

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL PEDIATRIE**

*Conexiuni între spectrul genetic  
și tabloul clinic în  
ciliopatii*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. MIHAELA BĂLGRĂDEAN**

**Doctorand:  
INA OFELIA FOCȘA**

**2022**

## **Mulțumiri:**

Autoarea dorește să mulțumească în mod deosebit

**D-nei Dr. Erica Ellen Davis**

pentru prețiosul ajutor oferit

în testarea pacienților

incluși în acest studiu și pentru întregul suport

precum și tuturor colaboratorilor din Departamentele de Cercetare ale

Universității Duke, Durham, Carolina de Nord, Statele Unite ale Americii

Și Spitalului de Copii Ann & Robert H. Lurie, Chicago,

Statele Unite ale Americii

Mulțumiri

tuturor partenerilor din Centrele Universitare din întreaga țară

prin a căror contribuție s-au putut înrola participanții la acest studiu

Nu în ultimul rând,

Autoarea dorește să mulțumească

Pacienților și familiilor acestora pentru acordul exprimat în

participarea la studiul de față

## **Acknowledgements:**

The author wants especially to acknowledge:

### **Dr. Erica Ellen Davis, PhD**

For her valuable support in genetic testing of the patients and for entire assistance,

As well as all collaborators from

Research Departments of

Duke University, Durham, North Carolina, USA

Ann & Robert H. Lurie Children's Hospital of Chicago, USA

Acknowledgements to:

All partners from University Centers across the country whose contribution facilitated the collection of the patients

Not least, acknowledgements to:

All patients and their families who accepted to be enrolled in this research

## CUPRINS

LISTĂ CU PUBLICAȚII

LISTĂ ABREVIERI

### INTRODUCERE

## PARTEA GENERALĂ 2

<b>1. CILIOPATII</b> .....	2
1.0. GENERALITĂȚI. SCURT ISTORIC .....	2
1.1. STRUCTURA ȘI FUNCȚIA CILULUI.....	5
1.2. HETEROGENITATEA CLINICĂ ȘI IMPLICAREA ORGANICĂ .....	15
1.3. CLASIFICAREA CILIOPATIILOR.....	21
1.4. DIAGNOSTIC.....	30
1.4.1. Algoritm de diagnostic clinic.....	30
1.4.2. Genetica ciliopatiilor .....	31
<b>2. SINDROMUL BARDET BIEDL</b> .....	33
2.0. GENERALITĂȚI.....	33
2.0. 1.Istoric .....	33
2.0.2. Prevalență .....	34
2.1. TABLOU CLINIC .....	35
2.2. DIAGNOSTIC .....	36
2.2.1. <i>Consensus criteria</i> în diagnosticul clinic.....	36
2.2.2. Substratul genetic și testarea moleculară .....	38
2.2.3. Corelații genotip fenotip .....	57
2.3. DIAGNOSTIC DIFERENȚIAL .....	60
2.4. MANAGEMENT .....	63
2.5. SFAT GENETIC .....	66

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ 67

3.0. OBIECTIV .....	67
3.1. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII .....	67

3.2. PREZENTAREA CAZURILOR .....	70
3.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....	115
3.3.1. Considerente clinice.....	115
3.3.2. Considerente genetice .....	128
3.3.3. Considerente genotip fenotip .....	157
3.4. CONCLUZII .....	163
3.4.1. Contribuția proprie.....	165
3.4.2. Direcții viitoare .....	167
BIBLIOGRAFIE .....	169
ANEXE .....	190

## INTRODUCERE

Lucrarea de față își propune să abordeze un domeniu relativ recent definit a cărui evoluție explozivă în ultimii ani a dus la introducerea noțiunii de ciliopatii și la dezvoltarea conceptului de oligoalelism și transmitere ereditară trialelică. Ciliopatiile reprezintă un grup de boli cu un tablou clinic extrem de heterogen cu implicare multiorganică care au ca substrat anomalii genetice responsabile de producerea defectelor structurale sau funcționale ale cilului celular. Fiecare entitate clinică, componentă a acestei clase, în fapt este o boală rară, având incidențe cuprinse între 1: 50.000 până la 1:150.000, însă însumate acestea reprezintă o mare parte din patologia condiționată genetic. Numeroase gene, peste 200, au fost asociate în ultimii ani acestor afecțiuni datorită dezvoltării, extinderii și optimizării modalităților de testare genetică prin introducerea tehnologiei de secvențiere de ultimă generație precum și a impresionantelor progrese din domeniul experimentelor pe modele animale, biologiei celulare sau proteomicii. Alte peste 250 de gene sunt incluse pe lista de validare, fiind propuse ca și candidat pentru patogeneza ciliopatiilor.

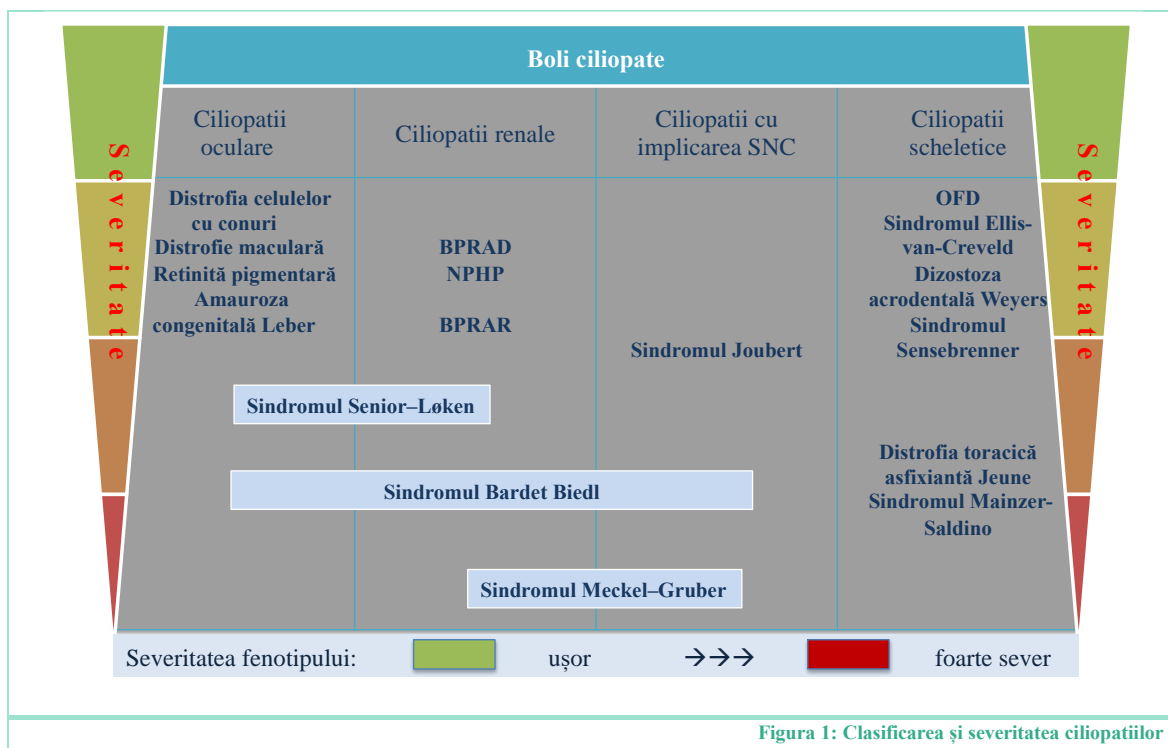
Partea generală a acestui studiu este structurată pe două mari capitole: primul capitol oferă o vedere de ansamblu asupra domeniului investigat cu prezentarea cunoașterii actuale despre cilul celular și legătura acestuia cu patologia umană, descriind structura și funcția cilului primar, background-ul și mecanismul complex genetic care caracterizează aceste afecțiuni, vasta heterogenitate clinică cu multiplele afectări organice întâlnite în rândul acestor boli, algoritmul de diagnostic clinic precum și clasificarea ciliopatiilor. Astfel, primul subcapitol face referire la un scurt istoric al parcursului cilului celular de la prima sa identificare în anul 1674, de către biologul olandez Antoni van Leeuwenhoek. Acesta, studiind o mostră de apă de ploaie cu ajutorul unui microscop rudimentar confecționat în casă, aduce primele evidențe despre protozoare și cilii pe care acestea îi foloseau pentru locomoție. Observația sa despre "*animalicules*" avea să revoluționeze lumea științifică de pretutindeni și peste secole. [1] Pe parcursul timpului și odată cu a progresul tehnicilor de microscopie s-au identificat diversele structuri componente ale micuțelor organite și s-au detectat gene a căror haploinsuficiență a fost asociată cu diverse patologii prin intermediul studierii părților componente ciliare. [2, 3] Anii 2000 marchează „epoca de aur” a studiului cilului primar și a patologiei legate de acesta, în scurt timp fiind asociate mai multe boli cu minusculul organit printre care: boala polichistică renală, nefronoftizia, retinita pigmentară sau sindromul Bardet Biedl (SBB). [4, 5]

Primele evidențe care au făcut legătura între cilul imotil și patologia umană au fost publicate în 2002 și au demonstrat localizarea intraciliară a *policistinei 2* și implicarea sa în apariția bolii polichistice renale. [6] Subsecvent acestei constatări, cilul a căpătat o atenție deosebită fiind subiectul multor studii care au redefinit și revoluționat acest domeniu.

Al doilea subcapitol face o paralelă între structura asemănătoare a cilului primar (imotil) și cea a cilului motil, constând într-un schelet microtubular, denumit axonemă, înconjurat de citoplasmă și acoperit de o prelungire a membranei celulare – membrana ciliară, la baza căreia, un centriol specializat, denumit corpul bazal, ajută la ancorarea cilului de corpul celular. [7] Este evidențiat aparatul implicat în motilitate, care face diferența între cele două tipuri de cili, reprezentat de o pereche centrală de microtubuli conectată prin intermediul fasciculelor radiale la microtubulii periferici și stabilizată de punți de nexină și dineină (tipul 9+2). [8] O atenție deosebită este acordată în acest subcapitol funcției complexe a cilului primar, funcție care a fost subapreciată vreme de secole fiind considerat „rudimentar, cu o existență tranzitorie și cu o funcție încă necunoscută”. [9] Sunt prezentate multitudinea de procese celulare care implică participarea cilului primar, poziționându-l astfel în centrul evenimentelor care intervin în embriogeneză și în asigurarea homeostaziei celulare postnatal [10], începând cu procesul înalt specializat de transport bidirecțional al complexelor proteice la nivelul compartimentului ciliar – transportul intraflagelar [11], și tratând pe rând toate căile de semnalizare care traversează organitul: calea de semnalizare *Hedgehog (HH)*, calea de semnalizare *Wingless (Wnt)*, calea de semnalizare *Notch*, calea de semnalizare prin receptori ai tirozinkinazei (*RTK*), calea de semnalizare dependentă de receptorii pentru proteinele matricei extracelulare (*ECM*), calea de semnalizare dependentă de canale potențiale ale receptorilor tranzitorii (*TRP*), calea de semnalizare prin receptori cuplați cu proteine G heterotrimerice (*GPCR*), calea de semnalizare prin receptorii factorului transformat beta (*TGFβ*), calea de semnalizare *mTOR (the mammalian target of rapamycin)*, calea de semnalizare *Salvador-Warts-Hippo (SWH)*, calea de semnalizare dependentă de factorul neurotrofic derivat cerebral: *BDNF (brain derived neurotrophic factor)*, calea de semnalizare a *policistinei*, *serotoninei*, *somatostatinei*, *vasopresinei*, *melaninei*. [12-16]

