivo do tipo basal.

Mutações em *FOXC2* tem sido associadas à Síndrome Linfedema-Distiquíase (TUTEJA; KAESTNER, 2007a). Para a LDS, uma série de trabalhos encontraram grande diversidade de variantes no gene *FOXC2* (Tab. 1 e Tab. 2). Na Tabela 1, observa-se, que cerca de metade das mutações envolvem a substituição de um aminoácido. Na Tabela 2, observa-se que todas as deleções ou inserções mostradas não são múltiplas de três nucleotídeos e, portanto, acarretam mudança de fase de leitura. Ou seja, as mutações em *FOXC2*, descritas até o momento em pacientes com LDS acarretam perda de função (Fig. 6A). Além disto, diversas mutações ocorrem na região +900 até +1000 bp do cDNA (Fig. 6B), sugerindo que este seja um domínio funcional particularmente sensível da proteína.

**Tabela 1** - Substituição de aminoácidos já descritas no gene *FOXC2* associadas à LDS

<b>Nomenclatura</b>	<b>Autor/Ano</b>
NM_005251.3(FOXC2):c.374C>T (p.Ser125Leu)	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.362G>A (p.Trp116Ter)	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.362G>A (p.Arg121His)	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.435C>A (p.Tyr145Ter)	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.939C>A (p.Tyr313Ter)	de Bruyn et al., 2012
NM_005251.3(FOXC2):c.254T>A (p.Ile85Asn)	Dellinger et al., 2008
NM_005251.3(FOXC2):c.298C>T (p.Gln100Ter)	Erickson et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.951C>A (p.Cys317Ter)	Erickson et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.297C>G (p.Tyr99Ter)	Fang et al., 2000
NM_005251.3(FOXC2):c.394A>G (p.Lys132Glu)	Fauret et al., 2010
NM_005251.3(FOXC2):c.252C>T (p.Gln84Ter)	Finegold et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.712C>T (p.Gln238Ter)	Jones et al., 2017
NM_005251.3(FOXC2):c.177C>G (p.Tyr59Ter)	Liu et al., 2020
NM_005251.3(FOXC2):c.354C>G (p.Asn118Lys)	Ogura et al., 2013
NM_005251.3(FOXC2):c.349C>T (p.Gln117Ter)	Ogura et al., 2015
NM_005251.3(FOXC2):c.298C>T (p.Gln100Ter)	Sánchez-Carpinteiro et al., 2010
NM_005251.3(FOXC2):c.361C>T (p.Arg121Cys)	Sargent et al., 2015
NM_005251.3(FOXC2):c.223T>G (p.Tyr75Asp)	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.256C>T (p.Gln85Ter)	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.361C>T (p.Arg131Cys)	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.374C>T (p.Ser125Leu)	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.712C>T (p.Gln238Ter)	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.346T>A (p.Trp116Arg)	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.438G>A (p.Trp146Ter)	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.704G>T (p.Ser235Ile)	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.298C>T (p.Gln100Ter)	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1258C>T (p.Gly420Ter)	Tavian et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.1460T>C (p.Leu487Pro)	Tavian et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.1475C>T (p.Ala492Val)	Tavian et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.939C>A (p.Tyr313Ter)	Traboulsi et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.370C>T (p.Leu124Phe)	Zhu et al., 2014

Nota: Tavian et al. (2016) reanalisaram pacientes descritos por Michelin et al., 2012.

FONTE: Próprio trabalho

**Tabela 2** - Deleções e inserções já descritas no gene *FOXC2*, associadas à LDS

Posição	Tamanho	Tipo	Autor
NM_005251.3(FOXC2):c.914_921	8 bp	Deleção	Bahuau et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.914_921	8 bp	Deleção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.1331	1 bp	Deleção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.201_202	2 bp	Inserção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.209	1 bp	Inserção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.290_300	11 bp	Deleção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.412	1 bp	Inserção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.595	1 bp	Inserção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.638_639	2 bp	Inserção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.818	1 bp	Inserção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.866	1 bp	Deleção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.928	7bp	Inserção	Bell et al., 2001*
NM_005251.3(FOXC2):c.866	1 bp	Inserção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.1302_1308	7bp/3bp	Deleção/Inserção	Bell et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.323	1 bp	Deleção	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.595	1 bp	Inserção	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.871	1 bp	Inserção	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.1048_1051	4 pb	Duplicação	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.922_929	8 bp	Deleção	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.1142	1 bp	Inserção	Brice et al., 2002
NM_005251.3(FOXC2):c.741_742	2 bp	Inserção	De Nier et al., 2018
NM_005251.3(FOXC2):c.914_921	8 bp	Deleção	Erickson et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.602_681	5bp/79bp	Inserção/Deleção	Erickson et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.683	1 bp	Inserção	Erickson et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.792	1 bp	Inserção	Erickson et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.818	1 bp	Inserção	Erickson et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.425	1 bp	Duplicação	Fabretto et al., 2010
NM_005251.3(FOXC2):c.1093_1094	4 bp	Inserção	Fang et al., 2000
NM_005251.3(FOXC2):c.914_921	8 bp	Deleção	Fauret et al., 2010
NM_005251.3(FOXC2):c.930_936	7 bp	Duplicação	Fauret et al., 2010
NM_005251.3(FOXC2):c.505	1 bp	Deleção	Finegold et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.589	1 bp	Inserção	Finegold et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.609	1 bp	Inserção	Finegold et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.902	1 bp	Deleção	Finegold et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.902_921	19 bp	Deleção	Finegold et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.983	1 bp	Inserção	Finegold et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.1238_1254	16 bp	Deleção	Finegold et al., 2001
NM_005251.3(FOXC2):c.937	7 bp	Duplicação	Finegold et al., 2001*
NM_005251.3(FOXC2):c.232	14 bp	Duplicação	Finegold et al., 2001*
NM_005251.3(FOXC2):c.303_307	5bp/71bp	Deleção/Inserção	Golden et al., 2014
NM_005251.3(FOXC2):c.724_727	4bp/21bp	Deleção/Inserção	Itoh et al., 2013
NM_005251.3(FOXC2):c.1264	1 bp	Deleção	Kumar et al. 2007
NM_005251.3(FOXC2):c.930_936	7 bp	Duplicação	Liu et al., 2016

NM_005251.3(FOXC2):c.802	1 bp	Inserção	Liu et al., 2016
NM_005251.3(FOXC2):c.826_827	2 bp	Deleção	Michellini et al., 2012
NM_005251.3(FOXC2):c.733	1 bp	Deleção	Ogura et al., 2013
NM_005251.3(FOXC2):c.595	1 bp	Inserção	Papoff et al., 2016
NM_005251.3(FOXC2):c.922_923	19 bp	Duplicação	Patil et al., 2004
NM_005251.3(FOXC2):c.563–584	22 bp	Deleção	Rezaie et al., 2008
NM_005251.3(FOXC2):c.595	1 bp	Duplicação	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.666	1 bp	Duplicação	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.710_713	4 pb	Duplicação	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.818	1 bp	Duplicação	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.134	1 bp	Deleção	Sarica et al., 2019
NM_005251.3(FOXC2):c.819	1 bp	Duplicação	Sheth et al., 2018
NM_005251.3(FOXC2):c.333	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.474	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.747	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.854	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1024	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1140	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1229_1253	25 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1298	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1331	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1418	1 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1420_1426	7 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.902_920	19 bp	Duplicação	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.893_915	22 pb	Duplicação	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.201_202	2 bp	Inserção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.818	1 bp	Inserção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.866	1 bp	Inserção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.914_921	8 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.922_929	8 bp	Deleção	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.1048_1051	4 pb	Duplicação	Sholto-Douglas-Vernon et al., 2005
NM_005251.3(FOXC2):c.586_587	2 bp	Deleção	Sutkowska et al., 2012
NM_005251.3(FOXC2):c.595	1 bp	Inserção	Tanpaiboon et al., 2010
NM_005251.3(FOXC2):c.794	1 bp	Inserção	Van Steensel et al., 2009
NM_005251.3(FOXC2):c.902_920	19 bp	Duplicação	Van Steensel et al., 2009
NM_005251.3(FOXC2):c.902_920	19 bp	Duplicação	Vreeburg et al., 2008
NM_005251.3(FOXC2):c.1006	1 bp	Inserção	Yildirim-Toruner et al., 2004
NM_005251.3(FOXC2):c.964	1 bp	Inserção	Zhang et al., 2016

Nota - A sequência de referência da região codificadora usada foi a NC\_000016.10.

\* Para algumas das alterações descritas, o artigo só fornecia a posição do início. Em atenção à recomendação da *Human Genome Variation Society*, mantivemos exatamente como está no artigo original (DEN DUNNEN et al., 2016)).

\*\*Van Steensel et al., 2009 descreveram 11 pacientes, apenas dois tinham Síndrome de linfedema distiquiase, pacientes 9 e 11. Embora outros autores tenham descrito amostras onde nem todos os pacientes tinham Síndrome Linfedema-Distiquiase. Estamos enfatizando especificamente este artigos pois atualmente há um erro na descrição destas mutações

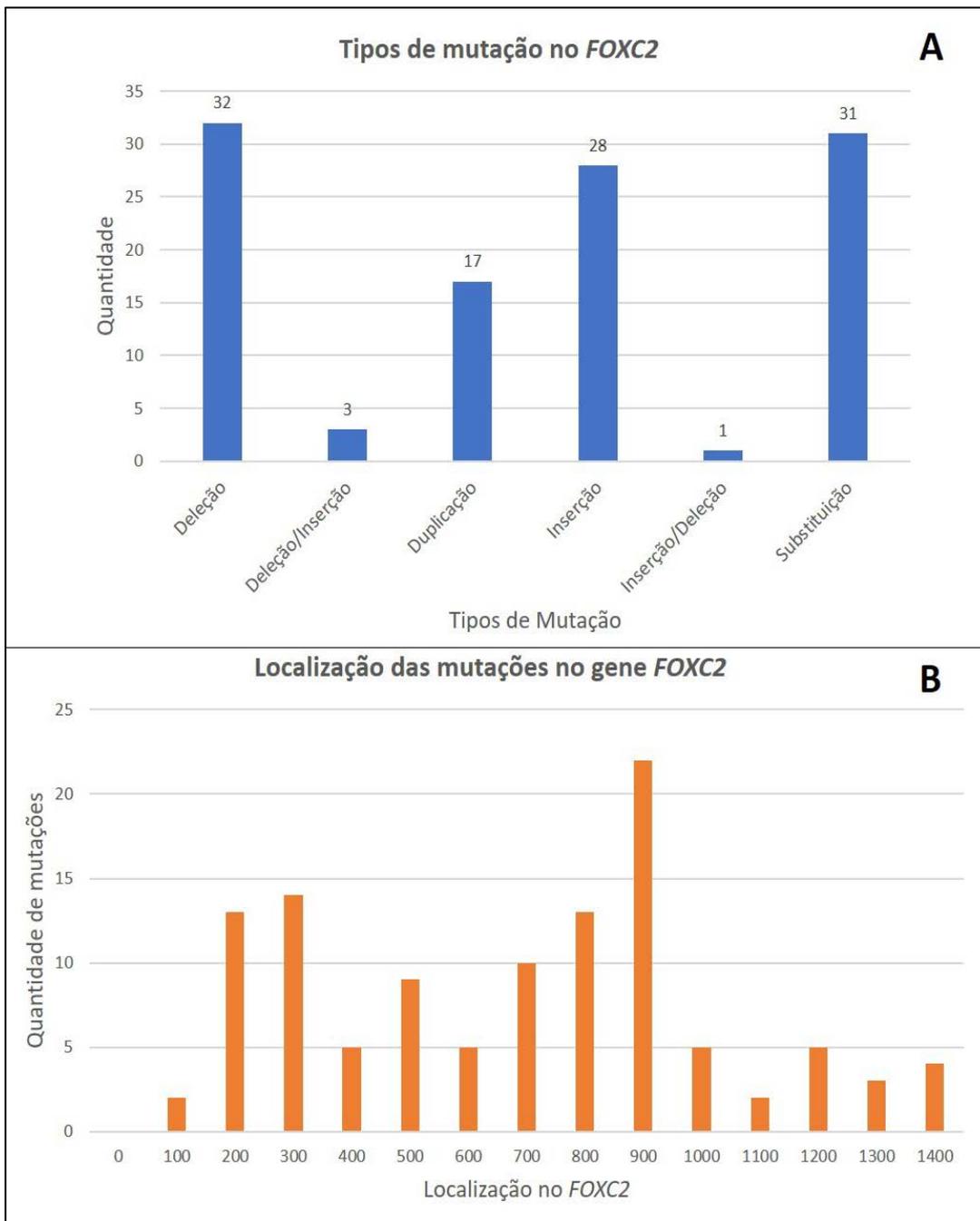
no

MalaCards

([https://www.malacards.org/card/lymphedema\\_distichiasis\\_syndrome?search=distichiasis](https://www.malacards.org/card/lymphedema_distichiasis_syndrome?search=distichiasis), acesso em 17/03/2020).

FONTE: Próprio trabalho

**Figura 6** - Gráficos sobre a distribuição das mutações em relação ao tipo e a localização no *FOXC2*.



Legenda: No gráfico A, temos a distribuição das mutações em relação ao tipo de mutação; podemos observar que a maioria das mutações são de deleção e substituição. No gráfico B, temos a distribuição das mutações em relação a localização ao longo do gene; podemos notar que um grande número de mutações ocorre por volta dos 900 nucleotídeos.

FONTE: Desenvolvido pela autora

Tavian e colaboradores (2016) avaliaram seis pacientes com diferentes mutações no *FOXC2* descritos anteriormente (Michelini et al., 2012). Dos seis pacientes, quatro possuíam linfedema e distiquíase. Tavian e colaboradores queriam saber quais as consequências funcionais, que cada mutação causava através de um ensaio de *Luciferase Reporter*. Três das seis mutações estudadas apresentaram aumento da atividade transcricional, ou seja, ganho de função da proteína FOXC2, e esses pacientes tinham LDS. Com base nesse ensaio, os pesquisadores sugeriram que *tanto ganho como perda de função* da proteína FOXC2 podem causar LDS (TAVIAN et al., 2016).

## **1.5. Justificativa e relevância**

O diagnóstico etiológico preciso de uma doença ou síndrome é de suma importância, pois nos ajuda a compreender quais as limitações, que podem vir a existir, e a descobrir quais as melhores formas de lidar, os cuidados necessários e os tratamentos disponíveis para a pessoa afetada. Com a Síndrome Linfedema-Distiquíase não é diferente. Além disto, tanto quanto saibamos, nenhum paciente da população brasileira recebeu diagnóstico molecular. Portanto, não se conhece as mutações que segregam aqui. Considerando-se que a população brasileira tem uma composição genética diferente das européia e Norte-americanas, mais estudadas, é possível que surjam mutações não descritas anteriormente. Além disto, o ponto de vista científico, a investigação de famílias com a LDS auxilia no delineamento da variação fenotípica.

## **1.6. OBJETIVOS**

### **1.6.1. Objetivo Geral**

Contribuir para a compreensão da LDS através da triagem de mutações no gene FOXC2 em uma família onde esta síndrome está segregando.

### **1.6.2. Objetivos Específicos**

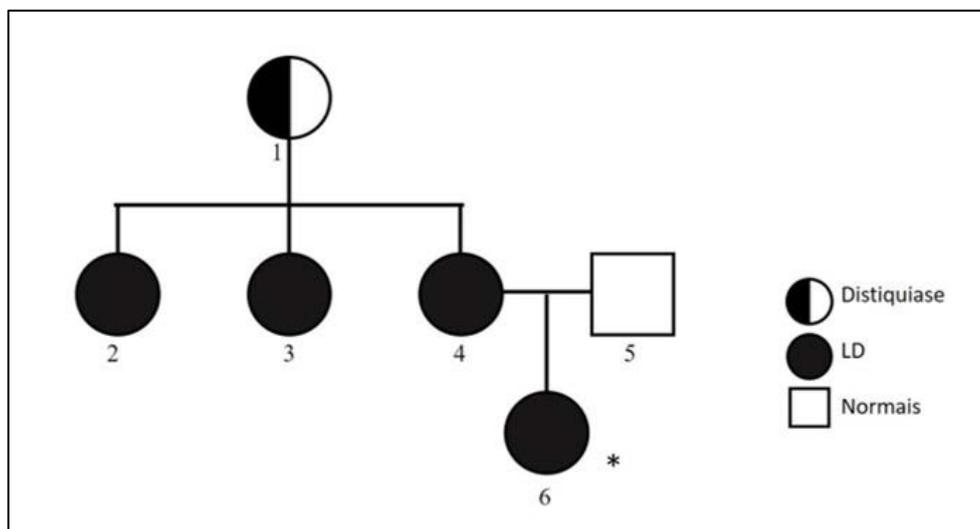
- Sequenciar o gene *FOXC2* dos indivíduos afetados, que constituem a amostra deste estudo;
- Sequenciar a região promotora do gene *FOXC2*, assim como as regiões 5'-UTR e 3'-UTR;
- Classificar as variantes eventualmente identificadas, com base em critérios de qualidade e potencial impacto funcional.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Amostra

A família do presente estudo é oriunda do Serviço Especial de Genética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e é composta por um casal jovem e não consanguíneo, sua primeira filha, duas tias maternas e a avó materna. A criança apresenta hipertricose em região frontal, sobrancelhas esparsas, distiquíase, dorso nasal achatado, lábio superior em tenda, excesso de pele em região da nuca, sopro sistólico ejetivo grau II em VI em foco mitral, trama vascular evidente em parede abdominal, abdômen globoso, sem visceromegalias, e edema leve em planta dos pés bilateralmente. O pai é assintomático e a mãe apresenta edema intermitente de membros inferiores desde os 12 anos de idade e, também, tripla fileira de cílios (triquíase). Além disso, duas tias do lado materno também apresentam edema intermitente de membros inferiores e distiquíase. A avó materna apresenta apenas distiquíase (Figura 7).

