Leandro Ucela Alves

Estudo genético e molecular de famílias com defeitos de membros

Genetic and molecular studies of families with limb defects

São Paulo

2016

Leandro Ucela Alves

Estudo genético e molecular de famílias com defeitos de membros

Genetic and molecular studies of families with limb defects

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para obtenção de Título
de Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo

2016

Resumo

O desenvolvimento embrionário dos membros é um processo complexo e dinâmico. É controlado por diversos genes e diversos mecanismos morfogenéticos, muitos dos quais ainda não estão completamente elucidados. O objetivo deste estudo é identificar as alterações genéticas responsáveis por defeitos de membros em quatro famílias brasileiras.

A família 1 apresenta três indivíduos com um espectro extremamente variável de displasia ectodérmica, ectrodactilia e fenda labiopalatina, características da síndrome EEC. O gene *TP63* foi analisado por sequenciamento de Sanger e foi descoberta uma variante nunca descrita anteriormente, c.1037C>A (p.Ala346Gly), em heterozigose, segregando com o fenótipo. Mutações no gene *TP63* já foram associadas com casos da síndrome EEC. Concluimos que a variante no gene *TP63* é a responsável pelo quadro clínico de EEC na família. Devido ao fenótipo extremamente variável presente na família, não pode ser descartada a possibilidade da variante também estar relacionada com a síndrome ADULT e com a ectrodactilia não sindrômica.

A família 2 incluiu cinco indivíduos afetados por polegar trifalângico. O fenótipo de um dos indivíduos é mais grave e se caracteriza por, além do polegar trifalângico, pela presença de braço direito grosseiramente curto e deformado com dedos hipoplásicos, pé direito malformado com metatarsos hipoplásicos e orelha direita pequena e protuberante. Estudos de mapeamento gênico com arrays de SNPs revelaram Lod scores sugestivos de ligação com 8 regiões cromossômicas distintas. O sequenciamento massivo em paralelo do exoma com a amostra de um dos afetados, seguida da seleção das variantes presentes nas regiões com Lod scores sugestivos, revelou a presença da variante c.410dupG (p.Gly138Argfs*43) no gene *SALL4*, a qual nunca havia sido descrita. Mutações no *SALL4* que alteram a matriz de leitura já foram associadas com casos da síndrome de Okihiro, a qual é caracterizada por defeitos radiais de membros e anomalia oftalmológica de Duane. A segregação da variante entre os indivíduos afetados foi confirmada por sequenciamento de Sanger. Concluimos que esta variante é responsável pelo quadro clínico da família, a qual apresenta a síndrome de Okihiro, porém sem a anomalia de Duane. A análise de todos os casos descritos com variantes no gene *SALL4* sugere que há uma correlação entre defeitos nos membros inferiores e o tamanho reduzido da proteína truncada *SALL4*.

A família 3 apresenta três indivíduos afetados por sindactilia completa com polidactilia pré-axial nas mãos, classificada como sindactilia do tipo IV. O sequenciamento massivo em paralelo do exoma com as amostras de três indivíduos afetados e dois normais não revelou a presença de qualquer alteração genética candidata a explicar o quadro clínico. O estudo do *array*-CGH revelou uma duplicação de aproximadamente 97 kb no gene *LMBR1* abrangendo a região de *enhancer* (ZRS) do gene *SHH*. Duplicações no ZRS já foram identificadas em casos de sindactilia do tipo IV. Concluimos que a duplicação no ZRS é responsável pelo quadro. A revisão da literatura sobre os casos com duplicação dessa região sugere uma correlação entre duplicações com tamanho ao redor de 97 kb e o fenótipo clássico de sindactilia do tipo IV.