În continuare este evidențiată heterogenitatea clinică și implicarea organică, prin prezentarea aspectelor histopatologice, imagistice și clinice care caracterizează majoritatea

ciliopatiilor, pornind de la un nucleu comun de simptome ce include afectare oculară, renală, a sistemului nervos central (SNC) sau a sistemului scheletic. [17-22] Acest nucleu principal este asociat cu alte semne și simptome ce pot afecta aproape orice organ sau sistem (prezentate după analizarea bazei de date Online Mendelian Inheritance in Man – OMIM: <https://omim.org/>). Severitatea ciliopatiilor este foarte variabilă de la un fenotip ușor până la unul foarte sever, incompatibil cu supraviețuirea. De asemenea, implicarea organică este la fel de variabilă, pornind de la afectarea unui singur organ, cum este cazul distrofiilor retiniene sau a nefronoftiziei și a bolii polichistice renale autozomal dominantă sau autozomal recesivă, până la ciliopatii cu un tablou clinic complex, cu afectare multiorganică care, ținând cont de gradul în care un organ este mai afectat în definirea fenotipului, pot fi grosier împărțite în câteva categorii: (Figura 1) [23]



**Ciliopatii oculare** (retiniene) care includ sindromul Alström (SA) caracterizat de degenerescență retiniană progresivă, surditate neurosenzorială, obezitate și diabet zaharat (DZ) și, la granița cu ciliopatiile renale, sindromul Senior Loken (SSL) definit de distrofie retiniană și nefronoftizis. [24] Această categorie este cauzată de morfogeneza defectuoasă sau disfuncția unor cili specializați din retină care constituie segmentul exterior al fotoreceptorilor. Proteine, precum rodopsina, sunt transportate de-a lungul acestor cili primari specializați cu ajutorul particulelor TIF. De aceea, deficite ale complexului TIF



conduc la acumularea rodopsinei la nivelul segmentului exterior al fotoreceptorilor declanșând apoptoza acestora care se traduce fenotipic ca degenerescență retiniană. [24, 25]

**Ciliopatii renale** cuprind SBB și, făcând trecerea către ciliopatiile cu afectarea SNC, sindromul Meckel-Gruber (SMG). [26, 27] La nivel renal, ciliile primare sunt atașate epitelului ce căptușește nefronii și tubii colectorii ductali, funcționând ca senzori pentru compoziția chimică, osmolaritate sau fluxul urinar. Scăderea intracelulară a calciului, mediată de fluxul urinar, se soldează cu funcționarea deficitară a unor căi de semnalizare cum ar fi: semnalizarea prin *proteine G*, semnalizarea *mTOR* sau *Wnt* și constituie mecanismul patofiziologic de formare al chisturilor renale. De asemenea, un alt mecanism patologic este dezechilibrul dintre cele două componente ale semnalizării *Wnt*: canonică și non-canonică prin afectarea polarității celulelor epiteliale tubulare. [28]

**Ciliopatii cu afectarea SNC** includ sindromul Joubert (SJ) și grupul sindroamelor asociate cu sindromul Joubert denumite generic sindroame Joubert-like. Acestea sunt clasificate astfel: SJ clasic caracterizat prin hipotonie, întârziere neuromotorie, apraxie oculară, anomalii respiratorii, ataxie și dizabilitate intelectuală; SJ asociat cu anomalii oculare incluzând distrofie retiniană sau ACL; SJ asociat cu nefronoftizie; SJ asociat cu anomalii oculo-renale incluzând sindromul cerebello-oculo-renal, (SCOR) caracterizat de distrofie retiniană, nefronoftizis și semnul molarului și sindromul Dakaban-Arima (sindromul cerebro-oculo-hepato-renal\_SCOHR) definit de coloboma corioretinală, distrofie retiniană, BPR, fibroză hepatică și semnul molarului; SJ asociat cu fibroză hepatică și inconstant cu coloboma cunoscut sub denumirea de sindromul COACH, SJ asociat cu defecte orofaciodigitale cum ar fi: limbă bifidă sau lobulată, hamartoma, despicătură labiopalatină, polidactilie, numit și sindromul orofaciodigital tip VI. [29, 30]

Cascada *Wnt* este principala cale de semnalizare implicată în dezvoltarea cerebelară, prin urmare, defecte la nivelul acesteia pot conduce la hipoplazia vermisului, una din componentele semnelui molarului. Pe lângă *Wnt* o serie de alte căi de semnalizare cili-dependente sunt implicate în dezvoltarea neurală reglând proliferarea, migrarea și diferențierea neuronală, cum ar fi: *Sonic hedgehog (SHH)*, *PDGFRα* sau *GPCR*. Ca atare, proasta funcționare a oricăreia dintre aceste cascade poate avea diverse repercusiuni asupra dezvoltării normale a creierului cu apariția malformațiilor corticale sau a defectelor de tub neural. [31, 32]

Mecanismul de apariție al anomaliilor SNC este complex și diferit în cazul SMG față de restul ciliopatiilor SNC. În cazul fenotipului Meckel Gruber, asociat cu pierderea cililor și dorsalizarea tubului neural caudal, s-a înregistrat suprimarea semnalizării *SHH* și

stimularea cascadei *Wnt/  $\beta$  catenină*, în timp ce în cazul fenotipului Joubert, defectele structurale ale cililor se soldează cu ventralizarea tubului neural median și cu dezechilibrarea căilor de semnalizare *SHH* și *Wnt*, respectiv diminuarea semnalizării *Wnt/  $\beta$  catenină* și stimularea semnalizărilor *SHH* și a căii *non-canonice Wnt*. [33]

**Ciliopatii scheletale** cuprind două subcategorii distincte: primul subgrup, cu implicare scheletală majoră craniofacială, toracică și a oaselor lungi, cunoscut sub denumirea de *displazii toracice cu sau fără polidactilie sau condrodisplazii ciliare*, care include: displazia condroectodermală (sindromul Ellis-van-Creveld\_SEVC), dizostoza acrodentală Weyers (DAW), displazia cranioectodermală (DCE\_sindromul Sensebrenner, distrofia toracică asfixiantă Jeune (DTAJ), sindromul conorenal sau Mainzer-Saldino (SCR), sindromul Saldino-Noonan/ Verma-Naumoff (SSN), sindromul Majewski (SM), sindromul Breemer-Langer (SBL), și cel de al doilea subgrup *sindroamele orofacioidigitale* (SOFD) cu implicare scheletală minoră. [34, 35] Dezvoltarea oaselor și cartilagiilor este un proces complex, modulată în principal de *TIF* și semnalizarea *HH*. Deficiența căii de semnalizare *IHH* (*Indian Hedgehog*) la nivelul cililor primari din condrocite afectează maturarea acestora pe parcursul procesului de osificare. Prin urmare, pot apărea diverse anomalii scheletale cum ar fi polidactilia, scurtarea coastelor sau a oaselor lungi, defecte craniofaciale. [36, 37]

Următorul subcapitol abordează algoritmul de diagnostic clinic și confirmarea moleculară a acestuia. Datorită unui număr foarte mare de semne clinice care se suprapun de la o boală la alta, precum și datorită heterogenității genetice și mecanismului genetic complex care caracterizează această clasă de boli, diagnosticul nu este întotdeauna ușor de realizat. Astfel, Beales et al. a propus stabilirea diagnosticului clinic plecând de la trei semne principale: polidactilia, degenerescența retiniană și/ sau afectarea renală. Adăugând anomalii scheletale la acest nucleu de manifestări clinice diagnosticul poate fi ușor intuit, conducându-ne către displaziile scheletale. Pe lângă aceasta, dacă există asociate și unele anomalii ectodermale atunci diagnosticul este sugestiv pentru SOFD sau DCE. În lipsa anomaliilor ectodermale diagnosticul este orientat către una dintre DT, cu sau fără polidactilie. În cazul în care, pe lângă nucleul specific de manifestări clinice, este identificat semnul molarului sau altă anomalie a SNC, diagnosticul suspiciat ar trebui să fie una dintre ciliopatiile cu afectare SNC, în timp ce prezența obezității sugerează diagnosticul de SBB sau SA. [38] Substratul genetic al ciliopatiilor este extrem de complex, cu peste 200 de gene asociate cu patogeneza acestora, dintre care peste 150 sunt implicate în producerea ciliopatiilor primare. Mai mult, alte peste 250 gene, a căror produși de transcripție s-a demonstrat a fi asociați cu structura sau funcția ciliară, sunt propuse ca și candidat pentru

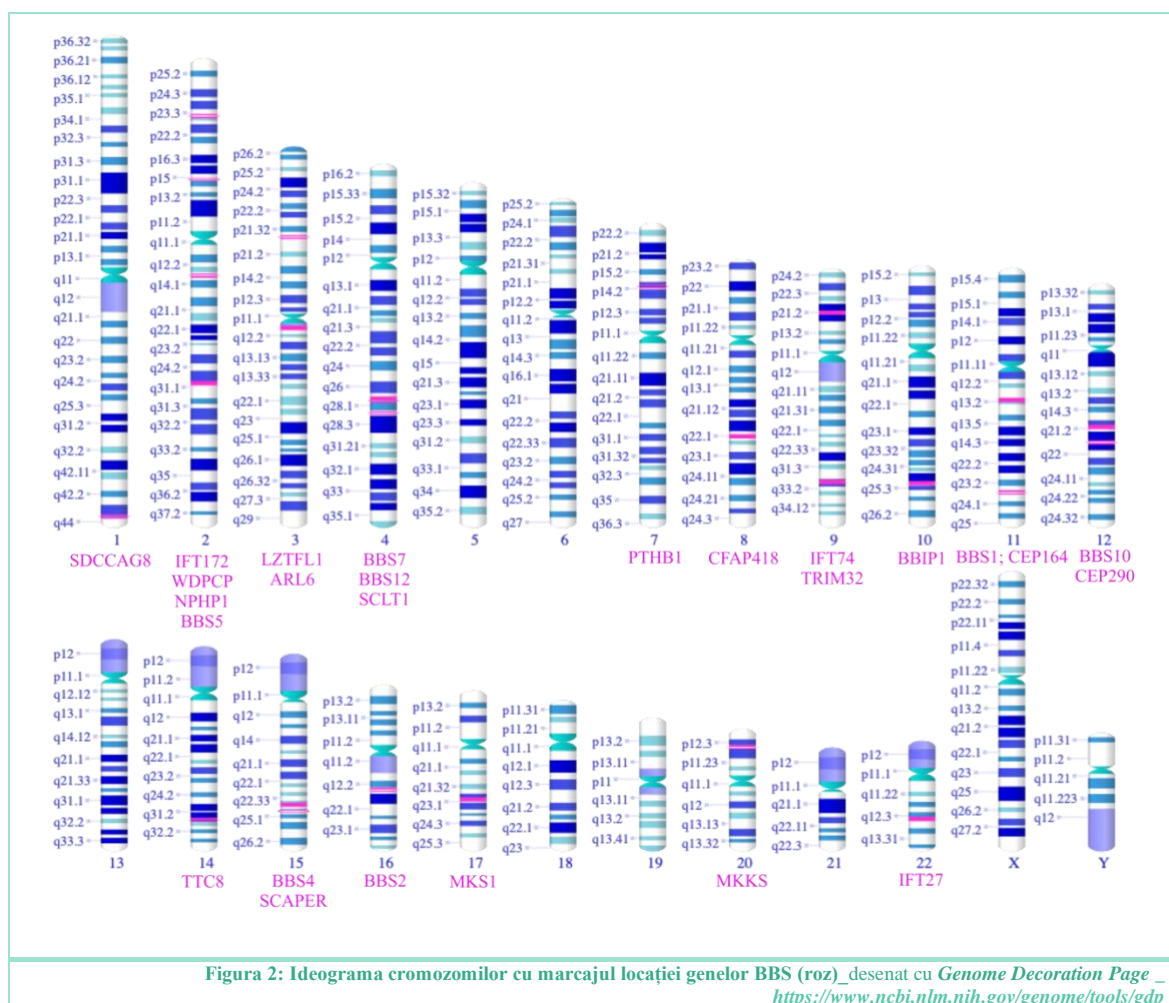
producerea bolilor ciliopate. [39] Deși ciliopatiile sunt considerate boli cu transmitere Mendeleiană iar majoritatea pot fi moștenite într-o manieră autozomal recesivă [40], există nenumărate dovezi care susțin caracterul non-Medeleian al acestei categorii de sindroame. Pe lângă modelul oligogenic de transmitere atribuit majorității genelor implicate în patogeneza acestora, [41, 42] au fost descrise mai multe mecanisme genetice care contribuie la conturarea fenotipului și la severitatea simptomatologiei precum și la enorma variabilitate, atât interfamilială cât și intrafamilială: heterogenitatea de locus, variația numărului de copii (*copy number variants: CNVs*), epistazia genică sau alelismul multiplu. [43-47] Evidențe recente au abordat mecanisme mai puțin studiate care, se pare, că sunt esențiale în apariția variabilității fenotipului incluzând: mutageneza retrotranspozon- dependentă, modificatori epigenetici și matisarea alternativă anormală. [48-50] În plus, s-a accentuat intervenția tipului de mutație genică (ex. *non-sens, frameshift*) și efectele sale asupra expresiei (ex. mutație hipomorfică) cu modificări ale produsului proteic atât cantitative, structurale cât și funcționale. [51]