**Figura 7** - Heredograma da família do presente estudo e os respectivos fenótipos



Legenda: Na Figura podemos ver os integrantes estudados da família e os respectivos fenótipos observados. 1: avó materna; 2 e 3: tias maternas; 4: mãe; 5: pai; e 6: criança. \*A criança possui mais fenótipos como já foi detalhado anteriormente.

FONTE: Desenvolvido pela autora usando os dados coletados pela equipe do Serviço Especial de Genética, HC, UFMG

A família aceitou participar da pesquisa, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e foi coletado sangue periférico arterial da criança, da mãe, da avó e das duas tias. O DNA de todos indivíduos foi extraído no Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) através de uma adaptação do protocolo de extração de Miller, Dykes e Polesky, de 1988.

## 2.2. Estudos moleculares

Para encontrar possíveis mutações no *FOXC2*, sequenciamos a região promotora, as regiões 5'- e 3'-não traduzidas (5'-UTR e 3'-UTR, respectivamente) e a região codificadora. Para fazermos o sequenciamento, utilizamos cinco pares de primers. Três deles foram os mesmos utilizados por Erickson e colaboradores (2001), cobrindo a região 5'-UTR e parte da região codificadora. Além deles, foram desenhados mais dois pares de primers utilizando o *software* PrimerBlast do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), tendo como sequência de referência a montagem GRCh38.p2 do genoma humano. Estes dois pares de primer foram adicionados com o intuito de cobrir a 3'-UTR e a região promotora do gene *FOXC2*, que inicialmente não eram abrangidas pelos três pares usados por Erickson e colaboradores (2001). Deste modo, todo o gene foi coberto, assim como a sua região promotora (Fig. 8). As sequências de todos os primers utilizados no presente trabalho estão descritas na Tab. 3.

**Tabela 3** - Sequências Forward e Reverse dos cinco primers utilizados no presente trabalho para a amplificação do gene *FOXC2*

<i>Nomes</i>	<i>Forward (5' → 3')</i>	<i>Coordenadas Genômicas</i>	<i>Reverse (5' → 3')</i>	<i>Coordenadas Genômicas</i>	<i>Tamanho do Amplicon</i>
FOXC2-1	5' TCACCTTGAACGGCATCTAC 3'	86567613 - 86567632	5' GCCCTGCAGCGCTCTCGG 3'	86568033 - 86568052	440
FOXC2-2	5' AGGTGGTGATCAAGAGCGAG 3'	86567964 - 86567983	5' GCGAGTTGAGAGCGCTCAGG 3'	86568439 - 86568459	496
FOXC2-3	5' TCTCTCGGCTCTCTCGCTC 3'	86567246 - 86567265	5' TGCCAGCCCTGCTTGTCTCC 3'	86567665 - 86567685	440
FOXC2-4	5' CTCTCGGACCACCCGAGC 3'	86568407 - 86568424	5' CTCCGGGTCTGAGAAAAG 3'	86568958 - 86568976	570
FOXC2-5	5' CCGAGGAAAGTAAAACTCGC 3'	86566789 - 86566809	5' CTGCATGCTGCTCCGAGAC 3'	86567322 - 86567341	553

FONTE: Desenvolvido pela autora. Coordenadas genômicas da montagem CRCh38.p7

**Figura 8** - Sequência do gene *FOXC2* e a localização dos cinco pares de primers utilizados no presente trabalho

```

cogaggaagtaaaaactcgctttcagcaagaagacttttgaaacttttcccaatccctaaaagggacttggcctctttttctgggctcagcgg
FOXC2-5F->
ggcagccgctcggacccccggcgctgacctcggggtgcccattcgctgggggttggagagcctcctgcccctcctcgcgcccggcggag
ggtccacctgggtccccaggcccgcgctcctcgctgggtccgcccggcctgcccggctgcccggcgggtcctggagccagcggag
agcggggcggcgctgcgcttgcggggcgcgccctccaggatgcccgatccgcccggcctgaaagcgcgcccctgctcggcccggagcg
ccgcccggcgcaacctcgcggcgaggctgcccaggagcccgggcgcccctcccgtcccctcctcctcccctctggctctctcggctct
FOXC2-1F->
ctcgtctcagggccccctcgtcccccgggcgcagtcggtgcccggggcgcccggcgagccgtctcggagcagcATGCAGCGCGCTACTC
<-FOXC2-5R
CGTGTCCGACCCCAACGCCCTGGGAGTGGTGCCCTACCTGAGCGAGCAGAATTACTACCGGGCTGCGGGCAGCTACGGCGGCATGGCCAGCCCC
ATGGGCGTCTATTCCGGCCACCCGGAGCAGTACAGCGCGGGGATGGGCCGCTCCTACGCGCCCTACCACCACCACCAGCCCGCGGGCCTAAGG
ACCTGGTGAAGCCGCCCTACAGCTACATCGCGCTCATCACCATGGCCATCCAGAACGCGCCCGAGAAGAAGATCACCTTGAACGGCATCTACCA
FOXC2-2F->
GTTTCATCATGGACCGCTTCCCCTTCTACCGGGAGAACAAGCAGGGCTGGCAGAACAGCATCCGCCACAACCTCTCGTCAACGAGTGTCTCGTTC
<-FOXC2-1R
AAGGTGCCCCGCGACGACAAGAAGCCCGCAAGGGCAGTTACTGGACCCTGGACCCGGACTCCTACAACATGTTTCGAGAACGGCAGCTTCTCTGC
GGCGCCGGCGCGCTTCAAAAAGAAGGACGTGTCCAAGGAGAAGGAGGAGCGGGCCACCTCAAGGAGCCGCCCGGGCGGCTCCAAGGGCGC
CCCAGCCACCCCCACCTAGCGGACGCCCCCAAGGAGGCGGAGAAGAAGTGGTGATCAAGAGCGAGGCGGGCTCCCGGGCGTCCCGGTCATC
FOXC2-3F->
ACCAAGGTGGAGACGCTGAGCCCGAGAGCGCGCTGCAGGGCAGCCCGCGCAGCGCGCCCTCCACGCCCGCCGGCTCCCCCGACGGCTCGCTGC
<-FOXC2-2R
CGGAGCACACGCCCGCGGCCCAACGGGCTGCCTGGCTTTCAGCGTGGAGAACATCATGACCCTGCGAACGTCGCGCCGGGGCGGAGAGCTGAG
CCCGGGGGCCGGACGCGCGGGCTGGTGGTGCCGCGCTGGCGCTGCCCTACGCGCCCGCCCGCCCGCCCTACGGCCAGCCGTGCGCTCAG
GGCCTGGAGGCGGGGCGCGGGGGCTACCAGTGCAGCATGCGAGCGATGAGCCTGTACACCGGGGCGGAGCGCGCGGCACATGTGCGTCC
CGCCCGCCCTGGACGAGGCCCTCTCGGACCACCCGAGGGGCCCCACGTGCGCCCTGAGCGCTCTCAACTCGCCCGCCGAGGAGGGCGCGT
FOXC2-4F-> <-FOXC2-3R
CGCCGCCACGGGCCACCACCACCAGCACCACGGCCACCACCACCCGAGGCGCGCCGCCCGCCCGCCCGGCTCCCCAGCCCCAGCCGACGCCGCGAG
CCCGGGGCCCGCGGGCGCAGGCGGCCTCCTGGTATCTCAACCACAGCGGGGACCTGAACCACCTCCCCGGCCACACGTTTCGCGGCCAGCAGC
AAACTTCCCCAACGTGCGGGAGATGTTCAACTCCCACCGGCTGGGGATTGAGAAGTCCGACCCTCGGGGAGTCCCAGGTGAGTGGCAATGCCAG
CTGCCAGTGCCTACAGATCCACGCGCCCTCTCTATCGCCACGACCCCTACTCCTACGACTGCACGAAATACTGAcgtgtcccgggaact
cccctcccggcccgtccggcttcgctcccagccccgacccaaccagacaattaaggggctgagagagcgaaaaaagaaacaaaacatgtc
caccaaccttttctcagaccgggag
<-FOXC2-4R

```

Legenda: Na figura, podemos observar o gene *FOXC2*; as letras maiúsculas representam a sequência codificadora e as letras minúsculas simbolizam as sequências não codantes: 5'-UTR, 3'-UTR e a região *upstream* ao gene. Observa-se também a localização de todos os cinco pares primers utilizados; sequências forward e reverse são indicadas na linha abaixo da linha de nucleotídeos.

FONTE: Desenvolvidos pela autora, com base na imagem gerada no NCBI e referente à montagem CRCh38.p7

## 2.3. Padronização

### 2.3.1. *FOXC2* Par de Primer 1

A padronização da reação de PCR (*polymerase chain reaction*) para cada conjunto de primers foi feita, no Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM – ICB - UFMG), separadamente, porém todas para um volume total de 50µL. Para essa reação utilizou-se 30,8µL de água Mili-Q, 10µL de Tampão IV B 5X (Phonutria Biotecnologia,

Belo Horizonte, MG, Brasil), 2 $\mu$ L de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 $\mu$ L de DMSO (Merck, Brasil), 0,5 $\mu$ L dos primers Forward e Reverse (50 pmol/ $\mu$ L), 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 200 ng de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador (Veriti<sup>TM</sup> – Applied Biosystems, Belo Horizonte - Brasil) com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; seguida por 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 30 segundos de anelamento a 60°C e extensão de 1 minuto a 72°C; e, uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos, seguidas por -4°C por duas horas.

### ***2.3.2. FOXC2 Par de Primer 2***

Para essa reação utilizou-se 29,8 $\mu$ L de água Mili-Q, 10 $\mu$ L de Tampão IV B 5X (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil), 2  $\mu$ L de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), solução com 2 mM de cada dNTP, 2 $\mu$ L de DMSO (Merck, Brasil), 1 $\mu$ L dos primers Forward e Reverse (50pmol/ $\mu$ L), 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 200 ng de DNA. A amplificação da reação foi realizada no termociclador (Veriti<sup>TM</sup> – Applied Biosystems, Belo Horizonte - Brasil) com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 30 segundos de anelamento a 60°C e extensão de 1 minuto a 72°C, e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos, seguidas por -4°C por duas horas.

### ***2.3.3. FOXC2 Par de Primer 3***

Para essa reação, utilizou-se 32,8 $\mu$ L de água Mili-Q, 10 $\mu$ L de Tampão IV B 5X (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil), 2 $\mu$ L de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 $\mu$ L de DMSO (Merck, Brasil), 0,5 $\mu$ L dos primers Forward e Reverse (50 pmol/ $\mu$ L), 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 100 ng de DNA. A amplificação da reação foi realizada no termociclador (Veriti<sup>TM</sup> – Applied Biosystems, Belo Horizonte - Brasil) com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 30 segundos de anelamento a 60°C e extensão de 1

minuto a 72°C, e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos, seguidas por -4°C por duas horas.

#### ***2.3.4. FOXC2 Par de Primer 4***

Para essa reação, utilizou-se 27,25µL de água Mili-Q, 10µL de Tampão IV B 5X (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil), 2µL de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2µL de DMSO (Merck, Brasil), 1,75µL de Betaína (Sigma-Aldrich, Belo Horizonte, MG, Brasil), 2µL dos primers Forward e Reverse (50 pmol/µL), 0,2µL de Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 200 ng de DNA. A amplificação da reação foi realizada no termociclador (Veriti™ – Applied Biosystems, Belo Horizonte - Brasil) com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 30 segundos de anelamento a 60°C e extensão de 1 minuto a 72°C, e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos, seguidas por -4°C por duas horas.

#### ***2.3.5. FOXC2 Par de Primer 5***

Para essa reação utilizou-se 27,25µL de água Mili-Q, 10µL de Tampão IV B 5X (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil), 2µL de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2µL de DMSO (Merck Brasil), 1,75µL de betaína (Sigma-Aldrich, Belo Horizonte, MG, Brasil), 2µl dos primers Foward e Reverse (50 pmol/µL), 0,2µL de Taq DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil) e 200 ng de DNA. A amplificação da reação foi realizada no termociclador (Veriti™ – Applied Biosystems, Belo Horizonte - Brasil) com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 1 minuto de anelamento a 58°C e extensão de 1 minuto a 72°C, e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos, seguidas por -4°C por duas horas.

## **2.4. Separação eletroforética e sequenciamento Sanger dos produtos de PCR**

A qualidade da amplificação por PCR foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%.

Os produtos de PCR foram purificados através do Protocolo de Purificação de PCR para sequenciamento por PEG 8000/MgCl<sub>2</sub> (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS adaptado, 1989). Primeiramente, o produto de PCR foi transferido para um tubo de 0,5ul, ao qual foi adicionado mesmo volume de 20% PEG (polietilenoglicol), a temperatura ambiente. As amostras foram misturadas no vortex por 15 segundos. Posteriormente, os tubos foram mantidos em banho-maria por 15 minutos à 37°C; e, em seguida, centrifugados por 15 minutos em temperatura ambiente, a 10.000 rpm ou rotação máxima. O sobrenadante foi retirado com uma pipeta inserida do lado oposto da dobradiça do tubo, lavado com etanol gelado 80% (125 ul), e após foi centrifugado a 10.000 rpm e à 4°C durante 5 minutos; esses três passos foram repetidos conforme ordenado no protocolo. Por fim, o álcool foi removido com o uso de uma pipeta, o produto de PCR foi ressuspensionado em água Mili-Q (25 uL) e colocado no banho-maria over night a 37°C para ajudar na ressuspensão. Após a purificação, realizou-se o sequenciamento de Sanger. Essa última etapa foi realizada na Fundação Oswaldo Cruz (Belo Horizonte – MG), usando-se o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), em um sequenciador ABI 3370 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA).

## **2.5. Clonagem dos produtos de PCR**

O sequenciamento com os primers 4 e 5, a partir dos produtos de PCR, não ficou com boa qualidade. Assim, com o intuito de melhorar a qualidade e cobertura dos resultados obtidos no sequenciamento do gene *FOXC2*, os produtos de PCR das sequências FOXC2-4 e FOXC2-5 da criança foram clonados com a utilização do kit TOPO TA Cloning Kit da Invitrogen by Life Technology, inserido na bactéria *Escherichia coli* DH5α através de eletroporação. As colônias cresceram em meio Luria Bertani (LB), com uma concentração de 100 ul/ml de ampicilina para selecionar as colônias que continham o plasmídeo de interesse. As PCRs de colônias foram feitas

seguindo a mesma padronização das PCR dos primers 4 e 5 presentes na Tab. 3 e nas seções 2.3.4 e 2.3.5, com a única diferença que os 200 ng de DNA foram substituídos por um raspado das colônias. Os produtos dessa PCR foram analisados em gel de agarose 1%, corados com GelRed. A extração do DNA plasmidial das colônias positivas foi feita através do protocolo adaptado de Sambrook (1989) seguido de sequenciamento Sanger na plataforma PDTIS na Fundação Oswaldo Cruz (Belo Horizonte). Essa última etapa foi realizada na Fundação Oswaldo Cruz (Belo Horizonte – MG), usando-se o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), em um sequenciador ABI 3370 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA).

## **2.6. Análise dos resultados dos Sequenciamentos Sanger**

O programa *CodonCode Aligner* foi utilizado para analisarmos as sequências obtidas. Nesse *software*, conseguimos alinhar as sequências de todos os amplicons e montar assim a sequência consenso completa do gene *FOXC2* de cada indivíduo. Comparamos essas sequências com a sequência de referência do gene *FOXC2* na montagem GRCh38.p7 do genoma humano, obtida no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – ID: 2303). As sequências consenso de cada indivíduo também foram conferidas usando-se *software* BLAST do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com o intuito de analisar se havia alguma homologia das sequências dos indivíduos com outros genes além do gene *FOXC2*.

## **2.7. Avaliação da região promotora e regiões conservadas evolutivamente**

De acordo com a literatura, tanto *FOXC2* como *FOXC2-ASI* não tem promotor identificado. Para atualizar esta informação foi feita a busca em uma base de dados que registra os promotores para os quais existe evidência experimental. Foi usado o EPDnew (DREOS et al., 2013). Para verificar a existência de um promotor em *FOXC2* e *FOXC2-ASI*, foi usada a sequência com mais 5 kb *upstream* e 5 kb *downstream* do gene usando-se o *software* Promoter 2.0 (KNUDSEN, 1999).

Para analisarmos se os possíveis SNPs estavam localizados dentro do promotor, utilizamos o *software* Gene2Promoter (Genomatix). Além disso, verificamos se tais SNPs estavam localizados em regiões conservadas evolutivamente; para isso, utilizamos o *software* ECR Browser (OVCHARENKO et al., 2004). Outra análise foi executada com a intenção de prever sítios de ligação de fatores de transcrição presentes na região promotora e se a presença do alelo mutado alterava esses sítios presente anteriormente, essa análise foi feita através do *software* Gene Promoter Miner.

## **2.8. Avaliação do potencial funcional das variantes encontradas**

A anotação funcional das variantes identificadas no sequenciamento de Sanger foi feita usando-se o *Variant Effect Predictor (VEP)* (McLAREN et al., 2016), *AliBaba2* (GRABE, 2002) e *MatInspector* (QUANDT et al., 1995). Para isso, selecionamos aproximadamente 20 nucleotídeos ao redor da mutação, sendo 10 antes e 10 depois, e observamos as diferenças entre as sequências com o nucleotídeo da referência e com o nucleotídeo mutado. Além disso, procuramos as variações nos bancos de dados do *NCBI*, analisando o *FOXC2* na plataforma Gene e dbSNP com o propósito de descobrir se eram mutações descritas anteriormente.