A família 4 apresenta seis indivíduos afetados por uma síndrome relativamente nova descrita por nossa equipe em 2008, a síndrome de Santos. Essa síndrome é caracterizada por aplasia/hipoplasia fibular e anoniquia/hipoplasia ungueal dentre outros defeitos de membros. O estudo de ligação com *array* de SNP e marcadores de microssatélites, com posterior cálculo de *Lod score*, indicou duas regiões no cromossomo 3 como candidatas a conter a alteração genética responsável pelo fenótipo. Análise dos genes presentes nessas regiões indicou o gene *WNT7A* como o principal candidato. Alterações neste gene já foram associadas com a síndrome de Fuhrmann e a AARRS (Al-Awadi/Raas-Rothschild syndrome), de herança recessiva, as quais apresentam fenótipos correlatos aos presentes na síndrome de Santos. O sequenciamento de Sanger deste gene revelou a presença da variante c.934G>A (p.Gly312Ser), não descrita, em homozigose em cinco dos seis indivíduos afetados da família. O sexto indivíduo afetado é heterozigoto e apresenta fenótipo muito menos grave. Não apresenta qualquer defeito fibular e ungueal, característicos da síndrome. Esse é o primeiro relato de um caso de defeitos de membros como resultado da presença de uma variante em heterozigose no gene *WNT7A*. O sequenciamento massivo em paralelo do exoma foi realizado com as amostras deste indivíduo e de um dos indivíduos afetados. Contudo, nenhuma outra variante se mostrou candidata a explicar o quadro clínico. Concluimos que a síndrome de Santos é o resultado desta mutação no gene *WNT7A*. Estudos funcionais *in situ* baseados na atividade da Luciferase estão em andamento para comprovar o efeito deletério desta variante.

Abstract

Limb development is a complex and dynamic process driven by many different genes and morphogenetic mechanisms. Many of them have not been properly clarified yet. The aim of this study is to identify genetic alterations responsible for limb defects in four Brazilian families.

Family 1 includes three individuals affected by an extremely variable phenotype of ectrodactyly, ectodermal dysplasia and cleft lip/palate, and other clinical signs of EEC syndrome. The *TP63* gene, associated with this condition, was analyzed through Sanger sequencing and a novel variant, c.1037C>A (p.Ala346Gly), was found; the variant segregated in heterozygous state with the EEC phenotype. Mutations in *TP63* gene are already known to be associated with EEC syndrome. Due to the extremely variable phenotype presented by the individuals in the family, the possibility of the mutation c.1037C>G being related to acrodermato-ungual-lacrimar-tooth (ADULT) syndrome and SHFM cannot be ruled out.

Family 2 presents five individuals affected by preaxial polydactyly (triphalangal thumbs). The phenotype of the proband is more severe, being characterized by triphalangal thumb, with the following manifestations: grossly shortened and deformed forearm, markedly hypoplastic and appendicular thumb and malformed right foot with hypoplastic metatarsals. Linkage studies by SNP-*array* pointed to suggestive Lod score values in 8 distinct chromosomal regions. Whole exome sequencing with the sample from one affected individual revealed a novel frameshift variant, c.410dupG (p.Gly138Argfs*43) in the *SALL4* gene. Frameshift mutations in the *SALL4* were already associated to Okihiro syndrome, which is characterized by radial limb defects and Duane anomaly. The segregation of the variant among the affected individuals was confirmed by Sanger sequencing. We concluded that this variant is the cause of the clinical signs in the family, which was classified as presenting Okihiro syndrome without Duane anomaly. The review of all clinical cases reported with *SALL4* variants indicates a possible correlation between the foot malformation and the reduced size of the *SALL4* protein.

Family 3 has affected individuals with complete hand syndactyly associated to pre-axial polydactyly (syndactyly type IV). Whole exome sequencing was performed with the samples collected from the three affected individuals and two non-affected ones and no pathogenic variant was detected in genes related to limb development segregating with the phenotype. Through array-CGH, nevertheless, a duplication of about 97 kb including the enhancer (ZRS) of

the SHH gene was detected. Duplications in ZRS region were already reported in Syndactyly type IV. We concluded that the 97-kb duplication is the cause of the syndactyly type IV in the family. A review of reported cases (including ours) suggested a possible correlation between the duplication with 97 kb size and the classic phenotype of syndactyly type IV.