În al doilea capitol al lucrării a fost aleasă ca exemplificare una din bolile care a fost de-a lungul timpului cea mai studiată, fiind considerată ca un model pentru întreaga clasă a ciliopatiilor și anume ***sindromul Bardet-Biedl***. [52] Este trecut în revistă un scurt istoric, de la prima descriere, în 1866 de către John Laurence și Robert Moon, la referirile de peste câteva decenii a celor doi medici a căror nume definesc sindromul, George Bardet și Arthur Biedl, ultimul fiind născut pe teritoriul României, în satul Comloșul Mic de lângă Timișoara. În 1925, Solis-Cohen și Weiss consideră că tabloul clinic se suprapune în cazul celor trei studii, redenumind boala ca Sindromul Laurence-Moon-Biedl. După 1980 boala a fost din nou revizuită fiind împărțită în cele două sindroame Bardet-Biedl și Laurence-Moon. [53-55]

Fiind o boală rară, care se întâlnește în proporție de aproximativ 1:100.000 în populația europeană, este analizată prevalența acesteia și în alte populații. [56-58] Sunt evidențiate principalele manifestări clinice, considerate criterii primare de diagnostic: distrofia retiniană, obezitatea, polidactilia, anomaliile renale, hipogonadismul sau anomaliile genitale și deficitul cognitiv. [59-61] Pe lângă acestea, au fost descrise o serie de manifestări considerate criterii secundare: întârziere în dezvoltarea vorbirii, întârziere în dezvoltarea psihomotorie, ataxia/ lipsa coordonării, tulburări de comportament, epilepsie, brahidactilie/ sindactilie, boală cardiacă congenitală (BCC), afectare hepatică, hipotiroidism, diabet zaharat (DZ) tip II, anosmia / hiposmia, anomalii dentare, boală hirsprung, boală celiacă/ boală inflamatorie intestinală. [62-64] De asemenea, a fost prezentat algoritmul de stabilire

a diagnosticului clinic, care necesită prezența a patru criterii primare sau asocierea a trei criterii primare cu două secundare. [65]

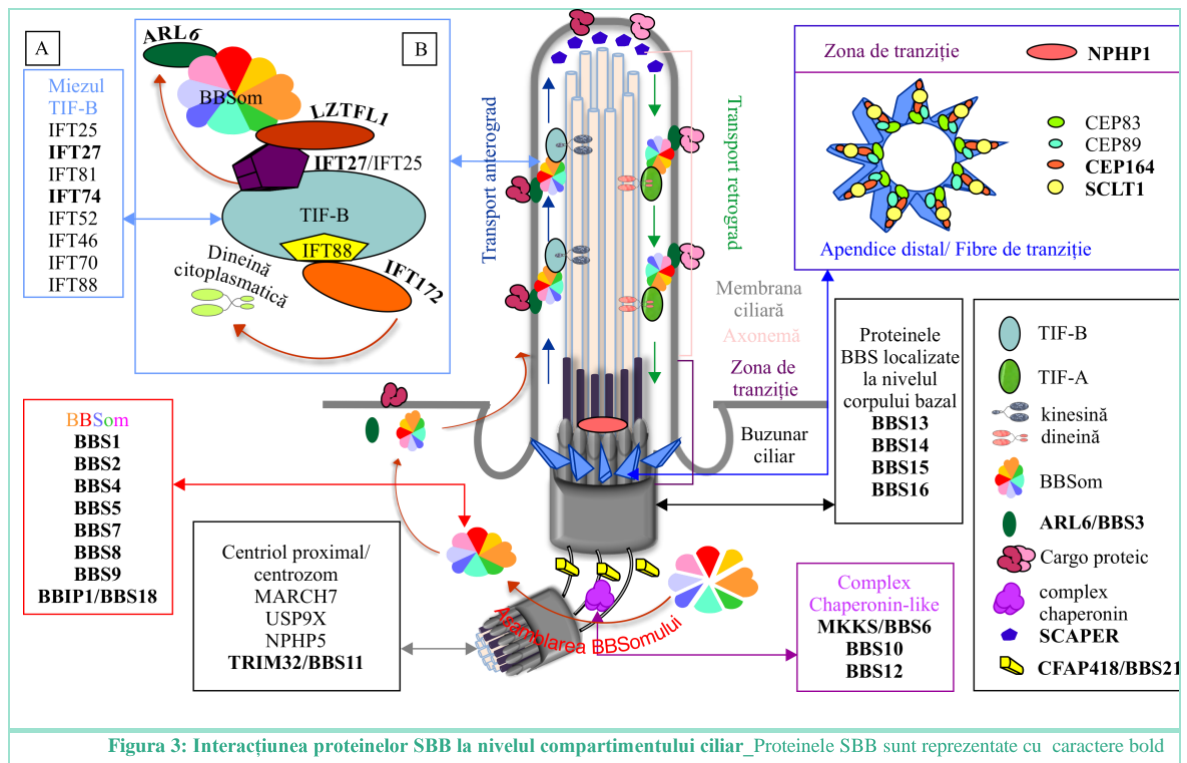
În continuare au fost expuse cele 26 de gene asociate, până în prezent, cu patogeneza SBB, respectiv *BBS1*, *BBS2*, *ARL6*, *BBS4*, *BBS5*, *MKKS*, *BBS7*, *TTC8*, *PTHB1*, *BBS10*, *TRIM32*, *BBS12*, *MKS1*, *CEP290*, *WDPCP*, *SDCCAG8*, *LZTFL1*, *BBIP1*, *ITF27*, *IFT74*, *CFAP418*, *NPHP1*, *IFT172*, *SCAPER*, *SCLT1* și *CEP164*, fiind analizată poziționarea lor cromozomială (Figura 2), localizarea ciliară a produșilor lor proteici, interacțiunea (Figura 3)



și funcția acestora în interiorul compartimentului ciliar [66-75] precum și variantele patologice raportate la momentul actual în „The Human Gene Mutation Database”: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php>, tipul acestora și alte fenotipuri asociate cu genele SBB.

Următorul subcapitol tratează un subiect care este probabil cea mai mare provocare pentru studiul acestui domeniu, și anume relația genotip fenotip. Există câteva corelații între genele SBB și tabloul clinic pentru genele mai frecvent raportate, respectiv *BBS1*, *BBS2*,

*BBS4, BBS8, BBS6, BBS10, BBS12* deși, chiar și în rândul acestor pacienți există o mare variabilitate clinică datorată mecanismului genetic complex de producere sau a numărului limitat de pacienți care poartă exact același tip de variantă patogenă. De asemenea, dificultatea urmăririi pe termen lung și obținerea unui tablou clinic complet datorită extremei heterogenității clinice și a vârstei variate de debut a simptomelor, complică investigarea relației dintre prezentarea clinică și substratul genetic. [76-80]



Prezentări clinice asemănătoare cu SBB sunt caracteristice sindroamelor McKusick-Kaufman, Alström, Cohen, Simpson-Golabi-Behmel, Prader-Willi sau Laurence Moon și fac subiectul diagnosticului diferențial, detaliat în următorul subcapitol. [81-86]

Managementul SBB, descris în continuare, necesită o abordare multidisciplinară și este concentrat pe ameliorarea simptomelor precum și pe anticiparea și screening-ul periodic al comorbidităților. Astfel, stabilirea unui program de exerciții fizice, corelat cu restricția calorică, este importantă în limitarea creșterii în greutate; integrarea precoce într-un program de educare pentru nevăzători, înainte de pierderea totală a vederii, este esențială pentru integrarea în societate și creșterea calității vieții; tratarea din primele stadii a disfuncției renale printr-o dietă adecvată și limitarea comorbidităților prin tratarea HTA, DZ sau a sindromului metabolic poate încetini progresia deteriorării; apoi, instaurarea dializei în stadiile avansate sau transplantul renal trebuie luate în considerare. [87]

Pe lângă aceste măsuri menite să îmbunătățească calitatea vieții pacienților cu SBB, în acest subcapitol au fost evidențiate și progresele recente făcute în cercetare, studiile clinice care se află în derulare cu diverse molecule ce țintesc căile de semnalizare și receptorii acestora ciliari, cum ar fi inhibitorii de melanocortină în limitarea obezității, antagoniștii receptorilor de vasopresină R2, inhibitorii *mTOR* și inhibitorii de tirozin kinază în îmbunătățirea fenotipului renal. [88] Medicina personalizată în tratarea pacienților SBB este încă în stadii puțin avansate, însă studii incluzând: terapia de înlocuire sau editare genică, terapia de corectare a *spliceing*-ului aberant cu inactivarea acestuia și terapia „*exon-skipping*” de substituție a unui exon folosind oligonucleotide antisens sau molecule de microARN, pe lângă terapia care vizează corectarea variantelor patogene *non-sense*, așa numita terapie „*read-through*” cu rezultate promițătoare *in vivo*, deschid noi orizonturi în abordarea terapeutică viitoare a pacienților SBB. [89-92]

În ultimul subcapitol al părții generale este abordat sfatul genetic cu sublinierea riscului de transmitere a bolii și posibilități de diagnostic genetic prenatal. [64, 93]

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### **Obiectiv**

Principalul obiectiv al studiului a fost acela de a realiza o analiză la nivel național a pacienților cu SBB și a inclus identificarea pacienților care întrunesc criteriile clinice de SBB, analiza istoricului personal și familial, reprezentarea arborelui genealogic, examinarea tabloului clinic, efectuarea testelor genetice și compararea rezultatelor cu datele raportate în literatura de specialitate.

### **Metodologie**

Pacienții au fost recrutați din majoritatea Centrelor Universitare din țară cu sprijinul colaboratorilor din Departamentele de Genetică, Pediatrie, Nefrologie Pediatrică, Neurologie Pediatrică. Pacienților selectați și aparținătorilor acestora li s-a solicitat acordul pentru participarea la studiu, au fost informați despre desfășurarea protocolului de lucru și s-a semnat consimțământului informat.

Au fost incluși în studiu pacienții care au îndeplinit algoritmul de diagnostic clinic, conform consensus criteria propus de Beales et al, 2009 (Tabelul 1). Nu au existat criterii de excludere.

Probele biologice, respectiv sânge venos periferic, au fost folosite pentru extragerea ADN-ului cu ajutorul kit-urilor speciale de extracție, conform protocoalelor standard. ADN-ul a fost utilizat pentru efectuarea testelor genetice, respectiv identificarea mutațiilor comune, urmată de secvențiere de ultimă generație, realizate în Centrul Experimental de Modelare a Bolilor Umane din cadrul Universității Duke, Durham, Statele Unite ale Americii, respectiv în Centrul de Cercetare pentru Medicină Translațională și Genomică din cadrul Institutului de cercetare Stanley Manne, Spitalul de Copii Ann & Robert H. Lurie, Chicago, Statele Unite ale Americii. Toate rezultatele obținute au fost confirmate prin secvențiere țintită Sanger.