## **2.9. Análise de G-Quadruplex**

A sequência com a mutação foi comparada com a sequência do *NCBI* para analisar a presença de possíveis G-quadruplex e G-quadruplex conhecidos e avaliar se a presença da mutação altera um G-quadruplex. Para essas análises foi usado inicialmente o *Greglist* (ZHANG; ZHANG, 2008), que é um banco de dados que lista genes potencialmente regulados por G-quadruplex, posteriormente, o *G4Hunter* (BRÁZDA et al., 2019), que prediz os possíveis G-quadruplex ao longo do gene.

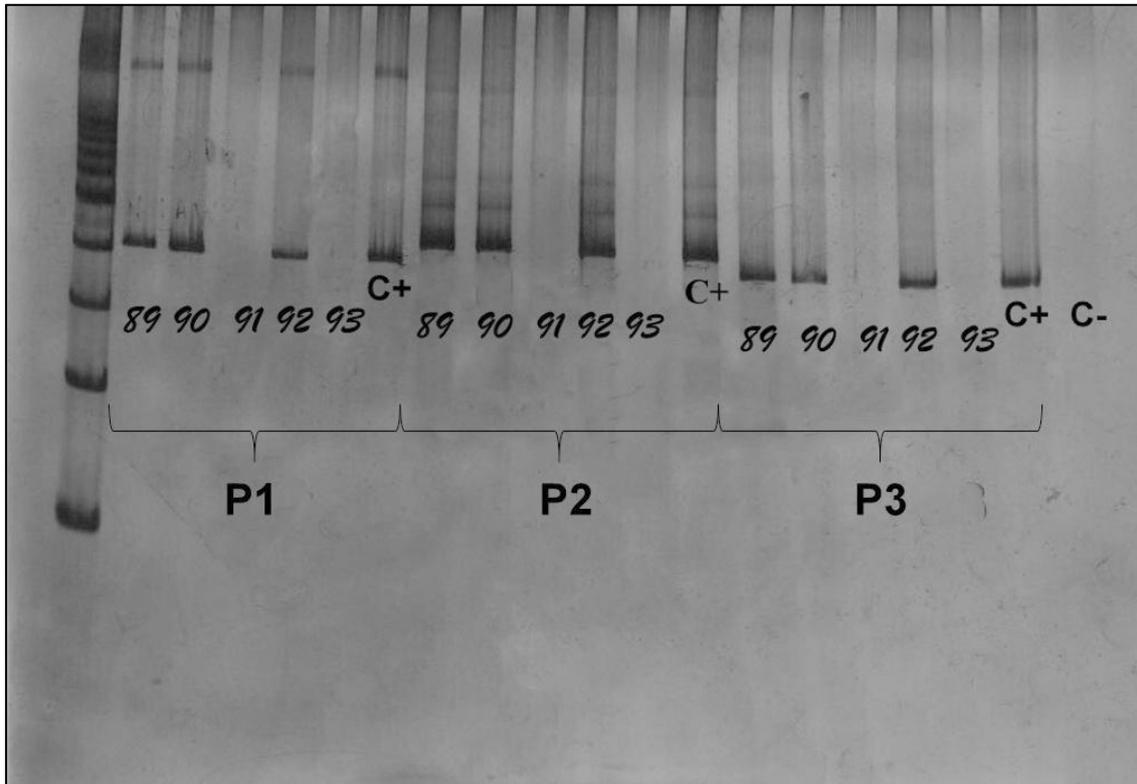
### **3. RESULTADOS**

A síndrome linfedema-distiquíase pode ser causada por diversas mutações de perda de função no gene FOXC2 como mencionando anteriormente, e para determinar qual o tipo e o local da mutação é necessário examinar todo o gene. O sequenciamento Sanger foi a estratégia utilizada neste trabalho para examinar o gene, precedido de amplificação por PCR de cinco conjuntos de primers.

#### **3.1. Produtos de PCR**

Os produtos de PCR de cada par de primer, que foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, podem ser observados nas figuras 9 e 10. As amostras da avó e de uma das tias não amplificaram com quaisquer dos pares de primers usados.

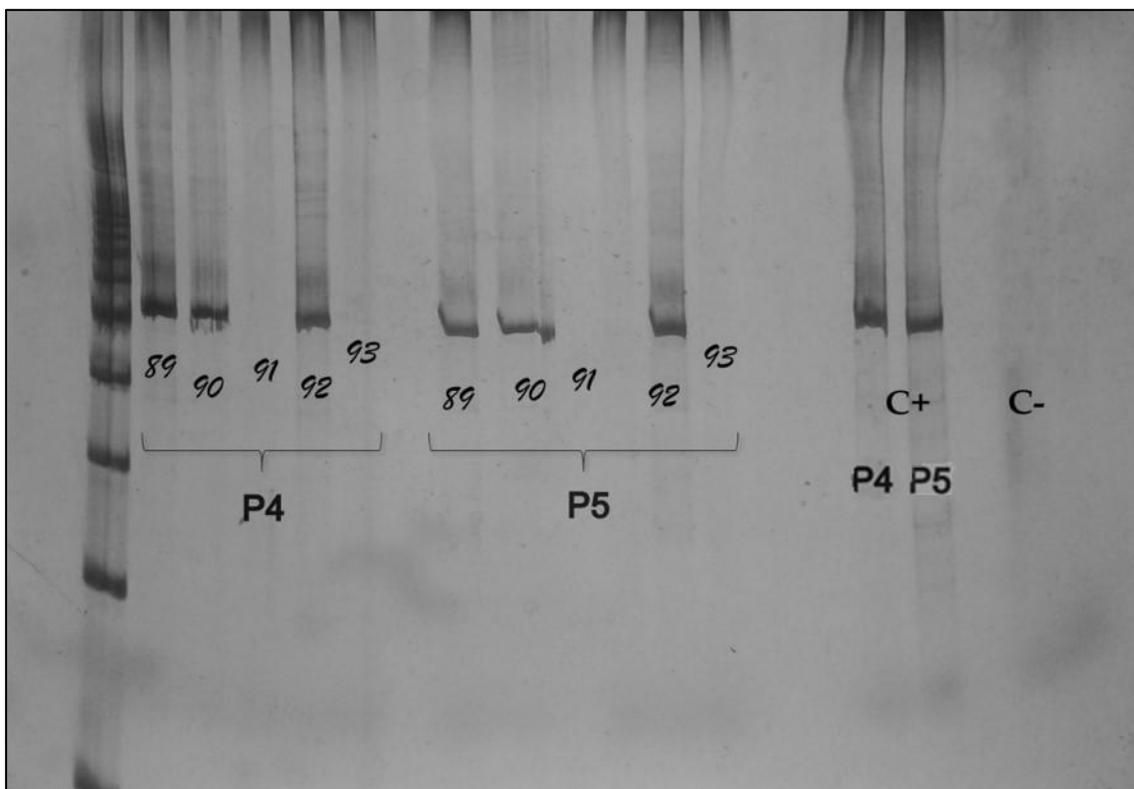
**Figura 9** - Gel de acrilamida 8% das amostras para sequenciamento dos primers FOXC2-1, FOXC2-2 e FOXC2-3



Legenda: Ladder de 100 pares de base; amostras 4189, 4190, 4191, 4192 e 4193, representados na figura por 89, 90, 91, 92 e 93, respectivamente – amostras de DNA da criança, mãe, tias e avó respectivamente. C+: controle positivo da PCR – e C-: controle negativo da PCR. P1 – primers FOXC2-1; P2 – primers FOXC2-2; P3 – primers FOXC2-3. Observe que as amostras 4191 e 4193 não amplificaram.

FONTE: Desenvolvido pela autora

**Figura 10** - Gel de acrilamida 8% das amostras para sequenciamento dos Primers FOXC2-4 e FOXC2-5



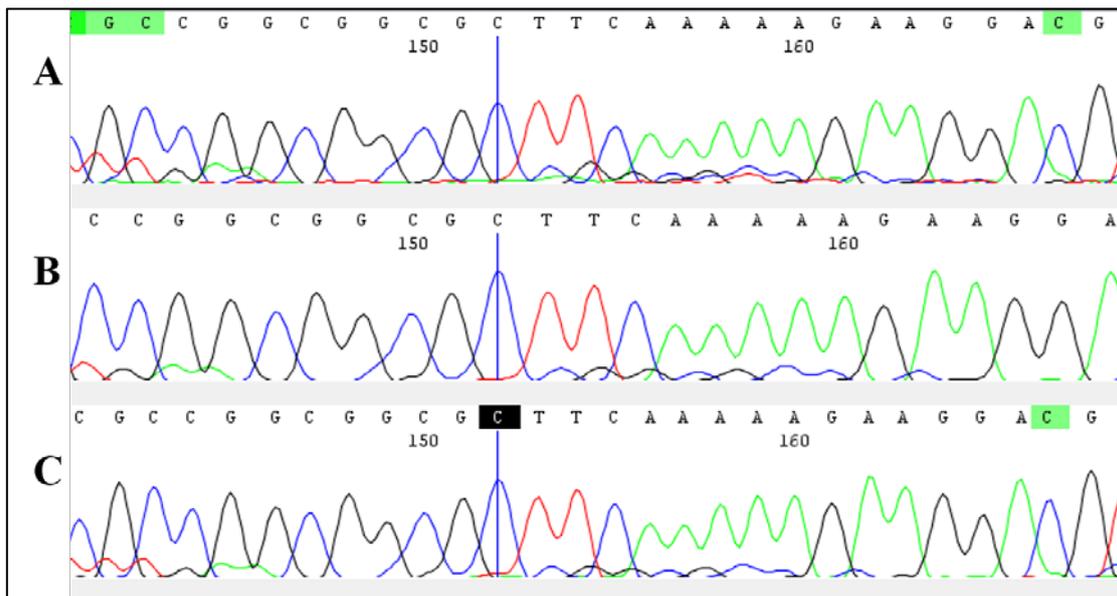
Legenda: Ladder de 100 pares de base; amostras 4189, 4190, 4191, 4192 e 4193, representados na figura por 89, 90, 91, 92 e 93, respectivamente – amostras de DNA da criança, mãe, tias e avó, respectivamente. C+: controles positivos da PCR – e C-: controle negativo da PCR. P4 – primers FOXC2-4; P5 – primers FOXC2-5. Observe que as amostras 4191 e 4193 não amplificaram.

FONTE: Desenvolvido pela autora

### 3.2. Sequenciamento Sanger dos Amplicons

As análises que se seguem são baseadas nos resultados do sequenciamento dos produtos de PCR obtidos para três indivíduos da família, para os quais obteve-se amplificação, ou seja, a criança, sua mãe e uma tia materna, todos afetados. O sequenciamento dos amplicons gerados com os primers FOXC2-1, FOXC2-2 e FOXC2-3 apresentou boa qualidade e, como esperado, era idêntico a sequência de referência encontrada do *NCBI* (Fig. 11, 12 e 13).

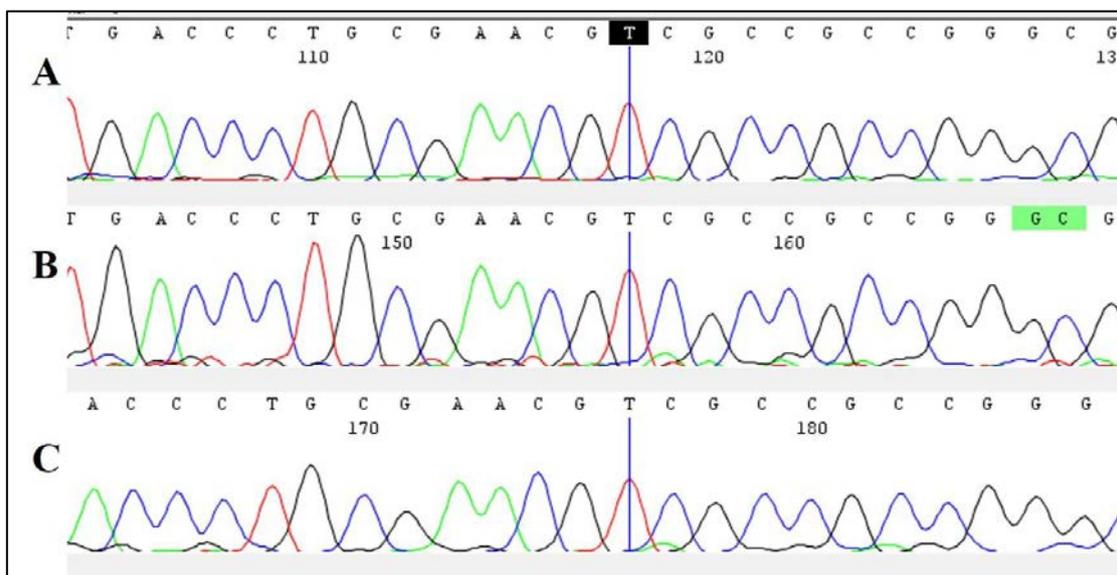
**Figura 11** - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-1



Legenda: Exemplo de eletroferograma obtido com os primers FOXC2-1. Os eletroferogramas A, B e C são oriundos do sequenciamento pós-PCR e pertencem à criança, mãe e tia, respectivamente.

FONTE: Desenvolvido pela autora

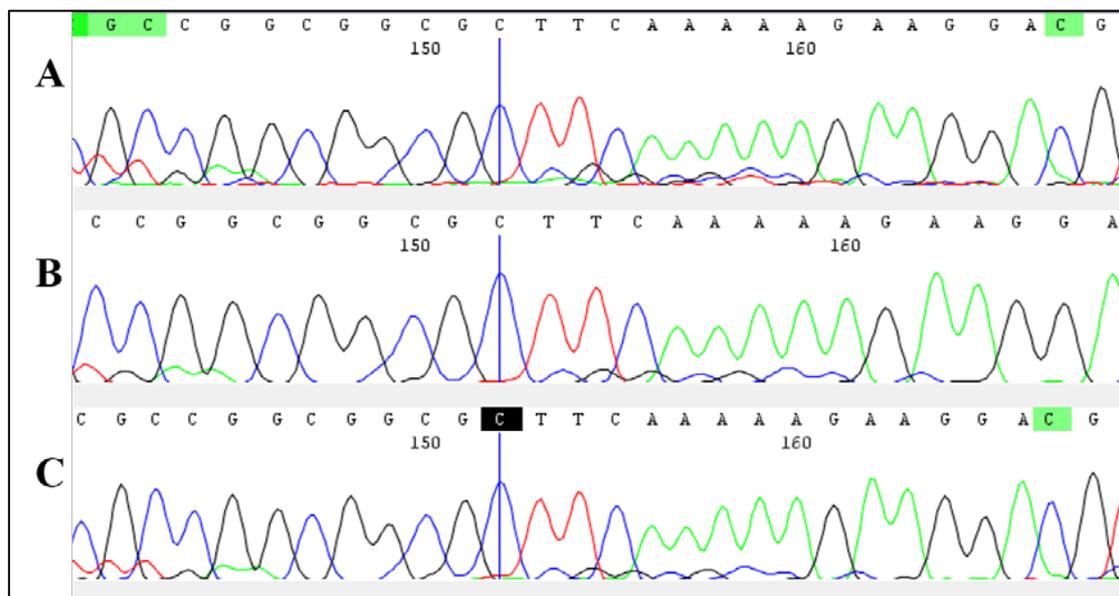
**Figura 12** - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-2



Legenda: Exemplo de eletroferograma obtido com os primers FOXC2-2. Os eletroferogramas A, B e C são oriundos do sequenciamento pós-PCR e pertencem à criança, mãe e tia, respectivamente.

FONTE: Desenvolvido pela autora

**Figura 13** - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-3

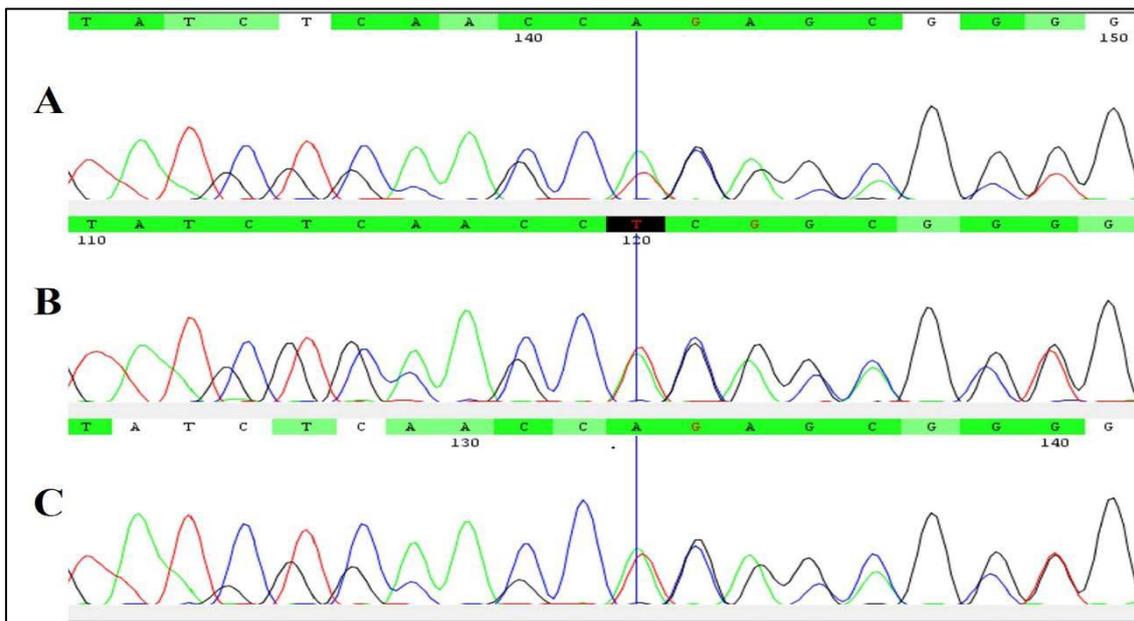


Legenda: Exemplo de eletroferograma obtido com os primers FOXC2-3. Os eletroferogramas A, B e C são oriundos do sequenciamento pós-PCR e pertencem à criança, mãe e tia, respectivamente.