Family 4 has six individuals affected by a new syndrome (Santos syndrome) described by members of our group in 2008, a condition characterized by fibular agenesis/hipoplasia and ungual hypoplasia/anonychia, among other limb defects. Linkage study by SNP-array and microsatellite markers was performed and Lod score calculation pointed to two candidate regions on chromosome 3. Search for candidate genes revealed the *WNT7A* as the best candidate. Mutations in *WNT7A* gene, in homozygous state, are known to cause two other limb defect syndromes, Fuhrmann syndrome and AARRS (Al-Awadi/Raas-Rothschild syndrome), both presenting similar phenotypes to Santos syndrome. Sanger sequencing showed a novel variant, in homozygous state, c.934G>A (p.Gly312Ser) in the *WNT7A* gene in five out of six affected individuals. One affected individual, much less severely affected than his relatives, carries the mutation in heterozygous state. He does not present fibular or ungual malformations, characteristic signals of the syndrome; instead, he is the carrier of a complex polydactyly in his left hand. This is the first report about a heterozygous variant in *WNT7A* gene resulting in limb defect. Whole exome sequencing was performed with the samples from two affected individuals. However, no other variant in candidate gene to explain the limb defects was detected. We concluded that Santos syndrome is caused by a mutation in the *WNT7A* gene. Functional assays, based on Luciferase activity, are in execution to test the deleterious effect of the c.934G>A variant in the *WNT7A* gene.

1 Introdução geral

1.1 Embriogênese dos membros

Em seres humanos, os membros são divididos em segmentos. Os membros superiores são divididos em braço (com o osso do úmero), antebraço (com o rádio e a ulna) e mão (com carpo, metacarpos e falanges) (Figura 1-1). Os membros inferiores são divididos em coxa (com o osso do fêmur), perna (tíbia e fíbula) e pé (tarso, metatarsos e falanges).

Figura 1-1: Elementos esqueléticos do membro superior humano (Modificado de Zeller, 2009).

O braço, o antebraço e a mão, assim como a coxa, a perna e o pé, surgem a partir de quatro protuberâncias, localizadas no mesoderma lateral, conhecidas como “brotos” dos membros (Figura 1-2). As duas protuberâncias localizadas à altura do coração darão origem aos membros superiores direito e esquerdo e as duas protuberâncias à altura dos rins darão origem aos membros inferiores direito e esquerdo (Zeller, 2009).

Nos próximos tópicos, serão apresentadas as principais vias de sinalização responsáveis pelo desenvolvimento embrionário dos membros. Essa revisão bibliográfica não tem como objetivo abordar todos os genes já descritos na literatura relacionados ao desenvolvimento dos membros. Apenas os genes "chave" e relevantes para o nosso estudo serão detalhados.

Figura 1-2: Localização do broto do membro que dará origem ao membro superior direito. Microscopia eletrônica de varredura de embrião de camundongo (10,5 dias). AER, crista ectodérmica apical (modificado de Zeller, 2009).

1.1.1. Formação dos brotos dos membros

O processo de formação dos membros em seres humanos começa por volta da 4ª semana após a fecundação e se encerra por volta da 8ª semana (Barham e Clarke, 2008). Os brotos dos membros são uma projeção do mesoderma lateral e inicialmente são formados por células mesenquimais homogêneas revestidas por uma camada de células ectodérmicas (Niswander, 2003). As células do mesoderma do broto do membro darão origem aos condrócitos e às células precursoras dos tendões. Para completar o sistema musculoesquelético, células do somito proximal irão migrar para os brotos e darão origem às células precursoras musculares (Pineault e Wellick, 2014).

Antes de iniciar a formação dos brotos dos membros, uma área estreita e alongada do mesoderma lateral adquire o potencial para formar os membros por meio da expressão diferenciada dos fatores de transcrição homeóticos (HOX, do inglês, *homeobox*) ao longo do eixo rostrocaudal. O ácido retinoico (RA, do inglês, *retinoic acid*), um derivado ativo da vitamina A, possui um papel chave nessa etapa, conferindo a capacidade de formação dos membros nas células do mesoderma lateral. RA se liga a proteínas receptoras nucleares formando heterodímeros, os quais atuam como fatores de transcrição (Manouvrier-hanu e col., 2012).

A importância do RA é demonstrada pela inibição da proteína Raldh2, a qual é requerida para a síntese de RA no mesoderma lateral de embriões de camundongo e *zebrafish* (*Danio rerio*). Neste tipo de experimento, os brotos dos membros não iniciam o seu desenvolvimento (Stratford e col., 1996; Gardel e col., 2002). O bloqueio do início do desenvolvimento dos brotos

dos membros pode ser compensado pela administração exógena de RA (Niederreither e col., 2002).