*Tabelul Nr.1: Criterii de includere în studiu conform algoritmului de diagnostic [65]*

<i>Criterii primare</i>	<i>Criterii secundare</i>	<i>Diagnostic</i>
Distrofie retiniana	Întârziere în dezvoltarea vorbirii	
Polidactilie	Întârziere în dezvoltarea	
Obezitate	psihomotorie	
Anomalii genitale	Ataxia/ Lipsa coordonarii	
Anomalii renale	Tulburări de comportament	
Deficit cognitiv	Epilepsie	<i>4</i>
	Brahidactilie/ sindactilie	<i>criterii</i>
	Boală cardiacă congenitală	<i>primare</i>
	Afectare hepatică	
	Sindrom metabolic	<i>sau</i>
	Hipotiroidism	
	DZ II	<i>3 criterii primare plus 2</i>
	Anosmia / hiposmia	<i>secundare</i>
	Anomalii dentare	
	Dismorfism craniofacial	
	Boală Hirsprung	
	Boală celiacă/ Boală	
	inflamatorie intestinală	

### **Prezentarea cazurilor**

Au fost selectați un număr de 25 de pacienți, 9 de sex masculin și 16 de sex feminin, printre aceștia fiind incluși și doi frați, băiat și fată. Un alt caz provine dintr-o familie cu două surori afectate, sora mai mică fiind însă decedată la momentul începerii studiului. 4 dintre cazurile studiate provin din familii consangvine. Vârsta pacienților la momentul includerii în studiu a variat de la 2 luni la 43 de ani, 76% dintre aceștia având vârste până în

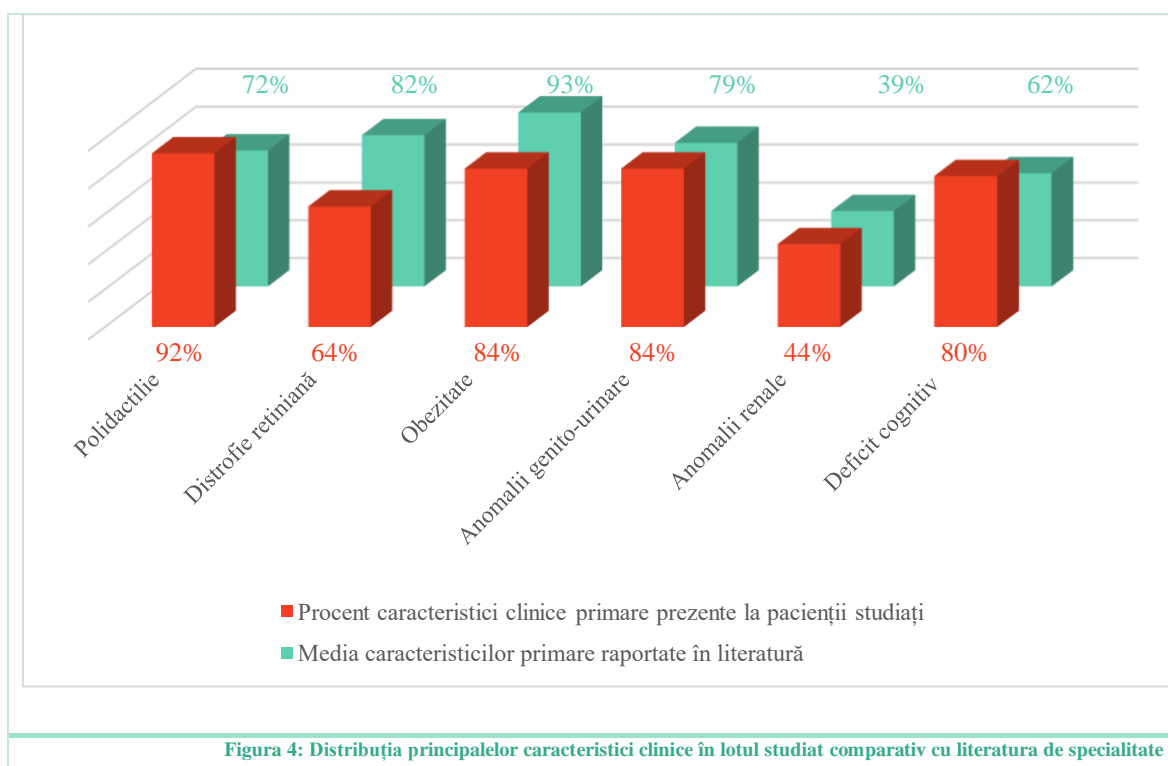


18 ani. 8% au avut vârste sub un an, majoritatea (40%) au avut vârsta sub 10 ani, 28% au avut vârste între 10 și 18 ani, 8% între 30 și 40 de ani și restul de 4% au fost peste 40 de ani.

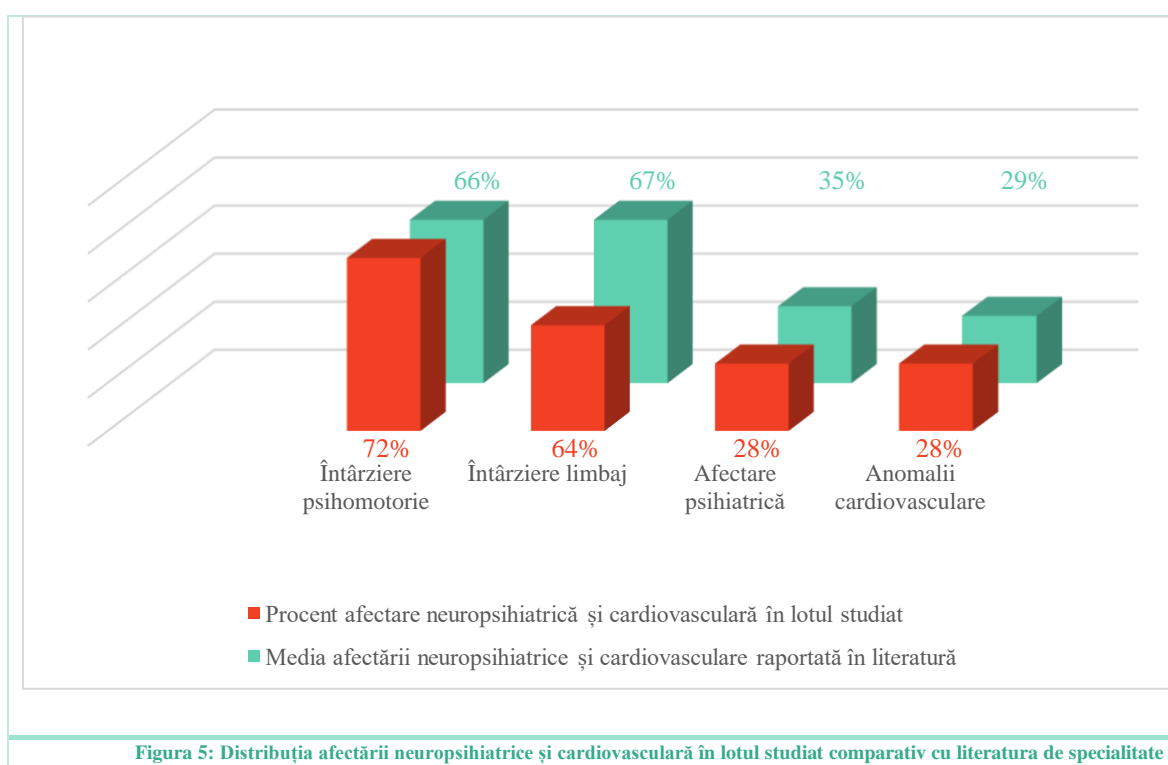
Vârsta de diagnostic clinic a pacienților studiați a variat, în cazul majorității suspiciunea s-a ridicat în primul an de viață, ceea ce este cu mult mai devreme decât vârsta medie de diagnostic estimată în literatura de specialitate, 5-10 ani, vârstă care coincide cu apariția simptomelor retinopatiei pigmentare. [65, 94] Există cazuri în literatură care menționează, totuși, posibilitatea diagnosticării mai timpurii. Astfel, diagnosticul de SBB poate fi suspectat chiar și în cazul unui fetus sau nou născut odată cu identificarea polidactiliei, a malformațiilor genito-urinare și renale. [95, 96] În cazul pacienților introduși în studiu, suspiciunea de SBB a fost ridicată antenatal la un pacient și imediat post partum la doi pacienți. Au fost și două cazuri în care diagnosticul clinic a fost stabilit mai târziu, la 11 ani, respectiv 12 ani.

Criteriile majore de includere în studiu au fost prezente în rândul pacienților din lotul studiat astfel (Figura 4): polidactilia a fost prezentă la 23 de pacienți (92%), fiind implicate toate membrele în 13 cazuri (52%), fiind prezentă doar la membrele superioare în 1 caz (4%), doar la membrele inferioare în 4 cazuri (16%), 1 caz prezentând polidactilie unilaterală membre superioare și bilaterală membre inferioare (4%), 1 caz (4%) prezentând polidactilie bilaterală membre superioare și unilaterală membre inferioare iar 3 cazuri (12%) prezentând polidactilie unilaterală (stânga) membre superioare și inferioare. Polidactilia este prezentă într-o proporție mai mare în cohorta noastră comparativ cu literatura, 92% față de 63-81%. Putem presupune că acest lucru se datorează numărului mic de pacienți incluși în studiu, dar poate sugera, de asemenea, o sub diagnosticare clinică în rândul pacienților cu SBB fără polidactilie. Obezitatea a fost prezentă în 21 de cazuri, însemnând un procent de 84%, ceea ce este în concordanță cu literatura de specialitate (72-92%). Clasic, acumularea în greutate începe în primul an de viață și obezitatea devine evidentă în primii trei ani, greutatea la naștere fiind în limite normale sau aproape de limita superioară. [94] În cohorta noastră, mai mulți pacienți (40%) au avut greutatea la naștere sub medie dar în limita normalului, respectiv 10 cazuri, (3 cazuri însă fiind la percentila 1). 7 cazuri (28%) au avut greutatea la naștere normală, 3 cazuri (12%) au avut greutatea la naștere la limita superioară în timp de 4 dintre cazurile studiate (16%) au avut greutatea la naștere peste limita normală. Retinopatia pigmentară este prezentă în proporție mai mică în cohorta noastră comparativ cu literatura de specialitate, respectiv în 64% (16 cazuri) față de 93%. Această disproporție se datorează cel mai probabil vârstei mici a unor pacienți incluși în studiu la care degenerescența retiniană nu poate fi încă detectată. Și numărul mic de pacienți studiați poate

fi un factor care influențează acest procentaj. De remarcat, însă, este că depistarea retinopatiei pigmentare a fost mai precoce la câțiva dintre pacienții studiați decât descrierea din literatură. Astfel, la 2 pacienți deficitul vizual a fost observat chiar din primul an de viață și la alți 2 până la vârsta de 3 ani. Anomaliile genito-urinare și hipogonadismul sunt întâlnite în proporție de 84% în cohorta noastră (21 de cazuri), fapt care este în concordanță cu literatura de specialitate (59-98%). Toți pacienții de sex masculin prezintă hipoplazia organelor genitale externe, respectiv micropenis. Dintre pacienții de sex feminin, 5 cazuri au prezentat atrezie vaginală și 6 cazuri au prezentat hipoplazia organelor genitale externe. Anomaliile renale au fost identificate în cohorta studiată în proporție de 44% în concordanță cu procentul raportat în literatură (24-53%). [64, 65, 97] Cea mai frecventă anomalie renală întâlnită în rândul pacienților incluși în studiu (20% - 5 cazuri) a fost hidronefroza, urmată de boala polichistică renală în proporție de 16% (4 cazuri). Alte anomalii structurale sau de poziție (hipoplazie, atrofie, malrotație renală) au fost întâlnite în 12% (3 cazuri) dintre pacienți. Disfuncția renală a afectat 28% (7 cazuri) dintre pacienți dintre care 3 pacienți (12%) au prezentat insuficiență renală în fază terminală, unul fiind supus transplantului renal. Deficitul cognitiv a fost înregistrat într-o proporție mai mare în cohorta noastră (80%) față de rapoartele din literatură (62%).