FONTE: Desenvolvido pela autora

Entretanto, o sequenciamento dos amplicons gerados com os primers FOXC2-4 e FOXC2-5 não apresentou uma qualidade satisfatória, exibindo algumas regiões com indícios de alguma inserção ou deleção uma vez que apresentam um background mais alto que o normal (Fig. 14 e 15). Nestas figuras, é possível observar que diversos picos se apresentam duplos, sugestivos de SNP ou de deleções e/ou duplicações fora da área coberta pelos primers. Em função disto, os amplicons do caso índice foram clonados e sequenciados.

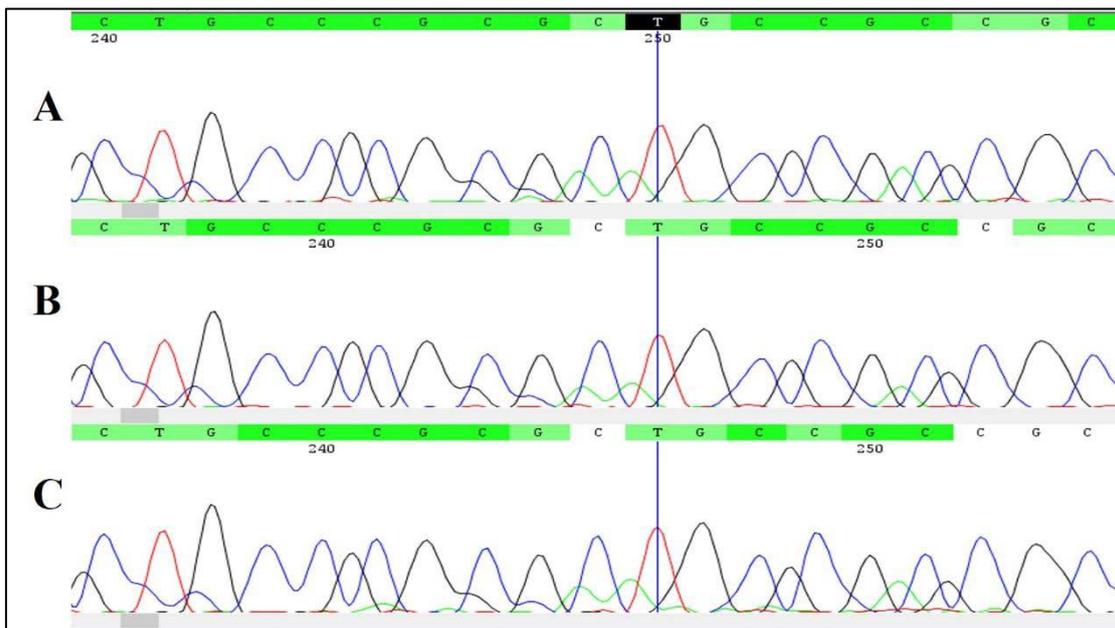
**Figura 14** - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-4



Legenda: Exemplo de eletroferograma obtido através do sequenciamento Sanger dos produtos de PCR com os primers *FOXC2-4*. Os eletroferogramas A, B e C são oriundos do sequenciamento da criança, mãe e tia, respectivamente. Podemos observar o background mais alto sugerindo a presença de uma deleção ou duplicação, ou, mais provavelmente, baixa qualidade de sequenciamento pós-PCR..

FONTE: Desenvolvido pela autora

**Figura 15** - Sequenciamento das amostras do Primer FOXC2-5



Legenda: Exemplo de eletroferograma obtido com os primers FOXC2-5. Os eletroferogramas A, B e C são oriundos do sequenciamento pós-PCR e pertencem à criança, mãe e tia, respectivamente. Podemos observar o background mais alto sugerindo uma deleção ou duplicação ou, mais provavelmente, baixa qualidade de sequenciamento pós-PCR. OBS: a linha vertical marca uma timina que não é a mutação detectada no sequenciamento pós-clonagem (ver abaixo).

FONTE: Desenvolvido pela autora

### 3.3. PCR de colônia

Os sequenciamentos, que não ficaram com boa qualidade (pares de primers FOXC2-4 e FOXC2-5) foram clonados através em plasmídeo, usando-se TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen by Life Technology) e posteriormente submetidos a uma PCR de colônias. Os produtos dessa PCR foram analisados em gel de agarose e pode-se observar que a clonagem funcionou satisfatoriamente na maioria das colônias (Fig. 16), que foram posteriormente sequenciadas.

**Figura 16** - Gel de agarose 1% das colônias que foram clonadas



Legenda: Separação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose, para o par de primers FOXC2-5. Ladder 1Kb; C-: Controle negativo, água; C+: controle positivo, sujeito normal, não relacionado; Colônias: Amplicon dos insertos das colônias geradas no tamanho de aproximadamente 550 pb referente ao par de primer FOXC2-5. Gel corado com GelRed 1x. A banda logo após o marcador de peso molecular é de outro experimento. FONTE: Desenvolvido pela autora

### 3.4. Mutações observadas

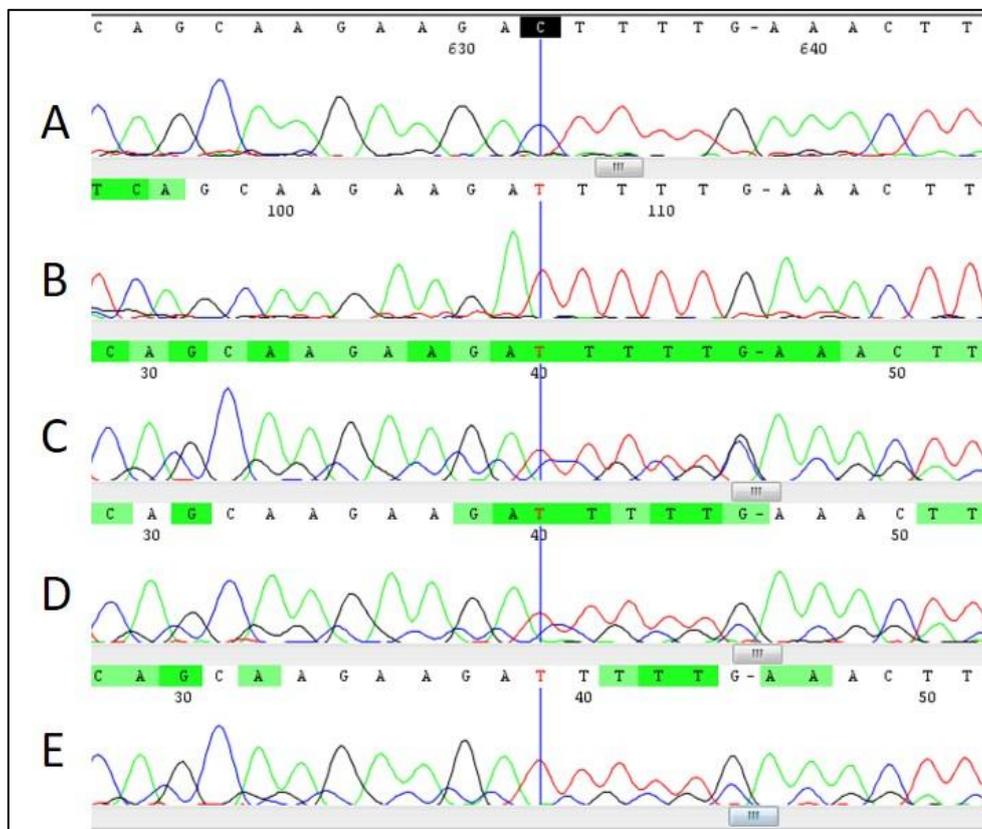
Comparando-se a sequência obtida para os três indivíduos da família sequenciados com os pares de primers FOXC2-1, FOXC2-2, FOXC2-3, FOXC2-4 com a sequência referência, não foram identificadas alterações. Estes primers cobrem toda a parte codificante do gene e todos os indivíduos sequenciados tinham a sequência idêntica à referência encontrada do NCBI (>gi|568815582:86567240-86568933; que é idêntica às NC\_000016.10; MN\_005251.3). FOXC2-4 cobre inclusive parte da 3'-UTR (ambas na montagem GRCh38.p13). Entretanto, na sequência obtida com o produto da PCR com os primers FOXC2-5 verificou-se a presença de duas substituições de nucleotídeos únicos, duas alterações que apareceram nas sequências clonadas. A primeira dessas mutações é um polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*; SNP) já descrito

em banco de dados (rs34221221:c.-512C>T – localizado em Chr16:86566824, GRCh38.p7). A segunda variante é uma substituição de nucleotídeo a 150 pares de bases antes do início da tradução do gene *FOXC2*, que nós nomeamos NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T (localizada em Chr16:86567186, GRCh38.p7) (Fig. 19, abaixo). Esta variante não foi encontrada em nenhuma base de dados (e.g., BLAST, NCBI; dbSNP) ou na literatura (pubmed, acesso em 18/04/2020). Através das sequências obtidas a partir dos produtos de PCR clonados, foi possível estabelecer que as mutações descritas aqui estão em fitas diferentes de DNA, ou seja, estão em trans.

### 3.4.1. rs34221221:c.-512C>T

A primeira variante genética observada neste estudo foi detectada com o par de primers FOXC2-5 e é a substituição de citosina por uma timina (rs34221221:c.-512C>T) localizada a 512 pares de bases antes do início da tradução do gene *FOXC2*. Essa variação foi encontrada no sequenciamento de duas colônias bacterianas diferentes e estava presente tanto na sequência *forward* quanto na *reverse* do sequenciamento oriundo dos plasmídeos (Fig. 17A e B). Além disso, essa variante aparece em todas as outras sequências do sequenciamento pós-PCR da criança e da sua mãe (Fig. 17C, D e E). Este SNP fica a quatro nucleotídeos antes do sítio de início da transcrição (Fig. 19, abaixo). Na figura, podemos observar que a criança e a mãe são heterozigotas C/T para o alelo em questão (C/T), enquanto a tia é homozigota T/T.

**Figura 17** - Eletroferograma do sequenciamento do produto de PCR, obtido com o primer FOXC2-5 (promotor e 5'-UTR)



Legenda: Eletroferograma na posição -512 dos indivíduos. Os eletroferogramas A e B são os oriundos do sequenciamento do produto de PCR da região promotora e 5' UTR, clonados em TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen by Life Technology), ambos pertencem a criança. Em A, o alelo típico, em B, o alelo correspondente à substituição -512C>T. Os eletroferogramas C, D e E são oriundos do sequenciamento pós-PCR (ou seja, sem clonagem) e pertencem à criança, mãe e tia, respectivamente. Observa-se que no sequenciamento do produto de PCR não clonado diversos picos aparecem duplicados, em um padrão semelhante entre as diferentes amostras, o que sugere a presença de deleções ou duplicações. Entretanto, estas alterações não aparecem no sequenciamento do produto da PCR clonado de 10 clones.

FONTE: Desenvolvido pela autora

A frequência do alelo mais raro (*minor allele frequency*, MAF), estimada para algumas populações, com amostras somando mais de 20.000 indivíduos. O alelo mais raro variou conforme a população (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs34221221>, acesso em abril de 2020) e pode ser visto na Tabela 4.

**Tabela 4** - Frequências alélicas do alelo de menor frequência do rs34221221 em diversas populações/Projetos

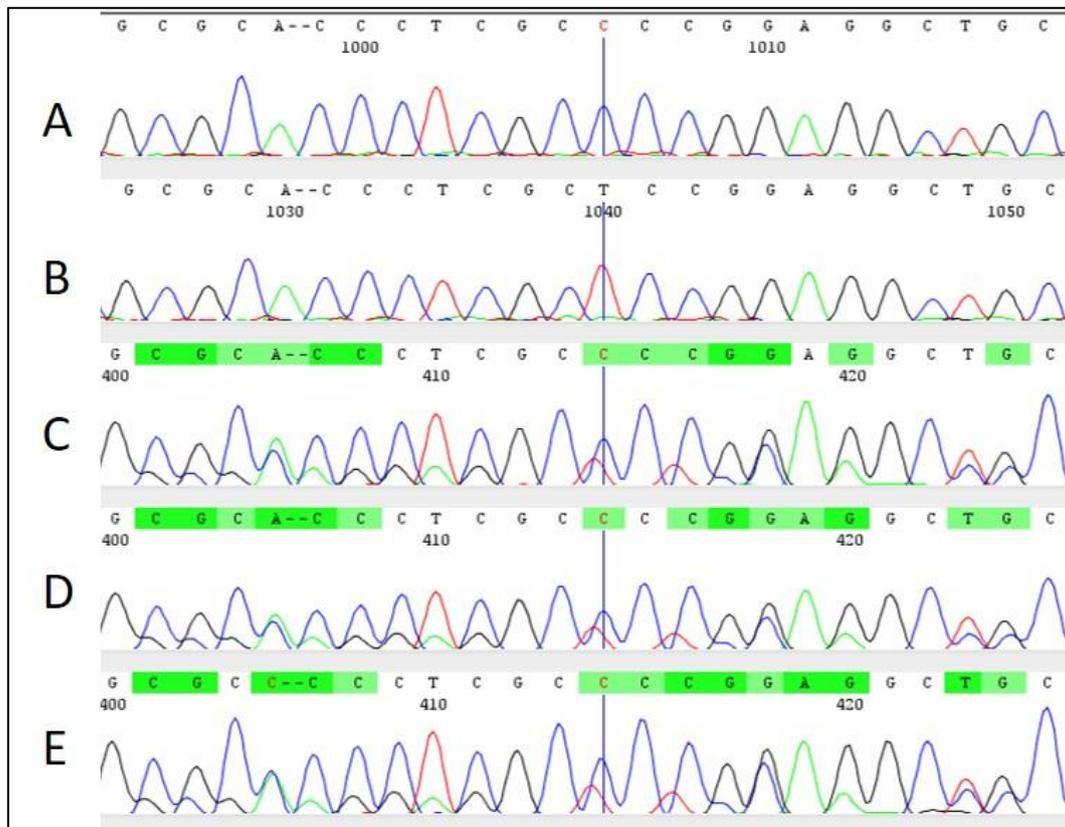
Alelo MAF	Freq.	N Populacional	Projeto
C	0.291667	175	Norte da Suécia
C	0.309152	1385	Estonia
C	0.387001	1435	TWINSUK
C	0.388168	1496'	ALSPAC
C	0.486847	15213	GnomAD
T	0.400943	85	Vietname
T	0.401757	2012	1000Genomes
T	0.476993	59895	TOPMED

FONTE: Próprio trabalho

### 3.4.2. NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T

A segunda possível mutação observada neste estudo é uma variante de nucleotídeo único no fragmento amplificado com o par de primers FOXC2-5 e se localiza 150 pb antes do início do éxon do gene *FOXC2*, na região 5'UTR do gene. Esta substituição acarreta a troca de uma citosina por uma timina (NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T). Essa variação foi encontrada em duas colônias (tanto na sequência *Forward* quanto na *Reverse*) do sequenciamento oriundo dos plasmídeos (Fig. 18A e B) e, além disso, ele aparece em todas as outras sequências do sequenciamento pós-PCR da criança e de seus familiares, mas como um *background* (Fig. 18C, D e E).

**Figura 18** - SNP2 Primer FOXC2-5 localizado a -150 pares de base do início da região traduzida do gene *FOXC2*



Legenda: O eletroferograma na posição -150. Os eletroferogramas A e B são oriundos do sequenciamento dos plasmídeos e ambos pertencem a criança. Os eletroferogramas C, D e E são oriundos do sequenciamento pós-PCR e pertencem a criança, mãe e tia, respectivamente. Nos eletroferogramas C, D e E, podemos observar um *background* em vermelho (timina). Observa-se que no sequenciamento direto do produto de PCR diversos picos aparecem duplicados, em um padrão semelhante entre as diferentes amostras, o que sugere a presença de deleções ou duplicações.

FONTE: Desenvolvido pela autora

Na figura 19, apresentamos a sequência do gene *FOXC2* com as duas mutações detectadas neste estudo.