A posição exata do surgimento dos brotos dos membros ao longo do eixo rostrocaudal e a “identidade” desses brotos devem-se também à expressão dos fatores de transcrição TBX5 e TBX4 no mesoderma lateral. Regiões do mesoderma lateral que expressam TBX5 originarão os brotos dos membros superiores e as regiões que expressam TBX4 originarão os brotos dos membros inferiores (Duboc e Logan, 2011).

As proteínas TBX5 e TBX4 estimulam o início da expressão do gene *FGF10* pelas células mesenquimais dos brotos dos membros. O crescimento dos membros, superiores e inferiores, se dá pela atuação da proteína FGF10, da família dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGF, do inglês, *fibroblast growth factor*). A manutenção da expressão dessa proteína durante todo o desenvolvimento é vital para a correta formação das estruturas dos membros (Duboc e Logan, 2011).

O nocauteamento condicional do gene *Tbx5* nos brotos dos membros de camundongo inibe completamente a formação dos membros superiores, pois, na ausência da proteína Tbx5 não há expressão do gene *Fgf10* (Rallis, 2003). Camundongos após nocauteamento condicional do gene *Tbx4* nos brotos dos membros formam o membro inferior, embora drasticamente reduzido (Naiche e Papaioannou, 2003). Em camundongos completamente nocauteados em relação ao gene *Fgf10*, os brotos dos membros são formados, porém, não ocorre o seu desenvolvimento (Sekine e col., 1999; Duboc e Logan, 2011).

Após a formação do broto do membro, o seu desenvolvimento ocorrerá ao longo de três eixos: o proximodistal (úmero-falange e fêmur-falange), o anteroposterior (radio-ulnar e tibio-fibular) e o dorsoventral (dorso da mão-palma e dorso do pé-planta) (Figura 1-3).

Embora sejam comumente estudados como entidades separadas, esses três eixos interagem entre si durante o desenvolvimento. Mas, para fins didáticos, eles serão apresentados separadamente nos próximos tópicos. Um esquema representativo das principais vias de sinalização, de forma integrada, pode ser encontrado na Figura 1-4.

Figura 1-3: Centros de sinalização e eixos que coordenam o desenvolvimento dos membros. AER, crista ectodérmica apical; ZPA, zona polarizante; PZ, zona de progresso (células indiferenciadas). A: Vista dorsal: Pr, proximal; Di, distal; Rad, radial (anterior); Uln, ulnar (posterior). B: Vista apical: Do, dorsal; Ve, ventral (Modificado de Oberg e col., 2010);

1.1.2 Desenvolvimento no eixo proximodistal

Assim que o broto do membro é formado, a proteína FGF10 (produzida no mesoderma) induz a produção da proteína FGF8 no ectoderma distal. Essa camada ectodérmica distal no broto do membro se diferencia em uma região denominada crista ectodérmica apical (AER, do inglês, *apical ectodermal ridge*) (Figura 1-3) (Barham e Clarke, 2008; Zeller, 2009). Após a AER ser formada, ela também passa a expressar as proteínas FGF4, FGF9 e FGF17 (Mariani e col., 2008).

A importância da AER foi comprovada por estudos clássicos realizados com embriões de galinha. Quando a AER é removida, o desenvolvimento do membro é inibido, resultando em um membro truncado, sendo a gravidade do defeito diretamente relacionada com a idade gestacional em que a AER foi removida (Summerbell, 1975).

Dentre as proteínas FGFs produzidas na AER, apenas a FGF8 é essencial para o desenvolvimento do broto do membro. A falta da expressão condicional da proteína Fgf8 nos brotos dos membros de camundongos resulta em membros de tamanhos reduzidos (braço e coxa gravemente afetados) e ausência dos dígitos anteriores. Já o duplo nocauteamento de Fgf4 e Fgf8 provoca a ausência completa dos membros (Lewandoski e col., 2000; Mariani e col., 2008).