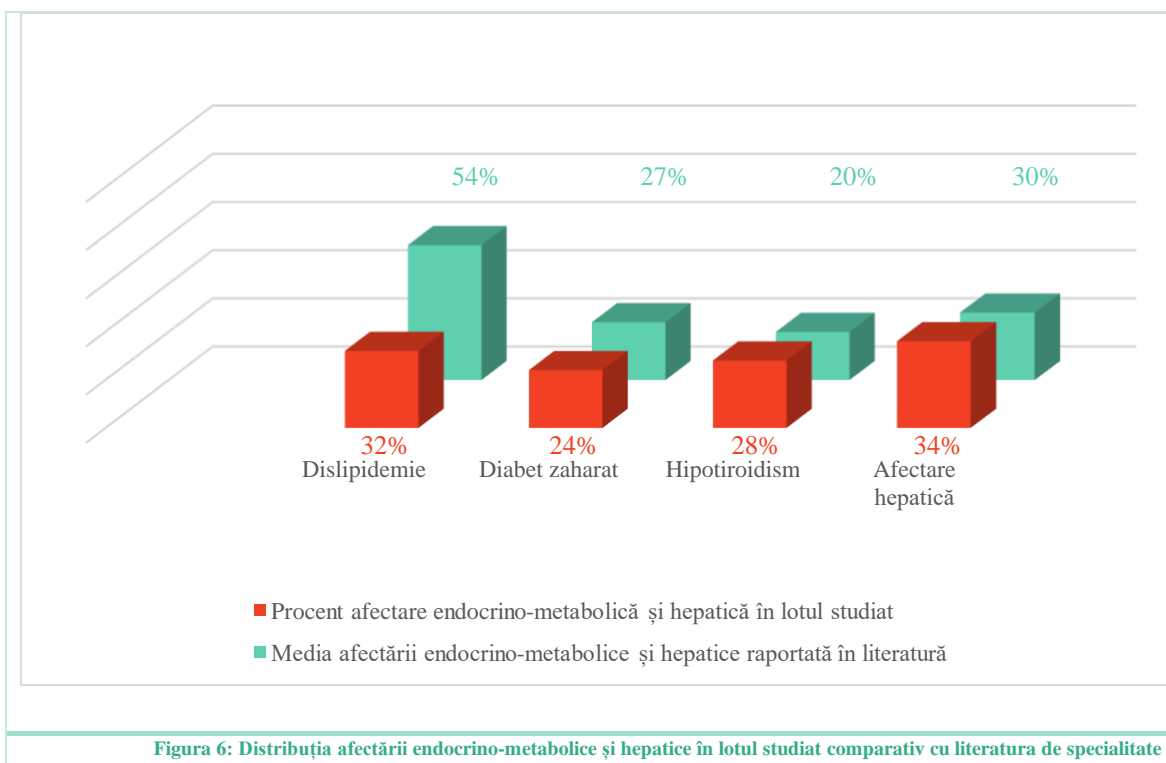
Patologiile asociate care au fost înregistrate la pacienții studiați, constituind criterii secundare de diagnostic, au fost distribuite astfel: întârzierea în dezvoltarea psihomotorie a fost remarcată la 18 pacienți (72%) iar întârzierea în dezvoltarea limbajului a fost înregistrată la 16 pacienți (64%), în timp ce anomaliile psihiatrice (tulburări de comportament, tulburări de spectru autist, hiperactivitate) au fost întâlnite la 7 subiecți (28%). Anomaliile cardiovasculare au fost detectate la 7 pacienți (28%) (Figura 5). Aceste procente se încadrează în intervalele publicate în literatura de specialitate, respectiv întârzierea în dezvoltare 50-81%, întârzierea în dezvoltarea limbajului 54-81%, anomaliile cardiovasculare 29%, cu excepția afectării psihiatrice care este ușor sub media de 33-35% raportată. [64, 65, 94]



Dislipidemia a fost prezentă la 8 cazuri (32%), diabetul și hipotiroidismul au fost depistate la 6 (24%), respectiv 7 (28%) dintre pacienți iar afectarea hepatică la 9 indivizi (36%). Diabetul zaharat și afectarea hepatică se încadrează în intervalele raportate în literatură, însă dislipidemia este prezentă într-o proporție mai mică la pacienții din studiu, în timp ce hipotiroidismul a fost regăsit într-o proporție mai mare față de media raportată. (Figura 6)

Alte anomalii oculare și digitale, în afara celor care constituie criterii primare de diagnostic, au fost de asemenea întâlnite la pacienții studiați. Dintre anomaliile digitale, amintim: brahidactilie la 11 cazuri (44%), sindactilie la 6 cazuri (24%), dintre care un pacient

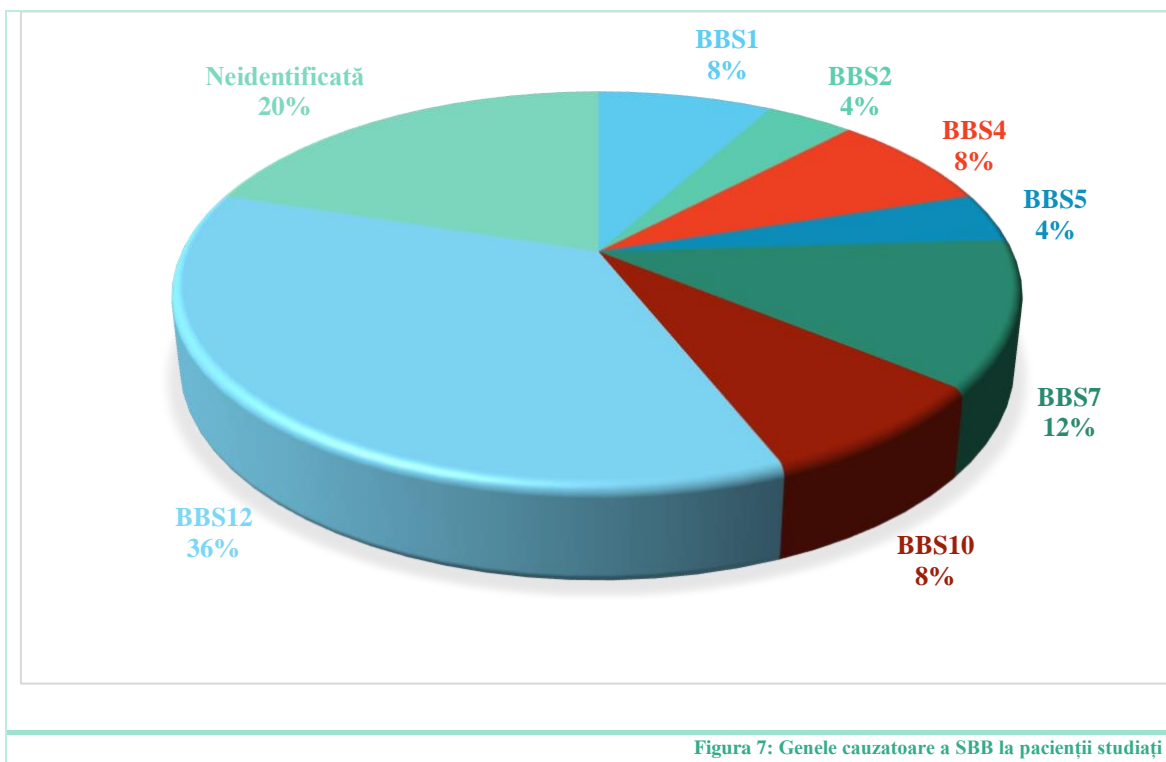
a prezentat sindactilia osoasă, degete conice la 6 cazuri (24%) și un caz a prezentat o anomalie nespecifică pentru SBB, hipoplazia falangei 2 a degetului 5 bilateral (4%).



Anomaliile oculare includ: miopie întâlnită la 5 pacienți (20%), strabism detectat la 5 cazuri (20%), nistagmus identificat la 5 pacienți (20%) precum și astigmatism prezent la 5 pacienți (20%). Cataracta și atrofia de nerv optic au fost detectate într-un proporție mai mică, respectiv 4%, la câte un pacient.

### Rezultate și discuții

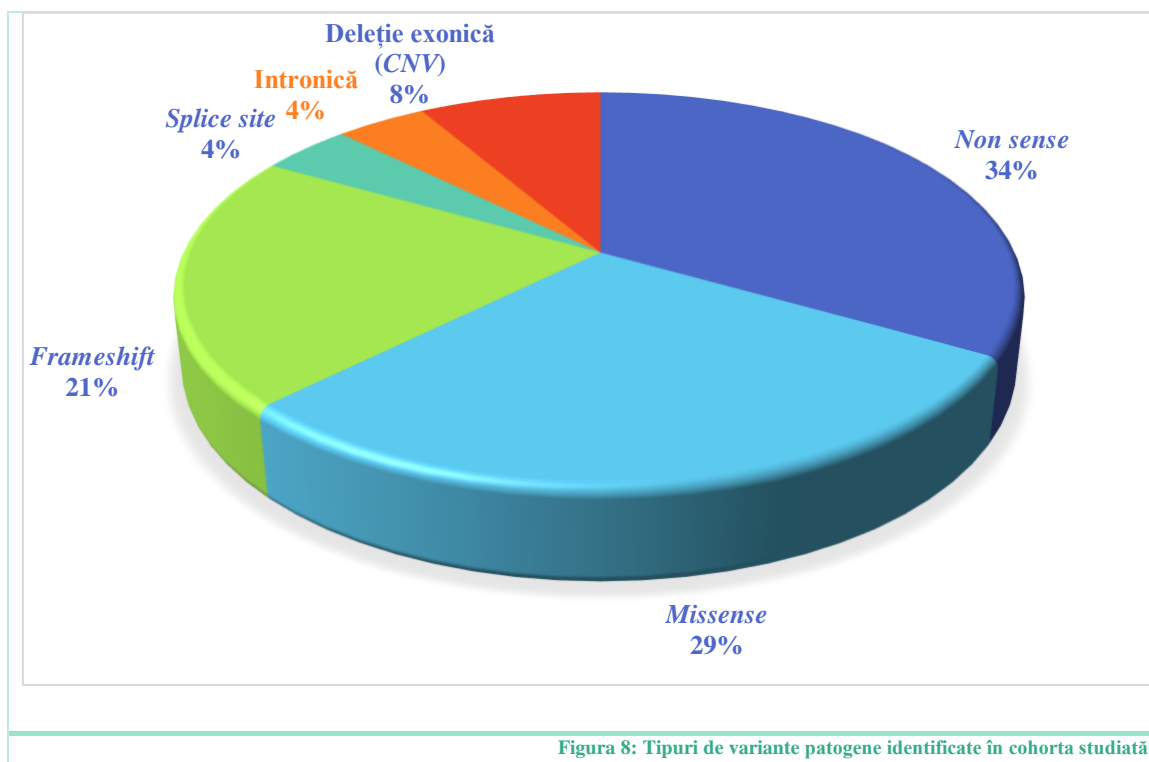
A fost identificată varianta cauzatoare de boală în 20 de cazuri (80%) în genele *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS10*, *BBS12*. Dintre aceștia, 1 caz a fost depistat în status heterozigot, insuficient pentru a confirma diagnosticul clinic. În 5 cazuri (20%) nu a fost identificată nici o variantă genică patogenă, probabil patogenă sau cu semnificație clinică incertă în genele asociate până în prezent cu SBB. (Figura 7) Procentul de identificare a cauzalității genomice a SBB la pacienții studiați este în concordanță cu cel raportat în literatura de specialitate. [52, 97, 98] Surprinzător, a fost identificată o singură mutație comună în gena *BBS1* în status heterozigot. Tot în gena *BBS1* a fost identificat un mecanism genetic mai rar raportat la pacienții cu SBB, respectiv o deleție exonică (CNV – copy number variant). Astfel *BBS1* este alterată în 8% din cazuri în neconcordanță cu rapoartele anterioare (51% în populația europeană, sau 23% în caucazieni) [52, 61]