**Figura 19** - Sequência do gene *FOXC2*, mostrando as mutações detectadas neste estudo

```

                                     † RNAm
ccgaggaaagtataaaactcgcttttcagcaagaagac/tttttgaaacttttcccaatccctaaaagggaacttggcctctttttctgggctcagc
ggggcagccgctcggacccccggcgcgctgacctcggggctgcccatttcgctgggggcttggagagcctcctcgccccctcctcgcgcgggcg
aggggtccacctgggtccccaggccggcggtctccgctgggtccggcgcccgccctgcccgcgctgcccgcgggggtcctggagccagcga
ggagcggggccggcgctgctgcttgcggggggcgccctccaggatgcccgatccgcccggctccgctgaaagcgcgccccctgctcgcccag
cgccgcggccccgcaccctcgc/tccggaggctgccaggagccccggggcgccccctcccgctccccctctctccccctctggctctctcgcg
ctctctcgtctcagggccccctcgtccccccggccgagtcctgctgcccggaggcgccggcgagccgtctcgggaagcagcATGCAGGCGCGCT
ACTCCGTGTCCGACCCCAACGCCCTGGGAGTGGTGCCCTACCTGAGCGAGCAGAATTACTACCGGGCTGCGGGCAGCTACGGCGGCATGGCCAG
CCCCATGGGCGICTATTCCGGCCACCCGGAGCAGTACAGCGCGGGGATGGGCGCTCCTACGCGCCCTACCACCACCACCAGCCCCGCGGGCCT
AAGGACCTGGTGAAGCCGCCCTACAGCTACATCGCGCTCATACCATGGCCATCCAGAACCGCCCGAGAAGAAGATCACCTTGAACGGCATCT
ACCAAGTTCATCATGGACCGCTTCCCCTTCTACCGGGAGAACAAGCAGGGCTGGCAGAACAGCATCCGCCACAACCTCTCGCTCAACGAGTGCTT
CGTCAAGGTGCCCGCGACGACAAGAAGCCCGCAAGGGCAGTTACTGGACCTGGACCCGGACTCCTACAACATGTTTCGAGAACGGCAGCTTC
CTGCGGCGCCGGCGCGCTTCAAAAAGAAGGACGTGTCCAAGGAGAAGGAGGAGCGGGCCACCTCAAGGAGCCGCCCGGGCGGGCTCCAAGG
GCGCCCCGGCCACCCCCACCTAGCGGACGCCCCCAAGGAGGCCGAGAAGAAGGTGGTGTATCAAGAGCGAGGCGGGCTCCCCGGCGCTGCCGGT
CATACCAAGGTGGAGACGCTGAGCCCCGAGAGCGCGTGCAGGGCAGCCCGCGCAGCGCGCCCTCCACGCCCGCCGGCTCCCCGACGGCTCG
TGCCGGAGCACACCGCCGCGGGCCCAACGGGCTGCCTGGCTTCAAGCGTGGAGAATCATGACCTGCGAACGTGCGCCCGGGCGGAGAGC
TGAGCCCGGGGCGGACCGCGGGGCTGGTGGTGCCCGCTGGCGCTGCCCTACGCGCGCGCGCCCGCCCGCCTACGGCCAGCCGTGCGC
TCAGGGCTGGAGCCGGGGCCCGCGGGGCTACCAAGTGCAGCATGCGAGCGATGAGCCTGTACACCGGGGCGGAGCGGGCCGCGCACATGTGC
GTCCCGCCCGCCTGGACGAGGCCCTCTCGGACCACCCGAGCGGGCCACGTCGCCCCCTGAGCGCTCTCAACCTCGCCCGCGGCCAGGAGGGCG
CGCTCGCCGCCACGGGCCACCACCAGCACCACGGCCACCACCACCCGAGCGCGCGCCCGCCCGCCGGCTCCCCAGCCCCAGCCGACGCC
GCAGCCCGGGCCCGCCGGCGCAGGGCCCTCCTGGTATCTCAACCACAGCGGGGACCTGAACCACCTCCCCGGCCACAGGTTCCGGGCCAG
CAGCAAACCTTTCCCAACGTGCGGGAGATGTTCAACTCCACCCGGCTGGGGATTGAGAACTCGACCCTCGGGGAGTCCCAGGTGAGTGGCAATG
CCAGTGCAGCTGCCCTACAGATCCACGCGCCCTCTCTATCGCCACGCAGCCCCCTACTCTACGACTGCACGAAATACTGAcgtgtccccggg
acctccccctccccggccccctccggcttcgcttcccagccccgacccaaccagacaattaaggggctgcagagacgcaaaaaagaaacaaaaca
tgtccaccaaccttttctcagaccgggag

```

Legenda: Letras minúsculas simbolizam as sequências que não seja parte da sequência codante. Neste caso, são apresentadas em minúsculas a 5'-UTR e a 3'-UTR e a região *upstream* do gene.

FONTE: Desenvolvido pela autora

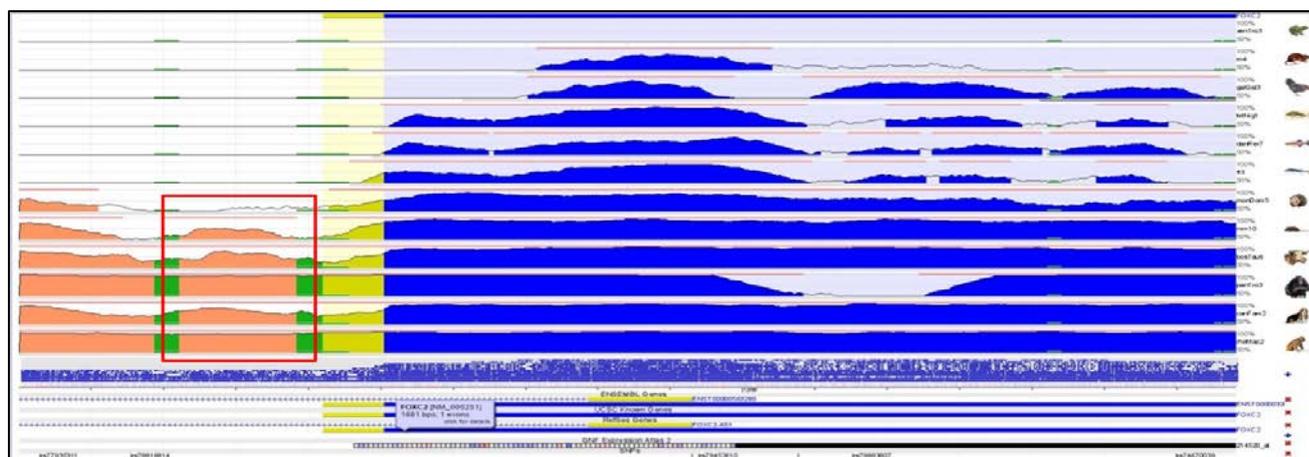
### 3.5. Análises bioinformáticas

A seguir, serão descritas as análises de Bioinformática desenvolvidas com o intuito de caracterizar a repercussão funcional destas variantes. Estas análises foram desenvolvidas para responder perguntas específicas, conforme mostrado abaixo.

#### 3.5.1. Como é a conservação evolutiva do gene *FOXC2*?

As regiões conservadas evolutivamente foram analisadas pelo *software* ECRbrowser (OVCHARENKO et al., 2004). Na Fig. 20), mostramos que o gene *FOXC2*, bem como sua região promotora, é conservado (linha rosa acima) nas espécies camundongo, bovino, chimpanzé, cachorro e macaco Rhesus (quadrado vermelho).

**Figura 20** - Análise da conservação evolutiva ao longo do gene *FOXC2*



Legenda: Na imagem, podemos observar que a região traduzida do *FOXC2* (azul), a região 5'-UTR (amarelo), a região intrônica (rosa) e repetições simples (verde). É possível visualizar que a parte antes do gene, onde está localizada a região promotora, é conservada (linha rosa acima) em muitas espécies, bem como o exon único e a 5'-UTR. FONTE: Desenvolvido pela autora

### 3.5.2. O gene *FOXC2* tem um promotor?

A literatura informa que os genes *FOXC2* e *FOXC2-ASI* não teriam promotores. Para atualizar esta informação, foi usado o *software* EPDnew (DREOS et al., 2013). Este *software* fornece a lista de promotores experimentalmente validados, por gene e por espécie. Não consta desta base de dados promotor para nenhum destes dois genes em humanos. É interessante observar que promotores foram identificados para *FOXC2* tanto para camundongo quanto para ratos.

Para verificar a existência de um promotor em *FOXC2* e *FOXC2-ASI*, foi usada a sequência do gene *FOXC2* com 5 kb *upstream* e 5 kb *downstream* do gene usando-se o *software* Promoter 2.0 (Knudsen, 1999). Um único possível promotor identificado por este *software* se localiza após a 3'UTR do *FOXC2* e fica cerca de 5 kb *upstream* do gene *FOXL1* (Fig. 21).

**Figura 21** - Resultados da busca de promotores no entorno de *FOXC2* usando-se o Promoter2.0

Promoter 2.0 Prediction Results		
NC_000016.10_86561829-86574728 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p13 Primary Assembly, 12900 nucleotides		
Position	Score	Likelihood
1200	0.611	Marginal prediction
2800	0.591	Marginal prediction
4000	0.631	Marginal prediction
4900	0.601	Marginal prediction
6200	0.586	Marginal prediction
7200	0.550	Marginal prediction
8700	0.744	Marginal prediction
9700	0.531	Marginal prediction
10500	0.620	Marginal prediction
11300	0.595	Marginal prediction
12000	0.578	Marginal prediction
12700	1.120	Highly likely prediction

Legenda: Observe que o único promotor identificado fica cerca de 5 kb *downstream* do gene *FOXC2*.

FONTE: Desenvolvido pela autora

O resultado da análise da região promotora através do *software* Gene2Promoter (Genomatix; [https://www.genomatix.de/online\\_help/help\\_eldorado/Gene2Promoter\\_Intro.html](https://www.genomatix.de/online_help/help_eldorado/Gene2Promoter_Intro.html)) pode ser visto na Fig. 22. Nessa figura, podemos observar que este *software* identifica uma região promotora com 1101 pb, localizada em Chr16:86566251-86567351 (GRCh38.p7). As duas mutações encontradas neste trabalho estão situadas dentre esse intervalo. Na figura 23 é mostrado o promotor na sequência do *FOXC2*.

**Figura 22** – Análise, usando o Gene2Promoter, da região promotora do gene *FOXC2*

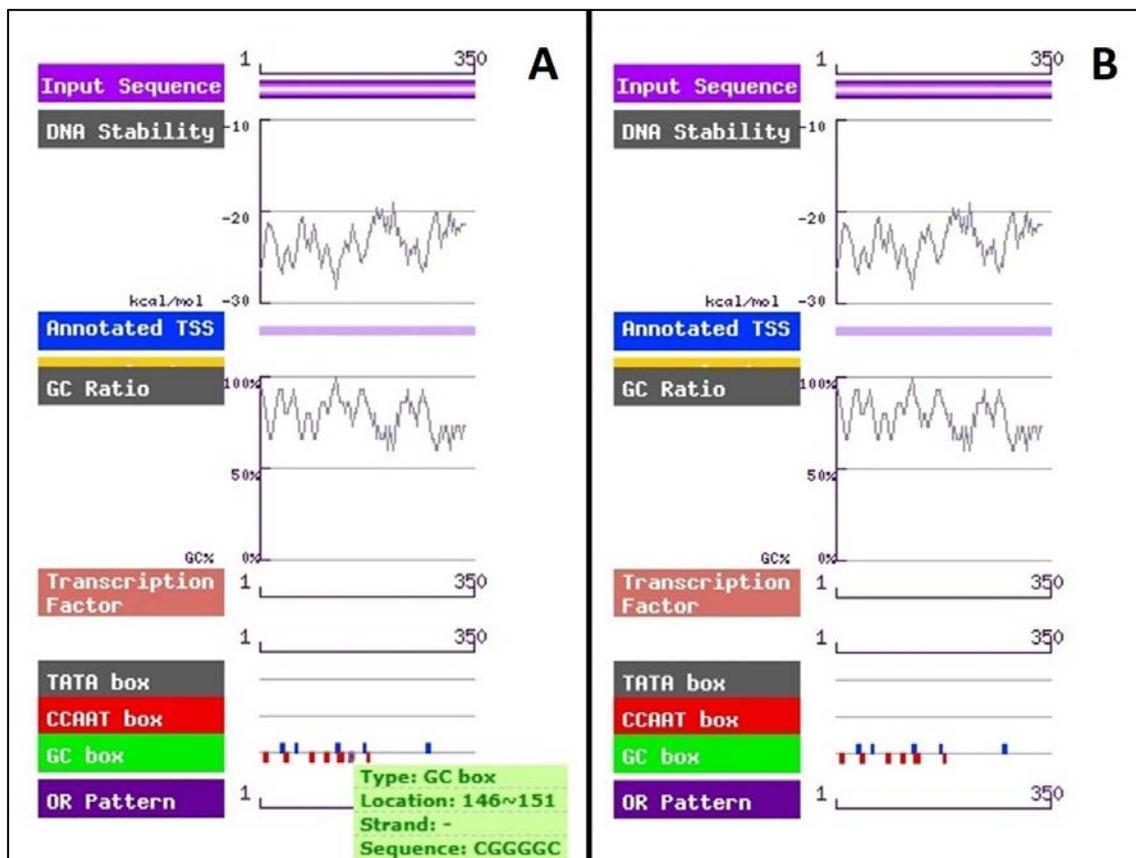
Results				
	Locus	Selection	Promoter	Transcript/TSS
2303 found on:	 <b>Homo sapiens</b> GRCh38 Chromosome 16 Contig NC_000016	<input checked="" type="checkbox"/>	GXP_107719 (+) 86566251-86567351 (1101 bp)  2 coding transcripts	<b>Legend</b> gold: experimentally verified 5' complete transcript silver: transcript with 5' end confirmed by PromoterInspector prediction bronze: annotated transcript, no confirmation for 5' completeness  GXT_2811266 (1 exon) NM_005251 (FOXC2) TSS = 1001 coding transcript 6456 CAGE tags within this transcript  GXT_22762912 (1 exon) ENST00000320354 (FOXC2) TSS = 1001 coding transcript 6456 CAGE tags within this transcript
Save promoter sequences as file: <input type="text" value="Msequences.seq"/>				

Legenda: Imagem gerada pelo Gene2Promotor onde podemos observar informações do gene *FOXC2* como dados sobre o promotor, locus e transcritos.

FONTE: Desenvolvido pela autora



**Figura 24** - Análise do impacto da mutação NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T de sítios de ligação mais comuns



Legenda: Pode-se observar na imagem A que na referência existe uma GC box, quando ocorre a mutação, observamos em B que esse GC box que existia é perdido.

Fonte: Desenvolvido pela autora

### 3.5.3. Neste estudo, existe evidência para mutações causadas pelas repetições GCCGCCGC?

Ao longo o estudo, foi analisada a qualidade do sequenciamento para a região 900-920 pb do gene *FOXC2*, que é um possível “hot spot” descrito na literatura, entretanto, nenhuma mutação foi observada. Esse “hot spot” tem sido atribuído ao elemento repetitivo de DNA as GCCGCCGC (MANSOUR, BRICE, JEFFERY; MORTIMER, 2012). Investigamos então esse elemento ao longo do sequenciamento (par de primers *FOXC2*-2) e foi observado que ele aparece quatro vezes no gene sem nenhuma mutação ao redor. O número de repetições GCCGCCGC identificadas ao sequenciamento (quatro vezes) na região 900-920 pb é igual ao da sequência normal do gene. Além disso, este elemento GCCGCCGC também aparece duas vezes na região promotora, sendo uma

dessa próxima ao NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T SNP 2. Nesta região, também não foi observada alteração.

### 3.5.4. NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T afeta sítios de ligação de fatores de transcrição?

Análises do impacto funcional da variante NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T foram realizadas através do MatInspector e indicaram, que essa mutação produz a adição de um novo sítio de ligação de fatores de transcrição, *ETS Variant Gene 4* (ETV4), que não existe na sequência de referência. Em contrapartida, o *software* indica a perda de alguns sítios de ligação de fatores de transcrição, que existem na sequência de referência: *EST Variant Gene 5* (ETV5, também conhecido como ERM – *ETS-Related Molecule*), *Zinc Finger Protein 658* (ZNF658), *Transcription factor AP-2 alpha* (TFP2A) e Negative Glucocorticoid Response Element (nGRE); os outros sítios de ligação permanecem inalterados com a mutação. As adições e perda desses sítios na presença ou não da mutação podem ser observados na Tab. 5.

**Tabela 5** - Sítios de reconhecimento de fatores de transcrição observados na presença do alelo da referência e do alelo mutado

Sítios de Ligação	Referência	Mutação
	C	T
ETV4		X
ETV5	X	
ZNF658	X	
TNP2A	X	
nGRE	X	

Legenda: O X representa a presença do gene.

FONTE: Próprio trabalho

### **3.5.5. A mutação NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T afeta um G-quadruplex?**

A região do gene FOXC2 apresenta um conteúdo GC muito alto e é muito rica em sequências de guaninas ou de citosinas. Esta mutação altera uma sequência de quatro citosinas. Em função disso, investigamos se a mutação NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T afetaria um G-quadruplex. A análise feita com o Greglist (ZHANG E ZHANG, 2008;), a fim de saber se o gene *FOXC2* possivelmente é regulado por G-quadruplexes e qual a sua localização, nos permitiu saber a presença de um G-quadruplex conforme pode ser visto na Figura 25. Esse G-quadruplex está localizado a -133 pares de base do início da tradução do gene. A mutação NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T se localiza perto desse G-quadruplex, mas não está inserida nele, como pode ser visto na Figura 26.