Por mecanismos de retroalimentação positiva, as proteínas FGFs (principalmente a FGF8) induzem a produção de FGF10 no mesoderma adjacente. FGF10 irá estimular e manter o crescimento rápido e indiferenciado das células mesodérmicas adjacentes à AER. À medida que o broto do membro vai crescendo no eixo proximodistal, a AER vai se afastando das células mesodérmicas mais proximais. Assim, células que em um momento estão indiferenciadas, por ação das proteínas FGFs, em outro momento, passam a ocupar uma posição mais afastada da AER e começam a receber sinais de diferenciação. (Barham e Clarke, 2008).

O fator de transcrição P63 também possui um papel importante na manutenção da AER. Supõe-se que a proteína P63, produzida na AER, induz a produção de FGF8, por um mecanismo de retroalimentação positivo, o qual permite a estratificação e a especialização das células ectodérmicas da AER (Restelli e col., 2014). Experimentos em camundongos com o gene *Tp63* nocauteado resultam em membros superiores ausentes e membros inferiores gravemente truncados (Mills e col., 1999).

Durante a embriogênese dos membros, três regiões, ou grupos celulares, se tornam distintos devido à sua localização em relação ao eixo proximodistal. Essas regiões são: (1) estilópódio, região proximal que dará origem ao úmero ou ao fêmur; (2) zeugopódio, região intermediária que dará origem ao rádio e à ulna ou à tíbia e à fíbula; e (3) autopódio, região mais distal que dará origem ao carpo ou tarso e suas falanges correspondentes (Figura 1-1) (Barham e Clarke, 2008).

Uma das hipóteses para explicar a diferenciação dessas três regiões é conhecida como “frente de diferenciação”. É proposto que no início do desenvolvimento do broto do membro, o RA induz a expressão das proteínas Meis1 e Meis 2 em todas as células mesenquimais. Esse sinal induz a formação do estilópodio. A medida que o broto do membro cresce, as células mais distais passam a receber sinais da AER (principalmente das FGFs) que levam à produção das proteínas HOXA11 e HOXA13 nas células que darão origem ao zeugopódio e autopódio, respectivamente (Mercader e col., 2000).

Com o destino dos grupos celulares definidos, as células afastadas da AER começam a expressar o gene *SOX9* e a formar moldes de cartilagem que prefiguram os ossos dos membros. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, do inglês, *bone morphogenetic protein*) (BMP2, BMP4 e BMP7) também são expressas no mesênquima do broto do membro e induzem a condensação e a diferenciação das células em grupos de condrócitos (Zeller, 2009).

A proteína BMP4 possui uma relação complexa com os FGFs produzidos na AER, sendo ativadora da sua expressão no início do desenvolvimento dos membros e repressora durante o restante do processo de desenvolvimento. O fino equilíbrio entre as expressões de BMPs e FGFs está também diretamente relacionado com o processo de apoptose, como a que ocorre nas regiões interdigitais dos autopódios (Oberg e col., 2010).

1.1.3 Desenvolvimento no eixo anteroposterior

O desenvolvimento e a diferenciação do membro ao longo do eixo anteroposterior são controlados pela proteína *sonic hedgehog* (SHH) produzida na zona polarizadora (ZPA, do inglês, *zone of polarizing activity*) presente no mesoderma posterior, próxima a AER (Oberg e col., 2010) (Figura 1-3). Diversas proteínas estão relacionadas com a manutenção da expressão da proteína SHH no mesoderma posterior, como o FGF8 e algumas proteínas da família TBX e HOX, além do RA (Barham e Clarke, 2008; Zeller, 2009).

De forma antagônica à proteína SHH, a proteína GLI3 é produzida em todo o mesoderma e comumente é clivada. Na forma clivada (GLI3R) ela age como repressor da proteína SHH. Quando a proteína GLI3 é produzida na presença de SHH, o seu processamento é inibido, dando origem à forma completa e ativa da proteína (GLI3A). Desse modo, a proteína GLI3R é expressa na região anterior e SHH na região posterior. Esse padrão é mantido com a contribuição da proteína HAND2, a qual inibe a expressão de GLI3R e, concomitantemente, é inibida por GLI3R (Hill, 2007).

A identidade das estruturas ósseas dos membros depende da migração das células derivadas da ZPA. No estilopódio, células que derivam da ZPA irão formar os ossos posteriores. No autopódio, células que migram da ZPA irão formar o 4º e o 5º dígito e contribuirão para a formação do 3º dígito. Células que dão origem ao 2º dígito e partes do 3º dígitos serão especificadas por um gradiente de células derivadas da ZPA e de células derivadas da região anterior (Figura 1-5) (Zeller, 2009).