Nu a fost identificată mutația comună în gena *BBS10* la nici unul dintre pacienții studiați, însă au fost depistate alte două variante în gena *BBS10*. Prin urmare, a doua genă ca frecvență (20-33%) [52, 61] raportată a fi implicată în cauzalitatea SBB, respectiv *BBS10*, este găsită modificată doar în proporție de 8% în cohorta noastră. O altă constatare frapantă este frecvența mare a variantei patogene homozigote identificate în gena *BBS12* (32%, respectiv 8 cazuri) în cohorta noastră. Această variantă, însă, nu este comună fiind foarte rar identificată la alți pacienți. În literatura de specialitate au fost raportați numai 4 pacienți cu această modificare genomică. Unul dintre pacienți este de origine română, ridicând numărul pacienților români care poartă varianta patogenă în gena *BBS12* la 9, unul este de origine italiană și alți doi sunt francezi. [79, 99, 100] Acest lucru sugerează, fără îndoială, prezența unei mutații de tip fondator în gena *BBS12* la nivelul populației din Romania. Identificarea aceleiași modificări în cazul tuturor pacienților de etnie romă incluși în studiu sugerează că această anomalie este comună și specifică populației rome din teritoriul nostru. De asemenea, variantele patogene din gena *BBS7* pot fi consecința unei mutații de tip fondator. Și în cazul acesteia frecvența în cohorta noastră este mai mare (12%) decât cea raportată în literatură (1,5-3%). [52, 61, 98]

Dintre cei 20 pacienți cărora li s-a detectat o variantă genomică patogenă, 14 au fost în status homozigot (74%), 4 în status heterozigot compus (21%) și 1 în status heterozigot (5%).

Tipurile de modificări genomice întâlnite în cohorta noastră au fost foarte heterogene și au inclus: 8 variante (34%) de tip nul, (*non-sense*), 7 variante (28%) de tip non-sinonim cu sens greșit (*missense*), 5 variante (21%) care schimbă cadrul de lectură al genei (*frameshift*), o mutație care afectează situsul de matisare (*splice site*), o variantă intronică și două deleții exonice (*CNV*). (Figura 8)



Studiul nostru confirmă extrema heterogenitate clinică a SBB inclusiv intrafamilială , în special, prin exemplificarea acesteia la cei 8 pacienți cu aceeași variantă patogenă în gena *BBS12*, respectiv Arg355\*, dintre care 2 frați (cazul 10 și 11 – Tabelul nr. 2). Astfel, 4 pacienți au prezentat polidactilie la nivelul tuturor membrilor, 1 la nivelul membrilor inferioare, 1 unilateral stânga, 1 membrul inferior stâng și 1 la nivelul membrului superior drept și membrilor inferioare.

Dintre toate variantele identificate, această modificare este asociată cu cele mai mari valori ale greutateii. Cea mai mică pacientă din acest grup, o fetiță în vârstă de 2 luni a avut greutatea la naștere peste percentila 99 și cea mai mare greutate din toată cohorta este tot a unui caz care poartă această variantă patogenă, respectiv 160 kg. Și ceilalți pacienți cu varianta Arg355\* prezintă depășiri semnificative ale standardelor, de la 3, 2 până la 13,95 deviații.

*Tabelul nr. 2: Sumarul trăsăturilor primare de diagnostic clinic al cazurilor la care a fost identificată varianta Arg355\**

<i>Caz Nr.</i>	<i>Vârsta</i>	<i>Polidactilie</i>	<i>Obezitate</i>	<i>Degenerescență retiniană</i>	<i>Hipogonadism / Anomalii genitourinare</i>	<i>Afectare renală</i>	<i>Dificultăți cognitive</i>
<b>6</b>	6	MS, MI	+7DS	Da	Atrofie vaginală, hOGE	Nu	sever
<b>10</b>	21	MS, MI	+3,2DS	Da	hP	Nefropatie cronică	
<b>11</b>	16	MI	+19DS	Da	Nu	Nu	ușor
<b>17</b>	7	MS, MI	+4,3DS	Da	hP	Hidronefroză dr	
<b>18</b>	9	MS stg MI stg	+6,3DS	Da	hOGE		sever
<b>20</b>	2 luni	MI stg	>pc99	Nu	Atrezie vaginală	Hidronefroză bilaterală Disfuncție renală	moderat
<b>21</b>	13	MS dr, MI	+13,95DS	Vedere deficitară	hOGE	Nefrită interstițială, fibroză, glomeruloscleroză	moderat
<b>22</b>		MS, MI	+11,63DS	Vedere deficitară	hP	Nu	moderat
<b>CPA</b>	5 luni	MI	>pc95	Nu	hP	Nu	Nu

CPA: caz publicat anterior [99], DS: deviații standard, hOGE: hipoplazia organelor genitale externe, hP: hipoplazie peniană, MS: membre superioare, MS stg: membrul superior stâng, MI: membre inferioare, MI stg: membrul inferior stâng, pc: percentila

Degenerescenta retiniană a fost confirmată la cinci pacienți, doi pacienți au suspiciune de retinopatie pigmentară datorită vederii deficitare, însă nu au fost investigați. Pacienta de 2 luni încă nu poate fi investigată din cauza vârstei prea mici și rămâne sub observație.

Toți pacienții au prezentat anomalii urogenitale, iar afectarea renală a fost diversă și prezentă la 5 pacienți. Și al 6-lea pacient a înregistrat debutul disfuncției renale cu niveluri ușor crescute ale ureei și creatininei (pe parcursul ultimului an).

Deficitul cognitiv, de asemenea, a variat ca severitate, fiind ușor la 1 caz, moderat la 3 cazuri și sever în două situații. Întârzierea în dezvoltare a fost înregistrată la toți pacienții, însă a variat ca severitate sau ca preponderență a unor componente ale dezvoltării. Astfel, două cazuri au prezentat întârziere severă a limbajului, cazul 6 prezentând ecolalie, bradilalie, dislalie și un bagaj de cuvinte foarte redus în timp de cazul 18 rostea un singur cuvânt la 9 ani. În alte două cazuri întârzierea a fost mai accentuată fie pe componenta motorie, cazul 10, fie pe cea a limbajului, respectiv cazul 17. La două cazuri au fost observate și diverse tulburări de comportament.

Malformațiile cardiace au fost înregistrate la un caz din lotul studiat și la cazul publicat în prealabil. Interesat este că aceleași cazuri sunt singurele care prezintă politelie. Cei doi frați au prezentat și hipertensiune arterială, diabet zaharat, steatoza hepatică cu niveluri crescute ale enzimelor hepatice. Dislipidemia a fost depistată, de asemenea, la cei doi frați, mixtă la sora mai mică și interesând doar nivelul de trigliceride la frate. Hipertrigliceridemia a mai fost înregistrată și la un alt caz studiat (cazul 17). S-au mai remarcat, de asemenea, unele anomalii oculare la cele două paciente cu tabloul clinic mai sever, incluzând nistagmus și cataractă. (Tabelul 3)



*Tabelul nr. 3: Sumarul caracteristicilor secundare de diagnostic clinic al cazurilor la care a fost identificată varianta Arg355\**

<i>Caz Nr.</i>	<i>ÎGD</i>	<i>Afecțiuni psihiatrice</i>	<i>Afecțiuni cardiovasculare</i>	<i>Dislipidemie</i>	<i>DZ</i>	<i>Hipotiroidism</i>	<i>Altele</i>
<b>6</b>	Da ÎSL	TSC	Nu	Da	Nu	Nu	
<b>10</b>	Da preponderent motor	Nu	HTA	HT	Da	Nu	Steatoză EH <sup>↑</sup>
<b>11</b>	Da	TC	PVM CMPH HTA	Mixtă	Da	Da	Nistagmus Politelie Steatoză EH <sup>↑</sup>
<b>17</b>	Da preponderent limbaj	Nu	Nu	HT	Nu	Nu	
<b>18</b>	ÎSL	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Cataractă
<b>20</b>	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	
<b>21</b>	Da	Nu	Nu	Vedere deficitară	Nu	Nu	
<b>22</b>	Da			Vedere deficitară	Nu	Nu	
<b>CPA</b>	hipotonie	Nu	HSVS				Politelie

CMPH: cardiomiopatie hipertrofică, CPA: caz publicat anterior [99], DZ: diabet zaharat, EH: enzime hepatice, HSVS: hipertrofie septală și ventriculară stângă, HT: hipertrigliceridemie, HTA: hipertensiune arterială, ÎGD: întârziere globală de dezvoltare, ÎSL: întârziere severă a limbajului, T(S)C: tulburări (severe) de comportament

Transmiterea ereditară în cohorta studiată a fost într-o manieră autozomal recesivă. Toți părinții disponibili pentru testare au fost indentificați ca fiind purtători heterozigoți ai variantelor identificate la descendenții acestora. Au fost disponibili pentru testare și alți membri ai familiilor, respectiv frați sau surori ai probanților. Nu au fost identificate cazuri de trialelism și nici variante cu efect modificador. Variabilitatea fenotipului în studiul de față poate fi atribuită, prin urmare, bagajului genetic unic al fiecărui individ, interacțiunii epistatice genice și modificărilor epigenetice. [89]

Frații sau surorile probanzilor au avut un risc de a moșteni alela mutantă de 50%. Prin urmare, unii dintre aceștia au fost, de asemenea depistați a fi purtători heterozigoți. Riscul acestora de a avea descendenți afectați depinde de statusul genetic al partenerilor sau de apariția unor variante patogene *de novo* în genele SBB. De aceea, testarea genetică a partenerilor sau testarea prenatală, în situația riscului biochimic crescut sau semnelor ecografice de alarmă, prin secvențiere pe panel de gene care să includă toate genele cunoscute SBB, urmărind posibila asociere digenică caracteristică acestui sindrom, este recomandată cu tărie.

## Concluzii

Acest studiu este prima analiză la nivel național a sindromului Bardet Biedl, pacienții fiind recrutați din majoritatea Centrelor Universitare din țară.

Limitările studiului au fost legate de lipsa unei baze de date a pacienților, de incidența redusă a bolii și, prin urmare, a numărului mic de pacienți identificați, de dificultatea realizării investigațiilor genetice datorită mecanismului complex genetic ce caracterizează sindromului Bardet Biedl și implicit a costurilor.

Studiul a inclus 25 de pacienți, cu vârste cuprinde între 2 luni și 43 ani, iar analiza fenotipică a fiecăruia a confirmat datele din literatura de specialitate în ceea ce privește extrema pleiotropie caracteristică bolii dar și a variabilității intrafamiliale.

Criteriile majore de diagnostic au fost prezente în rândul pacienților studiați astfel: polidactilie 92%, obezitatea 84%, retinopatia pigmentară 64%, hipogonadism și anomalii genito-urinare 84%, afectare renală 44% și deficit cognitiv 80%. Unele procentaje sunt în concordanță cu literatura de specialitate cum ar fi obezitatea, afectarea renală sau

hipogonadismul, în timp ce altele sunt în studiul nostru, fie mai mari, incluzând polidactilia și deficitul cognitiv, fie mai mici, cum este cazul retinopatiei pigmentare.