Figura 25 - Predição de G-quadruplexes usando o *software Greglist*

**Greglist** database of G-quadruplex regulated genes

STATISTICS RESOURCE CITATION CONTACT HELP

Search  
foxc2 GO

Home  
Blast  
Browse  
Download

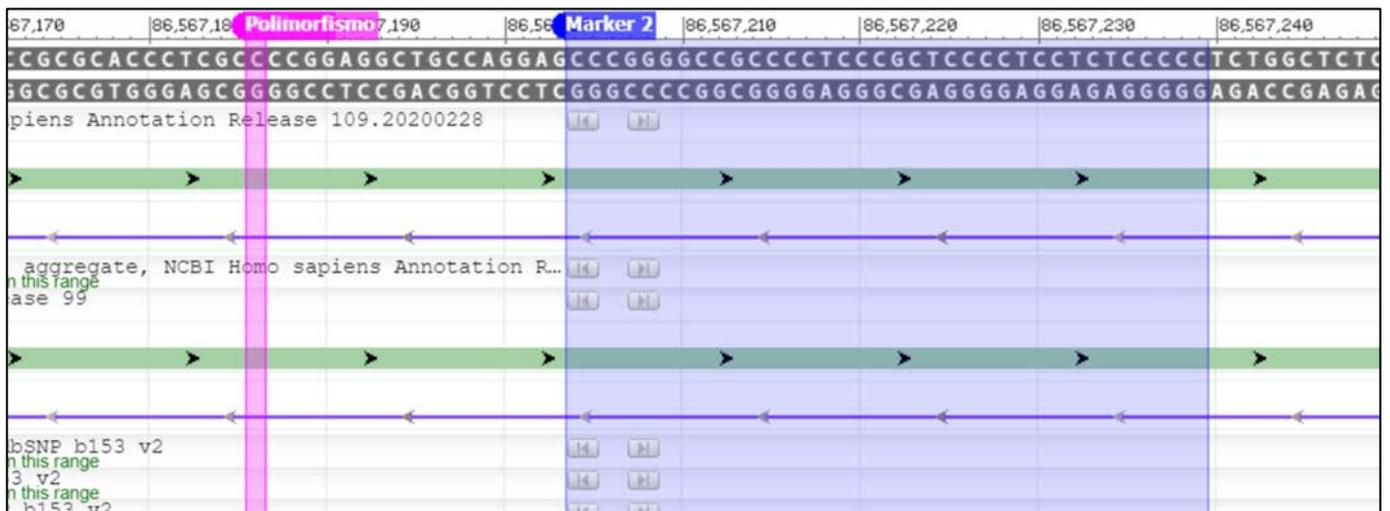
the information of the G-quadruplex regulated gene

Ensembl ID	ENSG00000176692
Organism	Homo sapiens
Gene Name	FOXC2
RefSeq ID	NM_005251
No. of G4	0
Distance to TSS	-
G4 Sequence	-
No. of G4 on complementary strand	1
Distance to TSS	133
G4 Sequence	CCCGGGGCCGCCCTCCCGCTCCCTCCTCTCCCCC
	<ul style="list-style-type: none"> <li>skeletal development</li> <li>ossification</li> <li>patterning of blood vessels</li> <li>metanephros development</li> <li>ureteric bud development</li> <li>kidney development</li> <li>lymphangiogenesis</li> <li>blood vessel remodeling</li> <li>DNA binding</li> <li>transcription factor activity</li> <li>nucleus</li> <li>transcription</li> </ul>

Legenda: Resultado obtido pelo *software* Greglist (ZHANG; ZHANG, 2008) informando a presença de um G-quadruplex que possivelmente regula o gene *FOXC2*. Podemos observar os nucleotídeos, que compõem a sequência dessa estrutura, tamanho e localização dela no gene *FOXC2*, bem como outras informações sobre o gene. Este G-quadruplex, entretanto não coincide com a mutação nova descrita aqui.

Fonte: Desenvolvido pela autora

**Figura 26** - Localização do polimorfismo em relação ao G-quadruplex



Legenda: Localização da mutação (NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T) representado em rosa e da estrutura do G-quadruplex representado em azul-arroxeadado no decorrer da 5'UTR do gene *FOXC2*. Podemos observar que o G-quadruplex e o Polimorfismo estão próximos, mas que o Polimorfismo não está inserido na sequência desse G-quadruplex.  
Fonte: Desenvolvido pela autora

A análise feita com o G4Hunter (Brázda et al., 2019), a fim de predizer os possíveis G-quadruplex ao longo gene *FOXC2* e comparar se com a mutação haveria mudanças em algum desses G-quadruplex, nos permitiu inferir que existem 24 possíveis G-quadruplex na sequência original do gene e que um deles é perdido com a mutação conforme pode ser visto na Figura 27. Entretanto, a evidência favorecendo a existência deste G-quadruplex ( $z=-1,065$ ) é menor do que o limiar proposto pelo programa ( $z=1,4$ ). Neste caso, o sinal é negativo, pois a sequência de Gs se encontra no RNAm de *FOXC2* ou na fita de DNA que codifica *FOXC2-AS1*.

**Figura 27** – Resultados da análise feita com o G4Hunter, da sequência do gene *FOXC2* e da sequência mutada

Analysis settings		Analysis results		Export CSV		Sequence info	
Window size: 25 Threshold: 1,2		Quadruplexes found: 24 Frequency: 7,9 / 1000 bp		<input type="button" value="Individual"/> <input type="button" value="Grouped"/>		FOXC2 3.054 bp GC: 1913 (62,6%)	
Position	Length	Sequence	Score chart	G4Hunter score (abs)			
55	25	Q GGGAGGGGGCGTGGCCGAGGAAAG		1,2		<input type="button" value="Kill"/>	
195	27	Q TCGGGGCTGCCGATTGCTGGGGGCTT		1,111		<input type="button" value="Kill"/>	
438	25	Q CCCGAGCGCCGCCGCCGCGCACCC		-1,24		<input type="button" value="Kill"/>	
443	31	Q GCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAG		-1,065		<input type="button" value="Kill"/>	
484	49	Q GCCCGGGGCGCCCTCCCGCTCCCTCCTCTCCCTCTGGCTCTCTC		-1,265		<input type="button" value="Kill"/>	
542	40	Q CGCTCTCAGGGCCCCCTCGCTCCCCGGCGCAGTCCGT		-1,025		<input type="button" value="Kill"/>	

Analysis settings		Analysis results		Export CSV		Sequence info	
Window size: 25 Threshold: 1,2		Quadruplexes found: 23 Frequency: 7,5 / 1000 bp		<input type="button" value="Individual"/> <input type="button" value="Grouped"/>		Polimorfismo 3.054 bp GC: 1912 (62,6%)	
Position	Length	Sequence	Score chart	G4Hunter score (abs)			
55	25	Q GGGAGGGGGCGTGGCCGAGGAAAG		1,2		<input type="button" value="Kill"/>	
195	27	Q TCGGGGCTGCCGATTGCTGGGGGCTT		1,111		<input type="button" value="Kill"/>	
438	25	Q CCCGAGCGCCGCCGCCGCGCACCC		-1,24		<input type="button" value="Kill"/>	
484	49	Q GCCCGGGGCGCCCTCCCGCTCCCTCCTCTCCCTCTGGCTCTCTC		-1,265		<input type="button" value="Kill"/>	
542	40	Q CGCTCTCAGGGCCCCCTCGCTCCCCGGCGCAGTCCGT		-1,025		<input type="button" value="Kill"/>	
629	26	Q TACTCCGTGTCCGACCCCAACGCCCT		-1,192		<input type="button" value="Kill"/>	

Legenda: Na figura, podemos observar os possíveis G-quadruplex da sequência do gene *FOXC2* (Figura A) e da sequência com a mutação NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T (Figura B). Podemos observar que na sequência do gene tem 24 possíveis G-quadruplex (quadrado vermelho figura A) enquanto na sequência mutada tem apenas 23 (quadrado vermelho figura B), mostrando assim a perda de um possível G-quadruplex (quadrado azul). Esse quadruplex que é perdido contém o polimorfismo estudado (quadrado verde), entretanto o escore deste G-quadruplex é baixo (G4Hunter score).

Fonte: Desenvolvido pela autora

## 4. DISCUSSÃO

Existem diversas mutações causadoras de LDS descritas na literatura (Tab. 1 e 2). Famílias distintas apresentam um padrão próprio de mutação, entretanto, esse padrão pode ser repetido em outras famílias. Essa heterogeneidade de mutações gera, conseqüentemente, diferentes efeitos na proteína.

Identificação da mutação, que causa LDS, não é uma tarefa fácil – devido à heterogeneidade mencionada anteriormente – exigindo assim uma investigação total do gene, bem como de sua região promotora e regiões 5'-UTR e 3'-UTR. Para isso, é necessário um eficiente sequenciamento a fim de buscar inserções, deleções, duplicações, SNPs e/ou polimorfismos. Além disso, toda possível mutação deve ser confirmada e estudada em bases de dados para garantir a veracidade do diagnóstico.

No presente estudo, foram sequenciados os amplicons obtidos usando-se mesmos primers usados por Erickson e colaboradores (2001) e, a qualidade do sequenciamento dentro do exon único foi boa. Realizou-se inspeção visual de todas sequências de todos indivíduos, entretanto não foi encontrada nenhuma alteração nesses fragmentos.

Além disso, desenvolvemos pares de primers para cobrir parte do promotor, 5'-UTR e 3'-UTR (primers FOXC2-4 e FOXC2-5). O sequenciamento direto dos produtos de PCR gerou seqüências de baixa qualidade. Inicialmente, pensamos que poderia ser explicado por uma inserção, deleção ou duplicação nesta região. Conseqüentemente, os produtos de PCR foram clonados e, posteriormente, sequenciados, apresentando após esse processo a qualidade necessária. Nenhuma INDEL foi detectada na região coberta pelo sequenciamento, sugerindo que o background detectado no sequenciamento direto seria artefato de PCR. Causas poderiam ser o alto conteúdo GC e a existência de repetições frequentes, que poderiam levar os primers a se anularem em outros lugares dentro do gene, apesar de termos tentado evitar isto, confeccionando os primers com um programa de computador (PRIMER3). Ou seja, o sequenciamento de produto de PCR destas regiões sugere repetidamente inserções, deleções e duplicações, mas estas não aparecem no sequenciamento do produto clonado.

A variante NM\_005251.3(FOXC2):c.-512C>T (rs34221221) já foi encontrado em outro estudo. Ela estava presente em todos os membros de uma família que tinha seis afetados por LDS, que também tinham doença renal (quatro dos seis afetados por LDS)

e diabetes tipo II (três dos seis afetados por LDS). Além do SNP, no qual todos os membros eram homozigóticos para o alelo T, uma outra mutação foi encontrada nos seis membros afetados, uma inserção de adenina na posição 1006 do gene *FOXC2* (GRCh38.p7). Os pesquisadores sugeriram que ambas as mutações – tanto a inserção quanto o polimorfismo – resultassem no fenótipo de LDS, da doença renal e da diabetes (YILDIRIM-TORUNER et al., 2004).

Esta mutação é um SNP já descrito (rs34221221), localizado na posição Chr16:86566824 (GRCh38.p7), e está associado a um aumento de RNAm e expressão proteica no homozigoto T/T, quando comparado ao heterozigoto e ao homozigoto C/C, além de um aumento da atividade transcricional do mutante comparado ao genótipo selvagem (SURENDRAM et al., 2014).

Esse polimorfismo, embora seja comum e funcional, também vem sendo estudado para doenças cardiovasculares (DCV). Surendram e colaboradores (2014) estudaram a presença do variante NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-512C>T em pacientes com DCV e controles, e perceberam que esse SNP estava associado ao aumento da susceptibilidade de DCV. Para chegarem a essa conclusão, eles observaram um aumento de RNAm e expressão proteica no homozigoto T/T quando comparada a do heterozigoto, e este quando comparada a do homozigoto C/C, além de um aumento da atividade transcricional do mutante comparado ao genótipo selvagem. Os resultados desse estudo sugerem que a presença do alelo T do *FOXC2* resulta em uma superexpressão do gene, principalmente em homozigose, através do aumento do RNAm e da concentração de proteína (SURENDRAM et al., 2014). Podemos observar, em nossos resultados, o padrão de heterozigose para o polimorfismo NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-512C>T nos indivíduos da família, entretanto, estudos de expressão não foram realizados para avaliar o padrão de expressão da família estudada.

O segundo polimorfismo identificado neste estudo, (NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T), causou a alteração (abolição ou criação) no sítio de reconhecimento de alguns fatores de transcrição, além da perda de um GC box. Análises de G-quadruplex foram feitas, para esse polimorfismo, e observamos a perda de um possível G-quadruplex, mas como o score dele era baixo, essa alteração foi considerada de significado incerto.

Uma outra evidência de funcionalidade vem do efeito da mutação NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T sobre o sítio de ligação de fatores de transcrição. Os

fatores de transcrição, que tiveram possíveis sítio de ligação alterados foram ETV4, ETV5, ZNF638, nGRE e TFAP2A. ETV5 foi descrito como sendo expresso exclusivamente em células de Sertoli em testículos e necessário para a autorrenovação das espermatogônias (CHEN et al., 2005). Entretanto, base de dados de expressão apontam para expressão em diversos tecidos (GTEx; GTEx Consortium, 2015). Além disto, tem sido associado à agressividade de tumores (MUS et al., 2020) ZNF658 é um regulador da transcrição dependente de zinco, que se liga a uma sequência de DNA palindrômica – e tem um duplo papel, reprimindo a expressão de genes envolvidos na homeostasia de zinco e na regulação do processamento de RNAr (OGO et al, 2015). Entretanto, não há evidência do envolvimento dos sítios de ligação ETV5 e ZNF638 com a expressão de *FOXC2*, portanto, não se pode afirmar o que as perdas desses dois sítios causem uma alteração na expressão do gene.

O TFAP2A é um fator de transcrição, que reconhece uma sequência específica para ligação de regiões do DNA ricas em CG, presente nas regiões reguladoras de vários genes, e o recrutamento da maquinaria de transcrição (WILLIAMS; TJIAN, 1991). Considerando que o *FOXC2* possui uma ilha de CpG, que se estende da região promotora até a região codificadora, e que a mutação causa perda do sítio de reconhecimento desse fator de transcrição, pode-se inferir que esta perda pode levar uma alteração na expressão desse gene, podendo até levar a uma possível diminuição da sua expressão. TFAP2A está associada a transição epitélio mesenquimal e conseqüentemente ao processo de metastatização (DIMITROVA et al., 2017). Os resultados deste estudo ainda são um pouco conflitantes. É possível que dependendo da interação com outros genes ou com tratamentos, TFAP2A possa atuar tanto estimulando quanto inibindo a transição epitélio mesenquimal.

O receptor de glicocorticóide funciona como um fator de transcrição dependente do ligante que regula a expressão de genes responsivos a glicocorticóides de forma positiva (GRE – Glucocorticoid Response Element) ou negativa (nGRE) e, cada tipo de resposta é de responsabilidade de sítios de ligação diferentes (CHARMANDARI, 2011; DOSTERT; HEINZEL, 2004). O receptor de glicocorticóide é expresso em quase todas as células do corpo e regula genes que controlam a resposta imune, o desenvolvimento e o metabolismo (HUDSON et al., 2013). É interessante observar que o nGRE identificado neste estudo se encontra na fita complementar a do *FOXC2*, ou seja, onde é codificado o *FOXC2-ASI*. Sendo assim, a ligação de glicocorticóides ao nGRE inibiria a síntese de

*FOXC2-ASI*. Um mecanismo frequente de regulação em genes, que possuem um RNA antissense é ambos os genes sejam transcritos simultaneamente, o que permitiria a formação de RNAs de dupla fita, que seriam encaminhados para degradação. Entretanto, foi demonstrado que *FOXC2-ASI* estimula a expressão de *FOXC2*. Portanto, esta hipótese permitiria prever, que a abolição deste nGRE manteria *FOXC2-ASI* e *FOXC2* ativos. Desta forma, a criança e sua mãe teriam duas mutações diferentes, que poderiam aumentar a expressão de *FOXC2*. Esta hipótese é bastante especulativa, porque nGRES são frequentes ao longo do genoma e a maioria deles provavelmente não é funcional. Também permitiria investigar a contribuição de *FOXC2-ASI* para a regulação de *FOXC2* e os mecanismos, que vinculam *FOXC2* à inflamação, é uma hipótese que merece investigação posterior. *FOXC2-ASI* apresenta expressão aumentada nas células da musculatura lisa vascular e foi sugerido que promova a proliferação celular, a migração e iniba a apoptose (WANG et al., 2020). Estes mecanismos seriam baseados no aumento de expressão de *FOXC2-ASI*, que levaria a um aumento de expressão de *FOXC2* e que este, por sua vez estimularia a via da NOTCH, que estimula a proliferação celular. (CHA et al., 2016; CHA et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Além disso, esta variação proporciona ganho do sítio de reconhecimento do fator de transcrição ETV4. Este ganho pode promover um aumento da expressão do *FOXC2*, uma vez que estudos mostraram que esse sítio de ligação pode ativar os promotores por 10 a 20 vezes de vários genes, geralmente associados a metástase e invasão de células tumorais (HIGASHINO ET AL. 1995). Considerando que *FOXC2* está associado a proliferação celular, incluindo a capacidade de metastização de células cancerosas, pode-se inferir que esse ganho de função poderia aumentar a expressão do mesmo (MANI et al., 2007). ETV4 participa de diversas vias metabólicas relacionadas às desregulações funcionais que levam ao câncer, incluindo vias da MAPK, RET, WNT/cataninas, entre outras de acordo com KEGG (Ogata et al., 1999). ETV4 tem sido relacionado não só ao risco de cânceres específicos, como também da agressividade destes cânceres (revisto por Hsing et al., 2019). É importante salientar que ETV4 e ETV5 são expressos em diversos tecidos e suas funções parecem bastante superponíveis. Desta forma, não é possível prever se a criação de um e a abolição do outro afetariam significativamente o padrão de expressão de *FOXC2*, o risco de câncer ou a agressividade dos tumores.

Tavian e colaboradores (2016) avaliaram seis pacientes com diferentes mutações em *FOXC2* descritos anteriormente (Michelini et al., 2009). Dos seis pacientes, quatro

possuíam linfedema e distiquíase. Tavian e colaboradores queriam saber quais as consequências funcionais que cada mutação causava através de um ensaio de Luciferase Reporter. Três das seis mutações estudadas apresentaram aumento da atividade transcricional, ou seja, ganho de função da proteína FOXC2, e esses pacientes tinham LDS. Com base nesse ensaio, os pesquisadores sugeriram que tanto ganho como perda de função da proteína FOXC2 podem causar LDS (TAVIAN et al., 2016).

Em síntese, NM\_005251.3(FOXC2):c.-512C>T foi associado a aumento dos níveis de expressão de FOXC2 e níveis mais altos de expressão desta proteína podem se associar à LDS (SURENDRAM et al., 2014; TAVIAN et al., 2016).

A segunda variante detectada neste estudo está sendo descrita pela primeira vez. NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T mapeia na 5'-UTR de *FOXC2*. Muitos dos estudos, que desenvolveram triagem de mutações em FOXC2 em pacientes com LDS, usaram os primers descritos por Ericson e colaboradores (2001), que cobriam apenas parte da 5'-UTR deste gene para investigar o efeito desta mutação. Para investigar o efeito desta mutação, usamos análises de Bioinformática. Uma vez que *FOXC2* não possui um promotor típico e é descrito na literatura como um gene sem promotor, buscamos inicialmente identificar este promotor. Dos *softwares* testados, apenas Gene2Promoter identificou um promotor. Trata-se de um promotor atípico, que se estende por 1101 bp e que inclui parte da 5'-UTR do gene.

Na sequência, procuramos por elementos típicos de promotor. Usando a sequência sem mutações, foi possível averiguar que este gene não tem uma TATA-box ou uma CAAT-box típica. A mutação NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T abole um GC-box.

NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T interrompe uma sequência de quatro citosinas. Consequentemente, avaliamos a hipótese de o efeito desta mutação ser mediado por mudanças na estrutura tridimensional da Cromatina, em nível de DNA, ou seja, na fita complementar do gene, ou em nível de RNA. Esta mutação abole um G-quadruplex, entretanto, o escore deste G-quadruplex, embora relativamente alto, não ultrapassa o limiar de positividade colocado pelo *software* usado. Este assunto é relativamente novo, e consideramos que esta hipótese deva ser reavaliada, a medida que se tenha mais informação sobre este tipo de elemento.

A primeira hipótese juntamente com alguns artigos da literatura sugerem que a mutação NM\_005251.3(FOXC2):c.-150C>T pode aumentar a expressão do gene

*FOXC2*, através do ganho de sítio de reconhecimento do fator de transcrição ETV4, e que esse aumento da expressão é plausível culminar em LDS. Já a segunda hipótese é a outra alteração que esta variante causaria a perda de um possível GC box, um sítio promotor importante, e a perda deste sítio pode fazer com que o *FOXC2* não seja expresso a partir deste alelo, e com a perda de função culminar na síndrome estudada.

Entretanto, a pesquisa das mutações em *FOXC2* associadas a LDS demonstradas nas tabelas 1 e 2 do presente trabalho sugere que as alterações, predominantemente substituições de um aminoácido por um stop códon ou inserção/deleção de nucleotídeos não múltiplos de três, causem alteração da proteína e não perda ou ganho de expressão do gene. E além disso, seria necessários estudos de expressão para avaliar a superexpressão ou diminuição da expressão do gene causada pelas variantes genéticas.

Uma limitação importante deste estudo foi o pequeno número de sequências obtidas através do produto de PCR do primer *FOXC2-4* ser clonado. Este fragmento inclui os códons finais e a 3'-UTR do gene. As sequências geradas a partir dos produtos de PCR não clonado dos três afetados sugere a presença de uma inserção ou de uma duplicação. Por outro lado, como se trata da 3'-UTR, uma inserção ou duplicação nesta região pode ser desprovida de significado. Além disto, não é raro encontrar-se sequências pós-PCR de baixa qualidade, portanto, a má qualidade da sequência pode não ter significado. Após a clonagem do produto da PCR gerado para a amostra da criança afetada, apenas duas sequências foram obtidas, mas estas não evidenciaram qualquer alteração, sugerindo que a sequência seja de fato normal na região.

Este estudo abre uma série de perspectivas. A mutação nova descrita aqui tem alto potencial de repercussão e deve ser investigada em estudos funcionais. Este gene apresenta dificuldades, como o alto conteúdo GC e a presença de um anti-sense, a falta de informações sobre a região promotora, muitos possíveis G-quadruplex – e a falta de informação na literatura sobre mutações fora da região codificante causando LDS, para que fosse possível compararmos com os nossos resultados. Ao longo deste estudo, nos chamou atenção a falta de informações sobre *FOXC2-ASI*. Muitas das mutações descritas na literatura também o afetam, mas seu papel no desenvolvimento da LDS não tem sido apropriadamente estudado.

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo, descrevemos a triagem de mutações no gene *FOXC2* em membros de uma família na qual está segregando a Síndrome Linfedema-Distiquiase. Nenhuma mutação foi identificada na região codificadora. Duas mutações foram identificadas neste estudo, ambas potencialmente regulatórias: NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-512C>T e NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T. Através do sequenciamento de produtos de PCR clonados, foi possível identificar que estas mutações se encontram em trans. Como ambas se encontram *upstream* ao início da tradução, buscamos identificar o promotor de *FOXC2*, que ainda não havia sido descrito na literatura ou em bases de dados. Usando G2.Promoter, foi possível identificar um promotor atípico, com 1101 pares de bases, que se estende 1000 bp acima do sítio de início da transcrição e invade a 5'-UTR. Elementos típicos de promotor (TATA-box, CAAT-box) não foram identificados, mas um GC-box, presente no alelo selvagem é abolido pela mutação NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T. Também foi previsto, que esta mutação abole um G-quadruplex, mas o escore, embora alto, não ultrapassa o limiar estabelecido pelo programa usado (G4Hunter). NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-512C>T se localiza no promotor e afeta um nucleotídeo quatro posições acima do sítio de início da transcrição. Trata-se de uma variante genética conhecida, um SNP (rs34221221), para a qual foi descrito aumento dos níveis de RNA e de proteína em pacientes com Síndrome Linfedema-Distiquiase. NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T foi descrita pela primeira vez neste trabalho. NM\_005251.3(*FOXC2*):c.-150C>T. Esta mutação também abole o sítio de reconhecimento de outros fatores de transcrição (ETV5, ZNF638, TFAP2A e nGRE) e cria um sítio (ETV4). Este conjunto de modificações sugerem que esta mutação seja patogênica, embora com base nos dados que dispomos até o momento, não seja possível responder se há aumento ou diminuição da expressão de *FOXC2*. Estas mutações afetam também o intron de *FOXC2-AS1*, mas não identificamos evidência específica de impacto funcional para este transcrito. Os achados deste estudo reforçam a necessidade de se incluir as regiões *upstream* e *downstream* dos genes nos estudos de triagem de mutações em distúrbios monogênicos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHUAU, M.; HOUDAYER, C.; TREDANO, M.; SOUPRE, V.; COUDERC, R.; VAZQUEZ, M. P. **FOXC2 truncating mutation in distichiasis, lymphedema, and cleft palate.** *In: Clinical genetics*, v. 62, n. 6, p. 470-473, 2002.
- BARTLEY, G. B.; JACKSON, I. T. **Distichiasis and Cleft Palate.** *In: Plastic and reconstructive surgery*, v. 84, n. 1, p. 129-132, 1989.
- BELL, R.; BRICE, G.; CHILD, A. H.; MURDAY, V. A.; MANSOUR, S.; SANDY, C. J.; COLLIN, J. R.; BRADY, A. F.; CALLEN, D. F.; BURNAND, K.; MORTIMER, P.; JEFFERY, S. **Analysis of lymphoedema-distichiasis families for FOXC2 mutations reveals small insertions and deletions throughout the gene.** *In: Human genetics*, v 108, n. 6, p 546-551, 2001.
- BØRRETZEN, A.; GRAVDAL, K.; HAUKAAS, S. A.; BEISLAND, C.; AKSLEN, L. A.; HALVORSEN, O. J. **FOXC2 expression and epithelial-mesenchymal phenotypes are associated with castration resistance, metastasis and survival in prostate cancer.** *In: The journal of pathology: clinical research*, v. 5, n. 4, p. 272-286, 2019.
- BRÁZDA, V., KOLOMAZNÍK, J., LÝSEK, J., BARTAS, M., FOJTA, M., ŠŤASTNÝ, J., & MERGNY, J. L. **G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction.** *Bioinformatics*, v. 35, n. 18, p. 3493-3495, 2019. (G4Hunter – <http://bioinformatics.ibp.cz:8888/#/> acessado em 20/03/2020)
- BRICE, G.; MANSOUR, S.; BELL, R.; COLLIN, J. R.; CHILD, A. H.; BRADY, A. F.; SAFARAZI, M.; BURNAND, K. G.; JEFFERY, S.; MORTIMER, P.; MURDAY, V. A. **Analysis of the phenotypic abnormalities in lymphoedema-distichiasis syndrome in 74 patients with FOXC2 mutations or linkage to 16q24.** *In: Journal of medical genetics*, v. 39, n. 7, p. 478-484, 2002.
- CEDERBERG, A.; GRØNNING, L. M.; AHRÉN, B.; TASKÉN, K.; CARLSSON, P.; ENERBÄCK, S. **FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance.** *In: Cell*, v. 106, p. 563-573, 2001.
- CHA, B.; GENG, X.; MAHAMUD M. R.; FU, J.; MUKHERJEE, A.; KIM, Y.; JHO, E.H.; KIM, T.H.; KAHN, M.L.; XIA, L.; DIXON, J. B.; CHEN, H.; SRINIVASAN, R. S.; . **Mechanotransduction activates canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling to promote lymphatic vascular patterning and the development of lymphatic and lymphovenous valves.** *Genes Dev.* 2016 Jun 15;30(12):1454-69.
- CHARMANDARI, E. **Primary generalized glucocorticoid resistance and hypersensitivity.** *In: Hormone research paediatrics*, v. 76, n. 3, p. 145-155, 2011.
- CHEN, C.; OUYANG, W.; GRIGURA, V.; ZHOU, Q.; CARNES, K.; LIM, H.; ZHAO, G. Q.; ARBER, S.; KURPIOS, N.; MURPHY, T. L.; CHENG, A. M.; HASSELL, J. A.; CHANDRASHEKAR, V.; HOFMANN, M. C.; HESS, R. A.; MURPHY, K.

- M. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche.** *In: Nature*, v. 436, n. 7053, p. 1030-1034, 2005.
- CHOO, P. H. **Distichiasis, trichiasis, and entropion: advances in management.** *In: International ophthalmology clinics*, v. 42, p. 75-87, 2002.
- CORBETT, C. R. R.; DALE, R. F.; COLTART, D. J.; KINMONTH, J. B. **Congenital heart disease in patients with primary lymphoedemas.** *In: Lymphology*, v. 15, n. 3, p. 85-90, 1982.
- DALE, R. F. **The inheritance of primary lymphoedema.** *In: Journal of medical genetics*, v. 22, n. 4, p. 274-278, 1985.
- DE BRUYN, G.; CASAER, A.; DEVOLDER, K.; VAN ACKER, G.; LOGGHE, H.; DEVRIENDT, K.; & Cornette, L. **Hydrops fetalis and pulmonary lymphangiectasia due to FOXC2 mutation: an autosomal dominant hereditary lymphedema syndrome with variable expression.** *In: European journal of pediatrics*, v. 171, n. 3, p. 447-450, 2012.
- DE NIEAR, M. A.; BREAZZANO, M. P.; MAWN, L. A. **Novel FOXC2 mutation and distichiasis in a patient with lymphedema-distichiasis syndrome.** *In: Ophthalmic plastic & reconstructive surgery*, v. 34, n. 3, p. e88-e90, 2018.
- DELLINGER, M. T.; THOME, K.; BERNAS, M. J.; ERICKSON, R. P.; WITTE, M. H. **Novel FOXC2 missense mutation identified in patient with lymphedema-distichiasis syndrome and review.** *In: Lymphology*, v. 41, n. 3, p. 98-102, 2008.
- DEN DUNNEN, JT, DALGLEISH R, MAGLOTT DR, HART RK, GREENBLATT MS, MCGOWAN-JORDAN J, ROUX AF, SMITH T, ANTONARAKIS SE, TASCHNER PE. **HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update.** *Hum Mutat.* 2016 Jun;37(6):564-9.
- DIMITROVA, Y.; GRUBER, A. J.; MITTAL, N.; GHOSH, S.; DIMITRIADES, B.; MATHOW, D.; GRANDY, W. A.; CHRISTOFORI, G.; ZAVOLAN, M. **TFAP2A is a component of the ZEB1/2 network that regulates TGFB1-induced epithelial to mesenchymal transition.** *Biol Direct.* 2017;12, 2017.
- DOSTERT, A.; HEINZEL, T. **Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action.** *In: Current pharmaceutical design*, v. 10, n. 23, p. 2807, 2004.
- DREOS R, AMBROSINI G, CAVIN PÉRIER R, BUCHER P. EPD and EPDnew, high-quality promoter resources in the next-generation sequencing era. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D157-64. doi: 10.1093/nar/gks1233. Epub 2012 Nov 27. PubMed PMID: 23193273; PubMed Central PMCID: PMC3531148. [https://epd.epfl.ch/EPDnew\\_database.php](https://epd.epfl.ch/EPDnew_database.php)). Acesso em abril de 2020.
- ERICKSON, R. P.; DAGENAIS, S. L.; CAULDER, M. S.; DOWNS, C. A.; HERMAN, G.; JONES, M. C.; KERSTJENS-FREDERIKSE, W. S.; LIDRAL, A. C.; MCDONALD, M.; NELSON, C. C.; WITTE, M.; GLOVER, T. W. **Clinical heterogeneity in lymphoedema-distichiasis with FOXC2 truncating mutations.** *In: Journal of medical genetics.* v. 38, n. 11, p. 761-766, 2001.

- FABRETTO, A.; SHARDLOW, A.; FALETRA, F.; LEPORE, L.; HLADNIK, U.; GASPARINI, P. **A case of lymphedema-distichiasis syndrome carrying a new de novo frameshift FOXC2 mutation.** *In: Ophthalmic genetics*, v. 31, n. 2, p. 98-100, 2010.
- FANG, J.; DAGENAIS, S. L.; ERICKSON, R. P.; ARLT, M. F.; GLYNN, M. W.; GORSKI, J. L.; SEAVER, L. H.; GLOVER, T. W. **Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome.** *In: The American Journal of Human Genetics*, v. 67, n. 6, p. 1382-1388, 2000.
- FAURET, A. L.; TULEJA, E.; JEUNEMAITRE, X.; VIGNES, S. **A novel missense mutation and two microrearrangements in the FOXC2 gene of three families with lymphedema-distichiasis syndrome.** *In: Lymphology*, v. 43, n. 1, p. 14-18, 2010.
- FINEGOLD, D. N.; KIMAK, M. A.; LAWRENCE, E. C.; LEVINSON, K. L.; CHERNISKE, E. M.; POBER, B. R.; DUNLAP, J. W.; FERRELL, R. E. **Truncating mutations in FOXC2 cause multiple lymphedema syndromes.** *In: Human molecular genetics*, v. 10, n. 11, p. 1185-1189, 2001.
- FOX, S. A. **Distichiasis.** *In: American journal of ophthalmology*, v. 53, n. 1, p. 14-18, 1962.
- GOLDEN, S.; DAVIS, D. M.; BREWER, J. D. **Lymphedema in a patient with distichiasis.** *In: International journal of dermatology*, v. 6, n. 53, p. 754-755, 2014.
- GRABE N. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol.* 2002;2(1):S1-15. (AliBaba2 - <http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2> acessado em 17/07/2016)
- GTEX CONSORTIUM. **Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans.** *Science*. 2015;348(6235):648-660. doi:10.1126/science.1262110. (<https://www.gtexportal.org/home/gene/ETV4>, acesso em abril 2020).
- HANNENHALLI, S.; KAESTNER, K. H. **The evolution of Fox genes and their role in development and disease.** *In: Nature reviews genetics*, v. 10, n. 4, p. 233-240, 2009.
- HE, Y.; XIE, H.; YU, P.; JIANG, S.; WEI, L. **FOXC2 promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells.** *In: Cancer chemotherapy pharmacology*, v. 82, n. 6, p. 1049-1059, 2018.
- HIGASHINO, F.; YOSHIDA, K.; NOUMI, T.; SEIKI, M.; & FUJINAGA, K. **Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters.** *In: Oncogene*, v. 10, n. 7, p. 1461-1463, 1995.
- HSING M, WANG Y, RENNIE PS, COX ME, CHERKASOV A. **ETS transcription factors as emerging drug targets in cancer.** *Med Res Rev.* Jan;40(1):413-430. doi: 10.1002/med.21575, 2020.