Investigațiile genetice au identificat varianta cauzatoare de boală în șapte dintre genele asociate cu sindromul Bardet Biedl, respectiv *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS10*, *BBS12*, la 80% dintre pacienți. Variantele identificate au fost 14 în status homozigot (74%), 4 în status heterozigot compus (21%) și 1 în status heterozigot (5%), insuficient pentru confirmarea diagnosticului.

Surprinzător, nu au fost depistate variante comune în populația caucaziană cauzatoare de boală, respectiv varianta Met309Arg în gena *BBS1* sau varianta C91fsX95 în gena *BBS10*, cu excepția variantei heterozigote (în *BBS1*).

În mod neașteptat, a fost identificată o mutație rară homozigotă în gena *BBS12*, respectiv Arg355\*, care a mai fost raportată în literatură doar în cazul a patru pacienți și care se pare că este prevalentă la populația noastră, fiind depistată la 8 dintre cazurile studiate (34%). Toate cazurile de etnie romă introduse în studiu au fost depistate a fi purtătoare a acestei modificări genomice. Acest lucru sugerează, fără îndoială, prezența unei mutații de tip fondator în gena *BBS12* la nivelul populației din România.

Dintre variantele cauzatoare de boală depistate în rândul pacienților studiați, 60% au mai fost raportate în publicații sau sunt citate în bazele de date populaționale iar 40% sunt noi, nemaifiind cazuri raportate în prealabil.

Analiza de față întărește observațiile anterioare privind heterogenitatea intrafamilială a SBB și a ciliopatiilor în general, prin ilustrarea diferențelor trăsăturilor clinice și severității afecțiunilor în cazul a doi frați purtători ai aceleiași modificări genomice introduși în studiu.

Transmiterea ereditară în cohorta noastră a fost într-o manieră autozomal recesivă. Nu au fost identificate cazuri de trialelism și nici variante cu efect modificador. Toți părinții disponibili pentru testare au fost identificați ca fiind purtători heterozigoți ai variantelor identificate la descendenții acestora, având un risc de 25% de a mai avea copii cu SBB.

Frații sau surorile probanților care au fost depistați a fi purtători heterozigoți prezintă un risc de a avea descendenți afectați. Acesta depinde de statusul genetic al partenerilor sau de apariția unor variante patogene *de novo* în genele SBB. De aceea, testarea genetică a partenerilor sau testarea prenatală, este recomandată.

Determinarea substratului genetic este de o mare importanță în managementul acestor pacienți. Astfel, urmărirea pacienților a căror vârstă este sub limita evidențierii întregii simptomatologii este esențială în anticiparea și depistarea precoce a implicării altor organe

și sisteme și în instaurarea unei conduite terapeutice cât mai timpuriu care să limiteze complicațiile și să îmbunătățească nivelul de trai al acestora.

#### *Gânduri finale:*

Studierea unei boli rare nu este deloc simplă, mai ales în contextul socio-economic din România. Alegerea acestei teme a fost o mare provocare, dar pasiunea pentru bolile rare a fost mai presus decât toate piedicile pe care le-am întâmpinat. Finalizarea acestei cercetări, cu siguranță, îmi aduce nu numai o satisfacție personală dar și date de valoare care să arunce o altă viziune asupra bolilor genetice.

Cunoștințele acumulate, ca o încununare a acestor ani de studiu, mă vor ajuta să privesc dintr-o nouă perspectivă și să iau în calcul și alte considerente în abordarea patologiei genetice. Nu aș fi surprinsă dacă în anii ce vor urma, mecanismul genetic complex care caracterizează ciliopatiile, să fie extrapolat și să se asocieze și cu alte boli de cauză genetică.

#### Direcții viitoare:

1. Studiul continuă cu analizarea funcțională a unui caz care a fost confirmat molecular ca fiind purtătorul unei combinații, neraportate în prealabil, a două variante heterozigote, una intronică și cealaltă o deleție intragenică. La momentul actual se află în lucru studii pe ARN și pe linii celulare limfoblastice transformate iar rapoartele preliminare au certificat patogenitatea modificării genomice identificate;
2. Continuarea investigațiilor genetice în cazul pacienților nediagnosticați molecular cu:
  - a. Efectuarea hibridizării comparative pe microrețele în vederea detectării unor dezechilibre cromozomiale structurale submicroscopice;
  - b. Secvențierea întregului exom în cazul părinților și analizarea în trio în vederea identificării unor gene candidat noi posibil implicate în patogeneză SBB sau a unor mecanisme genetice *de novo*;
  - c. Analiza transcriptomului acestor pacienți;
3. Analiza proteomică a variantelor noi identificate sau a celor care au mai fost raportate dar pentru care nu există studii funcționale.
4. Analiza haplotipurilor familiilor purtătoare a variantei prevalente în populația românească în gena *BBS12*, Arg355\*, pentru a confirma efectul de tip fondator și a explica variabilitatea fenotipică prin analizarea epistaziei genice.

## Bibliografie selectivă

1. Leeuwenhoek, A.V., *Observations, communicated to the publisher by Mr. Antony van Leewenhoek, in a dutch letter of the 9th Octob. 1676. here English'd: concerning little animals by him observed in rain-well-sea- and snow water; as also in water wherein pepper had lain infused.* Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1677. **12**(133): p. 821-831.
2. Afzelius, B., *Electron microscopy of the sperm tail; results obtained with a new fixative.* J Biophys Biochem Cytol, 1959. **5**(2): p. 269-78.
3. Satir, P., *STUDIES ON CILIA : II. Examination of the Distal Region of the Ciliary Shaft and the Role of the Filaments in Motility.* The Journal of cell biology, 1965. **26**(3): p. 805-834.
4. Bloodgood, R.A., *From central to rudimentary to primary: the history of an underappreciated organelle whose time has come. The primary cilium.* Methods Cell Biol, 2009. **94**: p. 3-52.
5. Brown, J.M. and G.B. Witman, *Cilia and Diseases.* Bioscience, 2014. **64**(12): p. 1126-1137.
6. Pazour, G.J., et al., *Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease.* Curr Biol, 2002. **12**(11): p. R378-80.
7. Marshall, W.F. and S. Nonaka, *Cilia: tuning in to the cell's antenna.* Curr Biol, 2006. **16**(15): p. R604-14.
8. Roberts, A.J., et al., *Functions and mechanics of dynein motor proteins.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(11): p. 713-26.
9. Sorokin, S., *Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs.* Journal of cell science, 1968. **3**(2): p. 207-230.
10. Davis, E.E., M. Brueckner, and N. Katsanis, *The emerging complexity of the vertebrate cilium: new functional roles for an ancient organelle.* Dev Cell, 2006. **11**(1): p. 9-19.
11. Hou, Y. and G.B. Witman, *Dynein and intraflagellar transport.* Exp Cell Res, 2015. **334**(1): p. 26-34.
12. Christensen, S.T., et al., *Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling.* J Pathol, 2012. **226**(2): p. 172-84.
13. Wheway, G., L. Nazlamova, and J.T. Hancock, *Signaling through the Primary Cilium.* Front Cell Dev Biol, 2018. **6**: p. 8.
14. Basten, S.G. and R.H. Giles, *Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis.* Cilia, 2013. **2**(1): p. 6.
15. Zhong, M., et al., *Tumor Suppressor Folliculin Regulates mTORC1 through Primary Cilia.* J Biol Chem, 2016. **291**(22): p. 11689-97.
16. Leitch, C.C. and N.A. Zaghoul, *BBS4 is necessary for ciliary localization of TrkB receptor and activation by BDNF.* PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98687.
17. Srivastava, S., et al., *Many Genes-One Disease? Genetics of Nephronophthisis (NPHP) and NPHP-Associated Disorders.* Front Pediatr, 2017. **5**: p. 287.
18. Bergmann, C., *Early and Severe Polycystic Kidney Disease and Related Ciliopathies: An Emerging Field of Interest.* Nephron, 2019. **141**(1): p. 50-60.
19. Poretti, A., et al., *Joubert syndrome: neuroimaging findings in 110 patients in correlation with cognitive function and genetic cause.* J Med Genet, 2017. **54**(8): p. 521-529.

20. Brancati, F., B. Dallapiccola, and E.M. Valente, *Joubert Syndrome and related disorders*. Orphanet J Rare Dis, 2010. **5**: p. 20.
21. Figuera, L.E., F. Rivas, and J.M. Cantu, *Oral-facial-digital syndrome with fibular aplasia: a new variant*. Clin Genet, 1993. **44**(4): p. 190-2.
22. Kannu, P., et al., *An unclassifiable short rib-polydactyly syndrome with acromesomelic hypomineralization and campomelia in siblings*. Am J Med Genet A, 2007. **143A**(21): p. 2607-11.
23. Mitchison, H.M. and A. Shoemark, *Motile cilia defects in diseases other than primary ciliary dyskinesia: The contemporary diagnostic and research role for transmission electron microscopy*. Ultrastruct Pathol, 2017. **41**(6): p. 415-427.
24. Bujakowska, K.M., Q. Liu, and E.A. Pierce, *Photoreceptor Cilia and Retinal Ciliopathies*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(10).
25. Goldberg, A.F., O.L. Moritz, and D.S. Williams, *Molecular basis for photoreceptor outer segment architecture*. Prog Retin Eye Res, 2016. **55**: p. 52-81.
26. McConnachie, D.J., J.L. Stow, and A.J. Mallett, *Ciliopathies and the Kidney: A Review*. Am J Kidney Dis, 2021. **77**(3): p. 410-419.
27. Devlin, L.A. and J.A. Sayer, *Renal ciliopathies*. Curr Opin Genet Dev, 2019. **56**: p. 49-60.
28. Saigusa, T. and P.D. Bell, *Molecular pathways and therapies in autosomal-dominant polycystic kidney disease*. Physiology (Bethesda), 2015. **30**(3): p. 195-207.
29. Valente, E.M., B. Dallapiccola, and E. Bertini, *Joubert syndrome and related disorders*. Handb Clin Neurol, 2013. **113**: p. 1879-88.
30. Harrison, V. and A.H. Németh, *CiliopathiesA reference for clinicians*, in *Joubert syndrome and Joubert syndrome-related disorders*. 2013, Oxford University Press.
31. Guo, J., et al., *Primary Cilia Signaling Promotes Axonal Tract Development and Is Disrupted in Joubert Syndrome-Related Disorders Models*. Developmental Cell, 2019. **51**(6): p. 759-774.e5.
32. Park, S.M., H.J. Jang, and J.H. Lee, *Roles of Primary Cilia in the Developing Brain*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2019. **13**.
33. Abdelhamed, Z.A., et al., *Variable expressivity of ciliopathy neurological phenotypes that encompass Meckel-Gruber syndrome and Joubert syndrome is caused by complex de-regulated ciliogenesis, Shh and Wnt signalling defects*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(7): p. 1358-72.
34. Schmidts, M., *CiliopathiesA reference for clinicians*, in *Jeune syndrome and the ciliary chondrodysplasias*. 2013, Oxford University Press.
35. Franco, B. and C. Thauvin-Robinet, *Update on oral-facial-digital syndromes (OFDS)*. Cilia, 2016. **5**: p. 12.
36. Schmidts, M., *Jeune syndrome and the ciliary chondrodysplasias*, in *Ciliopathies*. 2013, Oxford University Press. p. 30-63.
37. Haycraft, C., et al. *Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation*. in *Development*. 2007.
38. Beales, P.L. and T.D. Kenny, *Towards the diagnosis of a ciliopathy*, in *Ciliopathies*. 2013, Oxford University Press. p. 1-7.
39. Reiter, J.F. and M.R. Leroux, *Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(9): p. 533-547.
40. Shaheen, R., et al., *Characterizing the morbid genome of ciliopathies*. Genome Biol, 2016. **17**(1): p. 242.
41. Katsanis, N., *The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome*. Hum Mol Genet, 2004. **13 Spec No 1**: p. R65-71.