- HUDSON WH, YOUN C, ORTLUND EA. **The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression.** *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Jan;20(1):53-8. doi: 10.1038/nsmb.2456. Epub 2012 Dec 9. PubMed PMID: 23222642; PubMed Central PMCID: PMC3539207.
- ITOH, M.; NAKAGAWA, H. **A novel complex insertion-deletion mutation in the FOXC2 gene in a Japanese patient with Lymphedema-Distichiasis Syndrome.** *In: European journal of dermatology*, v. 23, n. 3, p. 411-413, 2013.
- JACKSON, B. C.; CARPENTER, C.; NEBERT, D. W.; VASILIOU, V. **Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families.** *In: Human genomics*, v. 4, n. 5, p. 345, 2010.
- JONES, G. E.; RICHMOND, A. K.; NAVTI, O.; MOUSA, H. A.; ABBS, S.; THOMPSON, E.; MANSOUR, S.; VASUDEVAN, P. C. **Renal anomalies and lymphedema distichiasis syndrome. A rare association?.** *In: American journal of medical genetics part A*, v. 173, n. 8, p. 2251-2256, 2017.
- KAESTNER, K. H.; BLECKMANN, S.C.; MONAGHAN, A.P, SCHLONDORFF, J.; MINCHEVA, A.; LICHTER, P.; SCHÜTZ, G. **Clustered arrangement of winged helix genes fkh-6 and MFH-1: possible implications for mesoderm development.** *In: Development*, v.122, n. 6, p. 1751-1758, 1996.
- KAESTNER, K. H.; KNÖCHEL, W.; MARTÍNEZ, D. E. **Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors.** *In: Genes & development*, v. 14, n. 2, p. 142-146, 2000.
- KNUDSEN, S. **Promoter 2.0: for the recognition of PolII promoter sequences.** *Bioinformatics* 15, 356-361. 1999
- KOCAK, Z.; OVERGAARD, J. **Risk factors of arm lymphedema in breast cancer patients.** *In: Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, v. 39, n. 3, p. 389-392, 2000.
- KUMAR, S.; CARVER, C.; MCCALL, S.; BRICE, G.; OSTERGAARD, P.; MORTIMER, P.; JEFFERY, S.; LYMPHOEDEMA CONSORTIUM. **A family with lymphoedema-distichiasis where identical twins have a discordant phenotype.** *In: Clinical genetics*, v. 71, n. 3, p. 285-287, 2007.
- LIU, N. F.; YU, Z. Y.; SUN, D.; & LOU, Y. **Rare variants in LAMA5 gene associated with FLT4 and FOXC2 mutations in primary lymphedema may contribute to severity.** *In: Lymphology*, v. 49, n. 4, p. 192-204, 2016.
- LIU, Y.; DING, J.; PENG, Y.; LIANG, Z.; YAN, N.; JIN, X.; FANG, F.; WENG, X.; PAN, Q. **Genetic variant analysis of a pedigree affected with lymphedema-distichiasis syndrome.** *In: Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi= zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Chinese journal of medical genetics*, v. 37, n. 4, p. 434-437, 2020.
- MANGION, J.; RAHMAN, N.; MANSOUR, S.; BRICE, G.; ROSBOTHAM, J.; CHILD, A.H.; MURDAY, V.A.; MORTIMER, P.S.; BARFOOT, R.; SIGURDSSON, A.; EDKINS, S.; SARFARAZI, M.; BURNAND, K.; EVANS, A.L.; NUNAN, T.O.; STRATTON, M.R.; JEFFERY, S. **A gene for lymphedema-distichiasis maps to**

- 16q24. 3.** In: The American Journal of Human Genetics, v. 65, n. 2, p. 427-432, 1999.
- MANI, S.A.; YANG, J.; BROOKS, M.; SCHWANINGER, G.; ZHOU, A.; MIURA, N.; KUTOK, J.L.; HARTWELL, K.; RICHARDSON, A.L.; WEINBERG, R.A. **Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers.** In: Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 104, n. 24, p. 10069-10074, 2007.
- MANSOUR, S.; BRICE, G. W.; JEFFERY, S.; MORTIMER, P. **Lymphedema-Distichiasis Syndrome.** In: GeneReviews [Internet], 2012.
- MARCKS P. **Lymphedema: pathogenesis, prevention, and treatment.** In: Cancer Practice, v. 5, n. 1, p. 32-38, 1997
- MCLAREN, W.; GIL, L.; HUNT, S.E; RIAT, H. S.; GRAHAM R. S. RITCHIE, G. R. S.; THORMANN, A.; PAUL FLICEK, P.; CUNNINGHAM, F. **The Ensembl Variant Effect Predictor.** Genome Biol 17, 122, 2016. (VEP Esemble - <https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html> acessado em 17/07/2016)
- MELLOR, R. H.; BRICE, G.; STANTON, A. W. B.; FRENCH, J.; SMITH, A.; JEFFERY, S.; LEVICK, J. R.; BURNAND, K. G.; MORTIMER, P. S. **Mutations in FOXC2 are strongly associated with primary valve failure in veins of the lower limb.** In: Circulation, v. 115, n. 14, p. 1912-1920, 2007.
- MICHELINI, S.; DEGIORGIO, D.; CESTARI, M.; CORDA, D.; RICCI, M.; CARDONE, M.; MANDER, A.; FAMOSO, L.; CONTINI, E.; SERRANI, R.; PINELLI, L.; CECCHIN, S.; BERTELLI, M. **Clinical and genetic study of 46 Italian patients with primary lymphedema.** In: Lymphology, v. 45, n.1, p. 3-12, 2012.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** In: Nucleic acids res, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MIURA, N., WANAKA, A., TOHYAMA, M., TANAKA, K. **MFH-1, a new member of the fork head domain family, is expressed in developing mesenchyme.** In: FEBS letters, v. 326, n. 1-3, p. 171-176, 1993.
- MIURA, N.; IIDA, K.; KAKINUMA, H.; YANG, X. L.; SUGIYAMA, T. **Isolation of the mouse (MFH-1) and human (FKHL14) mesenchyme fork head-1 genes reveals conservation of their gene and protein structures.** In: Genomics, v. 41, n. 3, p. 489-492, 1997.
- MORTIMER, P. S. **Managing lymphoedema.** In: Clinical and experimental dermatology, v. 20, n. 2, p. 98-106, 1995.
- MUS, L.M.; LAMBERTZ, I.; CLAEYS, S.; KUMPS, C.; VAN LOOCKE, W.; VAN NESTE, C.; UMAPATHY, G.; VAAPIL, M.; BARTENHAGEN, C.; LAUREYS, G.; DE WEVER, O.; BEXELL, D.; FISCHER, M.; HALLBERG, B.; SCHULTE, J.; DE WILDE, B.; DURINCK, K.; DENECKER, G.; DE PRETER, K.; SPELEMAN, F. **The ETS transcription factor ETV5 is a target of activated**

**ALK in neuroblastoma contributing to increased tumour aggressiveness.** Sci Rep 10, 218, 2020.

NISHIDA, N.; MIMORI, K.; YOKOBORI, T.; SUDO, T.; TANAKA, F.; SHIBATA, K.; ISHII, H.; DOKI, Y.; MORI, M. **FOXC2 is a novel prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma.** *In: Annals of surgical oncology*, v. 18, n. 2, p. 535-542, 2011.

O'DONNELL, B. A.; COLLIN, J. R. **Distichiasis: management with cryotherapy to the posterior lamella.** *In: British journal of ophthalmology*, v. 77, n. 5, p. 289-292, 1993.

OGATA, H., GOTO, S., SATO, K., FUJIBUCHI, W., BONO, H., KANEHISA, M. **KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic acids research**, **27(1)**, 29-34. 1999. (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>; acesso em abril de 2020).

OGO, O. A.; TYSON, J.; COCKELL, S. J.; HOWARD, A.; VALENTINE, R. A.; FORD, D. **The zinc finger protein ZNF658 regulates the transcription of genes involved in zinc homeostasis and affects ribosome biogenesis through the zinc transcriptional regulatory element.** *In: Molecular cellular biology*, v. 35, n. 6, p. 977-987, 2015.

OGURA, Y.; FUJIBAYASHI, S.; IIDA, A.; KOU, I.; NAKAJIMA, M.; OKADA, E.; TOYAMA, Y.; IWANAMI, A.; ISHII, K.; NAKAMURA, M.; MATSUMOTO, M.; IKEGAWA, S. **A novel FOXC2 mutation in spinal extradural arachnoid cyst.** *In: Human genome variation*, v. 2, n. 1, p. 1-3, 2015.

OGURA, Y.; YABUKI, S.; IIDA, A.; KOU, I.; NAKAJIMA, M.; KANO, H.; SHIINA, M.; KIKUCHI, S.; TOYAMA, Y.; OGATA, K.; NAKAMURA, M.; MATSUMOTO, M.; IKEGAWA, S. **FOXC2 mutations in familial and sporadic spinal extradural arachnoid cyst.** *In: PLoS one*, v. 8, n. 11, p. 1-6, 2013.

OVCHARENKO, I., NOBREGA, M. A., LOOTS, G. G., STUBBS, L. **ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes.** *Nucleic acids research*, 32(suppl\_2), W280-W286. 2004. (<https://ecrbrowser.dcode.org/>, acesso em abril de 2020)

PAPOFF, P.; CASTORI, M.; MANGANARO, L.; MIDULLA, F.; MORETTI, C.; CASCONI, P. **Early mandibular distraction to relieve robin severe airway obstruction in two siblings with lymphedema-distichiasis syndrome.** *In: Journal of maxillofacial and oral surgery*, v. 15 n.3, p. 384-389, 2016.

PATIL, B. B.; BELL, R.; BRICE, G.; JEFFERY, S.; & DESAI, S. P. **Distichiasis without lymphoedema?.** *In: Eye*, v. 18, n. 12, p. 1270-1272, 2004.

QUANDT K, FRECH K, KARAS H, WINGENDER E, WERNER T. **MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data.** *Nucleic Acids Res.*; 1995. ([https://www.genomatix.de/online\\_help/help\\_matinspector/matinspector\\_help.html](https://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html) acessado em 17/07/2016)

- REZAIE, T.; GHOROGHCHIAN, R.; BELL, R.; BRICE, G.; HASAN, A.; BURNAND, K.; VERNON, S.; MANSOUR, S.; MORTIMER, P.; JEFFERY, S.; CHILD, A.; SARFARAZI, M. **Primary non-syndromic lymphoedema (Meige disease) is not caused by mutations in FOXC2.** *In: European journal of human genetics*, v. 16, n. 3, p. 300-304, 2008.
- ROBINOW, M.; JOHNSON, G. F.; VERHAGEN, A. D. **Distichiasis lymphedema: a hereditary syndrome of multiple congenital defects.** *In: American Journal of diseases of children*, v. 119, n. 4, p. 343-347, 1970.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF & MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** *In: Cold spring harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.* 1989.
- SAMLASKA, C. P. **Congenital Lymphedema and Distichiasis.** *In: Pediatric dermatology*, v. 19, n. 2, p. 139-141, 2002.
- SÁNCHEZ-CARPINTERO, R.; DOMINGUEZ, P.; NÚÑEZ, M. T.; PATIÑO-GARCIA, ANA. **Spinal extradural arachnoid cysts in lymphedema-distichiasis syndrome.** *In: Genetics in medicine*, v. 12, n. 8, p. 532-535, 2010.
- SARGENT, C.; BAUER, J.; KHALIL, M.; FILMORE, P.; BERNAS, M.; WITTE, M.; PEARSON, M. P.; ERICKSON, R. P. **A five generation family with a novel mutation in FOXC2 and lymphedema worsening to hydrops in the youngest generation.** *In: American journal of human genetics*, v. 164, n. 11, p. 2802-2807, 2015.
- SARICA, M.; GORDON, K.; VAN ZANTEN, M.; HEENAN, S. D.; MORTIMER, P. S.; IRWIN, A. G.; RAMACHANDRA, V.; OSTERGAARD, P.; MANSOUR, S. **Lymphoscintigraphic abnormalities associated with milroy disease and lymphedema-distichiasis syndrome.** *In: Lymphatic research and biology*, v. 17, n. 6, p. 610-619, 2019.
- SCHWARTZ, J. F.; O'BRIEN, M. S.; HOFFMAN JR, J. S. **Hereditary spinal arachnoid cysts, distichiasis, and lymphedema.** *In: Annals of neurology: official journal of the american neurological association and the child neurology society*, v. 7, n. 4, p. 340-343, 1980.
- SHETH, T.; ATTZS, M.; & TAMBE, K. **A new perspective in oculoplastic surgical management of symptomatic distichiasis in lymphedema-distichiasis syndrome.** *In: Orbit*, v. 38, n. 5, p. 424-427, 2019.
- SHIMODA, Y.; UBUKATA, Y.; HANDA, T.; YOKOBORI, T.; WATANABE, T.; GANTUMUR, D.; HAGIWARA, K.; YAMANAKA, T.; TSUKAGOSHI, M.; IGARASHI, T.; WATANABE, A.; KUBO, N.; ARAKI, K.; HARIMOTO, N.; KATAYAMA, A.; HIKINO, T.; SANO, T.; OGATA, K.; KUWANO, H.; SHIRABE, K.; OYAMA, T. **High expression of forkhead box protein C2 is associated with aggressive phenotypes and poor prognosis in clinical hepatocellular carcinoma.** *In: BMC Cancer*, v. 18, n. 1, p. 597, 2018.
- SHOLTO-DOUGLAS-VERNON, C.; BELL, R.; BRICE, G.; MANSOUR, S.; SARFARAZI, M.; CHILD, A. H.; SMITH, A.; MELLOR, R.; BURNAND, K.; MORTIMER, P.; JEFFERY, S. **Lymphoedema-distichiasis and FOXC2:**

unreported mutations, de novo mutation estimate, families without coding mutations. *In: Human genetics*, v. 117, n. 2-3, p. 238-242, 2005.

SURENDRAN, S.; GIRIJAMMA, A.; NAIR, R.; RAMEGOWDA, K. S.; NAIR, D. H.; THULASEEDHARAN, J. V.; LAKKAPPA, R., B.; KAMALAPURKAR, G.; KARTHA, C. C. **Forkhead box C2 promoter variant c.-512C>T is associated with increased susceptibility to chronic venous diseases.** *In: PloS one*, v. 9, n. 3, p. e90682, 2014.

SUTKOWSKA, E.; GIL, J.; STEMBALSKA, A.; HILL-BATOR, A.; SZUBA, A. **Novel mutation in the FOXC2 gene in three generations of a family with lymphoedema-distichiasis syndrome.** *In: Gene*, v. 498, n. 1, p. 96-99, 2012.

TANPAIBOON, P.; KANTAPUTRA, P.; WEJATHIKUL, K.; PIYAMONGKOL, W. **c. 595-596 insC of FOXC2 underlies lymphedema, distichiasis, ptosis, ankyloglossia, and robin sequence in a Thai patient.** *In: American journal of medical genetics, part A*, v. 152, n. 3, p. 737-740, 2010.

TAVIAN, D.; MISSAGLIA, S.; MALTESE, P. E.; MICHELINI, S.; FIORENTINO, A.; RICCI, M.; SERRANI, R.; WALTER, M. A.; BERTELLI, M. **FOXC2 disease-mutations identified in lymphedema-distichiasis patients cause both loss and gain of protein function.** *In: Oncotarget*, v. 7, n. 34, p. 54228, 2016.

TRABOULSI, E. I.; AL-KHAYER, K.; MATSUMOTO, M.; KIMAK, M. A.; CROWE, S.; WILSON, S. E.; FINEGOLD, D. N.; FERRELL, R. E.; MEISLER, D. M. **Lymphedema–Distichiasis Syndrome and FOXC2 gene mutation.** *In: American journal of ophthalmology*, v. 134, n. 4, p. 592-596, 2002.

TUTEJA, G.; KAESTNER, K. H. **SnapShot: forkhead transcription factors I.** *In: Cell*, v. 130, n. 6, p. 1160.e1-1160.e2, 2007.

TUTEJA, G.; KAESTNER, K. H. **SnapShot: forkhead transcription factors II.** *In: Cell*, v. 131, n. 1, p. 192.e1, 2007.

VAN STEENSEL, M. A. M.; DAMSTRA, R. J.; HEITINK, M. V.; BLADERGROEN, R. S.; VERAART, J.; STEIJLEN P. M.; VAN GEEL, M. **Novel missense mutations in the FOXC2 gene alter transcriptional activity.** *In: Human mutation*, v. 30, n. 12, p. 1002-1009, 2009.

VREEBURG, M.; HEITINK, M. V.; DAMSTRA, R. J.; MOOG, U.; VAN GEEL, M.; VAN STEENSEL, M. A. **Lymphedema–distichiasis syndrome: a distinct type of primary lymphedema caused by mutations in the FOXC2 gene.** *In: International journal of dermatology*, v. 47, p. 52-55, 2008.

WANG, Y. W.; YIN, C. L.; ZHANG, H. Y.; HAO, J. M.; YANG, Y. Y.; LIAO, H.; JIAO, B. H. **High expression of forkhead box protein C2 is related to poor prognosis in human gliomas.** *In: Asian Pac J Cancer Prev*, v. 15, n. 24, p. 10621-5, 2014.

WANG, Y.-O. Z.-M. XU, X.-L. WANG, J.-K. ZHENG, Q. DU, J.-X. YANG, H.-C. ZHANG. **LncRNA FOXC2-AS1 regulated proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cell through targeting miR-1253/FOXF1 axis in atherosclerosis.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(6):3302-3314, 2020.

- WEIGEL, D.; JÜRGENS, G.; KÜTTNER, F.; SEIFERT, E.; JÄCKLE, H. **The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the drosophila embryo.** *In: Cell*, v. 57, n. 4, p. 645-658, 1989.
- WILLIAMS, T.; TJIAN, R. **Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2.** *In: Genes & development*, v. 5, n. 4, p. 670-682, 1991.
- YILDIRIM-TORUNER, C. SUBRAMANIAN, K.; EL MANJRA, L.; CHEN, E.; GOLDSTEIN, S.; VITALE, E. **A Novel Frameshift Mutation of FOXC2 Gene in a Family With Hereditary Lymphedema-Distichiasis Syndrome Associated With Renal Disease and Diabetes Mellitus.** *In: American journal of medical genetics part A*, v. 131, n. 3, p. 281-286, 2004.
- ZHANG, C., LI, H., & GUO, X. **FOXC2-AS1 regulates phenotypic transition, proliferation and migration of human great saphenous vein smooth muscle cells.** *Biological Research*, 52(1), 1-10, 2019
- ZHANG, L.; HE, J.; HAN, B.; LU, L.; FAN, J.; ZHANG, H. GE, S.; ZHOU, Y.; JIA, R.; FAN, X. **Novel FOXC2 mutation in hereditary distichiasis impairs DNA-binding activity and transcriptional activation.** *In: International journal of biological sciences*, v. 12, n. 9, p. 1114, 2016.
- ZHANG, R.; LIN, Y.; ZHANG, CT. **Greglist: a database listing potential G-quadruplex regulated genes.** *Nucleic acids research*, v. 36, n. suppl\_1, p. D372-D376, 2008. (Greglist – <http://tubic.org/greglist/> acessado em 20/03/2020)
- ZHU, J. L.; SONG, Y. X.; WANG, Z. N.; GAO, P.; WANG, M. X.; DONG, Y. L.; XING, C. Z.; XU, H. M. **The clinical significance of mesenchyme forkhead 1 (FoxC2) in gastric carcinoma.** *In: Histopathology*, v. 62, n. 7, p. 1038-1048, 2013.
- ZHU, L. L.; LV, Y. N.; CHEN, H. D.; GAO, X. H. **A Chinese pedigree of lymphoedema-distichiasis syndrome with a novel mutation in the FOXC2 gene.** *In: Clinical and experimental dermatology*, v. 39, n. 6, p. 731–733, 2014.