42. Badano, J.L., et al., *Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome*. Nature, 2006. **439**(7074): p. 326-30.
43. Katsanis, N., et al., *Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder*. Science, 2001. **293**(5538): p. 2256-9.
44. Patel, N., et al., *Expanding the clinical, allelic, and locus heterogeneity of retinal dystrophies*. Genetics in Medicine, 2016. **18**(6): p. 554-562.
45. Lindstrand, A., et al., *Copy-Number Variation Contributes to the Mutational Load of Bardet-Biedl Syndrome*. Am J Hum Genet, 2016. **99**(2): p. 318-36.
46. Beales, P.L., et al., *Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1187-99.
47. Katsanis, N., et al., *BBS4 is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(1): p. 22-9.
48. Delvallée, C., et al., *A BBS1 SVA F retrotransposon insertion is a frequent cause of Bardet-Biedl syndrome*. Clin Genet, 2021. **99**(2): p. 318-324.
49. Patir, A., et al., *The transcriptional signature associated with human motile cilia*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 1-12.
50. Kenny, J., et al., *Toward personalized medicine in Bardet-Biedl syndrome*. Per Med, 2017. **14**(5): p. 447-456.
51. Davis, E.E. and N. Katsanis, *The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease*. Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(3): p. 290-303.
52. Zaghoul, N.A. and N. Katsanis, *Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy*. J Clin Invest, 2009. **119**(3): p. 428-37.
53. Laurence, J.Z. and R.C. Moon, *Four cases of "retinitis pigmentosa" occurring in the same family, and accompanied by general imperfections of development*. 1866. Obes Res, 1995. **3**(4): p. 400-3.
54. Bardet, G., *Sur un Syndrome d'Obésité Congénitale avec Polydactylie et Retinite Pigmentaire (Contribution a l'etude des formes clinique de l'Obésité hypophysaire)*. Paris. Vol. 470. 1920.
55. Biedl, A., *Ein Geschwisterpaar mit adiposo-geneitaler Dystrophie*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1922. **48**(1630).
56. Farag, T.I. and A.S. Teebi, *Bardet-Biedl and Laurence-Moon syndromes in a mixed Arab population*. Clin Genet, 1988. **33**(2): p. 78-82.
57. Green, J.S., et al., *The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome*. The New England journal of medicine, 1989. **321**(15): p. 1002-1009.
58. Klein, D. and F. Ammann, *The syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and allied diseases in Switzerland: Clinical, genetic and epidemiological studies*. Journal of the Neurological Sciences, 1969. **9**(3): p. 479-513.
59. Weihbrecht, K., et al., *Keeping an Eye on Bardet-Biedl Syndrome: A Comprehensive Review of the Role of Bardet-Biedl Syndrome Genes in the Eye*. Med Res Arch, 2017. **5**(9).
60. Grochowsky, A. and M. Gunay-Aygun, *Clinical characteristics of individual organ system disease in non-motile ciliopathies*. Transl Sci Rare Dis, 2019. **4**(1-2): p. 1-23.
61. Forsythe, E., et al., *Risk Factors for Severe Renal Disease in Bardet-Biedl Syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(3): p. 963-970.
62. Mujahid, S., et al., *The Endocrine and Metabolic Characteristics of a Large Bardet-Biedl Syndrome Clinic Population*. J Clin Endocrinol Metab, 2018. **103**(5): p. 1834-1841.

63. Forsythe, E., et al., *Genetic predictors of cardiovascular morbidity in Bardet-Biedl syndrome*. Clin Genet, 2015. **87**(4): p. 343-9.
64. Forsyth, R. and M. Gunay-Aygun, *Bardet-Biedl syndrome overview*. GeneReviews®[Internet], 2020.
65. Beales, P.L., et al., *New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey*. J Med Genet, 1999. **36**(6): p. 437-46.
66. Jin, H., et al., *The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1208-1219.
67. Seo, S., et al., *BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(4): p. 1488-1493.
68. Seo, S., et al., *A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothed*. PLoS genetics, 2011. **7**(11): p. e1002358-e1002358.
69. Khan, S.A., et al., *Genetics of human Bardet-Biedl syndrome, an updates*. Clinical genetics, 2016. **90**(1): p. 3-15.
70. Barbelanne, M., et al., *Nephrocystin proteins NPHP5 and Cep290 regulate BBSome integrity, ciliary trafficking and cargo delivery*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(8): p. 2185-200.
71. Bhogaraju, S., et al., *Molecular Basis of Tubulin Transport Within the Cilium by IFT74 and IFT81*. Science, 2013. **341**(6149): p. 1009-1012.
72. Heon, E., et al., *Mutations in C8ORF37 cause Bardet Biedl syndrome (BBS21)*. Human molecular genetics, 2016. **25**(11): p. 2283-2294.
73. Marion, V., et al., *Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a BBSome and smoothed trafficking regulator, in a family with Bardet--Biedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly*. J Med Genet, 2012. **49**(5): p. 317-21.
74. Morisada, N., et al., *Bardet–Biedl syndrome in two unrelated patients with identical compound heterozygous SCLT1 mutations*. CEN case reports, 2020. **9**(3): p. 260-265.
75. Wormser, O., et al., *SCAPER localizes to primary cilia and its mutation affects cilia length, causing Bardet-Biedl syndrome*. European journal of human genetics : EJHG, 2019. **27**(6): p. 928-940.
76. Castro-Sánchez, S., et al., *Exploring genotype-phenotype relationships in Bardet-Biedl syndrome families*. Journal of Medical Genetics, 2015. **52**(8): p. 503-513.
77. Deveault, C., et al., *BBS genotype–phenotype assessment of a multiethnic patient cohort calls for a revision of the disease definition*. Human Mutation, 2011. **32**(6): p. 610-619.
78. Esposito, G., et al., *Genetic characterization of Italian patients with Bardet-Biedl syndrome and correlation to ocular, renal and audio-vestibular phenotype: identification of eleven novel pathogenic sequence variants*. BMC medical genetics, 2017. **18**(1): p. 10-10.
79. Manara, E., et al., *Mutation profile of BBS genes in patients with Bardet–Biedl syndrome: an Italian study*. Italian Journal of Pediatrics, 2019. **45**(1): p. 72.
80. Schaefer, E., et al., *Mesoaxial polydactyly is a major feature in Bardet–Biedl syndrome patients with LZTFL1 (BBS17) mutations*. Clinical Genetics, 2014. **85**(5): p. 476-481.
81. Slavotinek, A.M., *McKusick-Kaufman Syndrome*, in *GeneReviews®(R)*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
82. Tahani, N., et al., *Consensus clinical management guidelines for Alstrom syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2020. **15**(1): p. 253.



83. Duplomb, L., et al., *Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(9): p. 2391-9.
84. Vuillaume, M.L., et al., *CUGC for Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS)*. Eur J Hum Genet, 2019. **27**(4): p. 663-668.
85. Butler, M.G., et al., *Prader-Willi syndrome and early-onset morbid obesity NIH rare disease consortium: A review of natural history study*. Am J Med Genet A, 2018. **176**(2): p. 368-375.
86. Hufnagel, R.B., et al., *Neuropathy target esterase impairments cause Oliver–McFarlane and Laurence–Moon syndromes*. Journal of Medical Genetics, 2015. **52**(2): p. 85.
87. Slavotinek, A.M., *BARDET–BIEDL SYNDROME*, in *Cassidy and Allanson's Management of Genetic Syndromes*. 2021. p. 107-123.
88. Patil, A., et al., *Novel Treatments for Polycystic Kidney Disease*. Translational Science of Rare Diseases, 2019. **4**: p. 77-86.
89. Kenny, J., et al., *Toward personalized medicine in Bardet–Biedl syndrome*. Personalized Medicine, 2017. **14**(5): p. 447-456.
90. Drack, A.V., et al., *Retinal degeneration in BBS10 mice is ameliorated by subretinal gene replacement*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2020. **61**(7): p. 1914-1914.
91. Datta, P., A. Ruffcorn, and S. Seo, *Limited time window for retinal gene therapy in a preclinical model of ciliopathy*. Human Molecular Genetics, 2020. **29**(14): p. 2337-2352.
92. Seo, S., et al., *Subretinal gene therapy of mice with Bardet-Biedl syndrome type 1*. Investigative ophthalmology & visual science, 2013. **54**(9): p. 6118-6132.
93. Black, H.A., et al., *De novo mutations in autosomal recessive congenital malformations*. Genetics in Medicine, 2016. **18**(12): p. 1325-1326.
94. Forsythe, E., et al., *Managing Bardet-Biedl Syndrome-Now and in the Future*. Front Pediatr, 2018. **6**: p. 23.
95. Garcia-Tizon Larroca, S., et al., *Prenatal diagnosis of Bardet-Biedl syndrome in a case of hyperechogenic kidneys: Clinical use of DNA sequencing*. 2017.
96. Mallmann, M.R., et al., *Prenatal diagnosis of hydro (metro) colpos: a series of 20 cases*. Fetal Diagnosis and Therapy, 2019. **45**(1): p. 62-68.
97. Forsythe, E. and P.L. Beales, *Bardet-Biedl syndrome*. Eur J Hum Genet, 2013. **21**(1): p. 8-13.
98. Muller, J., et al., *Identification of 28 novel mutations in the Bardet-Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease*. Human genetics, 2010. **127**(5): p. 583-593.
99. Iurian, S.I., et al., *Bardet-biedl Syndrome–Case Presentation*. Romanian Journal of Pediatrics, 2015. **64**(3): p. 289-292.
100. Stoetzel, C., et al., *Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(1): p. 1-11.

### **Lista cu lucrări științifice publicate:**

1. Clinical and genetic heterogeneity of primary ciliopathies (Review)  
Focșa, I.O., Budișteanu, M., & Bălgrădean, M. (2021). International Journal of Molecular Medicine, 48, 176. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5009>
2. A case of Bardet Biedl syndrome caused by a recurrent variant in *BBS12*  
Ina Ofelia Focșa, Magdalena Budișteanu, Carmen Burloiu, Sheraz Khan, Laurențiu C. Bohîlțea, Erica E. Davis and Mihaela Bălgrădean: A case report. Biomedical Reports, 15, 103. <https://doi.org/10.3892/br.2021.1479>
3. Clinical aspects of a rare disease: Bardet Biedl syndrome  
**Ina Ofelia Focșa**, Magdalena Budișteanu, Cristina Stoica, Florina Nedelea, Claudia Jurcă, Lavinia Caba, Monica Pânzaru, Cristina Rusu, and Mihaela Bălgrădean: Modern Medicine 2022, Vol. 29, No. 1

### **Lista cu lucrări și comunicări prezentate la conferințe naționale și internaționale:**

1. Clinical and molecular characterization of a rare case diagnosed with Bardet Biedl Syndrome  
**I. O. Focsa**, M. Budisteanu, C. Burloiu, L. C. Bohiltea, M. Balgradean; 53rd European Society of Human Genetics (ESHG) Virtual Conference, June 6-9, 2020; Publicat în : *Eur J Hum Genet* **28**, 798–1016 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41431-020-00741-5>; ISSN 1476-5438
2. From cilia to complex disorders: The ciliopathies  
**I.O. Focsa**, L. C. Bohiltea, M. Balgradean, *Annual Scientific Meeting of Victor Babeș Institute*; The 11th National Pathology Symposium, November 22 - 24, 2018, Bucharest, Romania, publicat în Abstract book, nov 2018, ISSN 2601-0771; ISSN-L 2601-07 [www.totalpublishing.ro](http://www.totalpublishing.ro)
3. The past, the present and the future in ciliopathies  
**Ina Ofelia Focsa**, The 5th National Congress of Medical Genetics, September 26 - 28, 2018, Gura Humorului, Romania, publicat în Romanian Journal of Rare Disease, supl. 1/2018, pg 49, ISSN 2068-5882, [www.rjrd.ro](http://www.rjrd.ro)