A proteína SHH estimula a expressão da proteína GREM1, a qual é um repressor da proteína BMP4, que por sua vez, é um repressor das proteínas FGFs-AER (proteínas FGFs produzidas na AER) (Figura 1-4). Deste modo, a expressão do gene *SHH* mantém a expressão dos genes *FGFs-AER* por inibir a expressão de seu repressor. Portanto, o gene *SHH* está

relacionado com desenvolvimento tanto do eixo proximodistal quanto do eixo anteroposterior (Niswander, 2003; Zeller, 2009).

Figura 1-5: Especificação das identidades anteroposteriores. Em vermelho, as células da ZPA que expressam SHH. Em rosa, as células derivadas da ZPA. Em marrom escuro, entre o 2º e o 3º dígitos, as células que se originam e não se originam da ZPA, formando um gradiente. Em amarelo, as células que não se originam da ZPA (modificado de Zeller, 2009).

Experimentos com embriões de galinhas mostram que a expressão ectópica do gene *Shh* na região anterior provoca polidactilia em espelho (Riddle, 1993) e que a redução da sua expressão em camundongos leva à perda dos dígitos anteriores (Scherz e col., 2007). Nocauteamento do gene *Shh* em camundongos resulta na perda de todas as estruturas ósseas do zeugopódio e do autopódio, com exceção do 1º dígito no membro posterior (Chiang e col., 1996). Deleção do *enhancer* do gene *SHH*, conhecido como ZRS (*ZPA regulatory sequence*), em humanos leva a aquiropidia (OMIM #200500). O nocauteamento do gene *Gli3* em camundongos provoca uma complexa polidactilia pré-axial, devido à expressão da proteína Shh na região anterior (Welscher e col., 2002).

A formação do 1º dígito requer a ausência da proteína SHH, o que comumente é atingida pela expressão da proteína GLI3R no mesoderma anterior, que a inibe. Além disso, as expressões de outros genes são necessárias para o desenvolvimento do 1º dígito. Esses genes são o *SALL4*, o *TBX5* e os genes da família *HOXD* (Koshiba-takeushi e col., 2006; Montavon e col., 2007). Camundongos com o gene *SALL4* nocauteado em heterozigose apresentam alterações do 1º dígito, mais proeminentes no membro superior, além de redução da expressão de Fgf10 (Koshiba-takeushi, 2006).

De vital importância para a padronização e formação dos precursores esqueléticos estão os genes da família *HOX* (*HOXA9* a *HOXA13* e *HOXD9* a *HOXD13*). Esses genes são expressos em um padrão específico tanto no eixo proximodistal quanto no eixo anteroposterior. O padrão complexo de expressão desses genes é responsável pelas diferenças morfológicas entre rádio e ulna, no membro superior, e entre tíbia e fíbula, no membro inferior (Barham e Clarke, 2008).

1.1.4 Desenvolvimento no eixo dorsoventral

Células do ectoderma dorsal do membro em desenvolvimento produzem a glicoproteína WNT7A, a qual é secretada no mesoderma posterior. WNT7A se liga a receptores de membrana que ativarão as vias de sinalização WNT. Estas vias têm como um de seus resultados a produção do fator de transcrição LMX1B, o qual é o principal responsável pela indução das características dorsais dos membros (Figura 1-4) (Barham e Clarke, 2008).

De forma antagônica à proteína WNT7A, o fator de transcrição EN1 é produzido no ectoderma ventral, devido ao estímulo das proteínas BMPs produzidas no mesoderma adjacente. A proteína EN1 é secretada no mesoderma ventral onde irá induzir a formação das características ventrais dos membros, além de inibir a expressão da proteína WNT7A. Desta forma, EN1 restringe a expressão da proteína WNT7A e, conseqüentemente de LMX1B, à região dorsal dos membros (Niswander, 2003).

A proteína WNT7A secretada no mesoderma posterior também possui um papel importante na manutenção dos níveis de SHH na ZPA. Em conclusão, o gene *WNT7A* atua indiretamente no desenvolvimento dos três eixos: é responsável pelas características dorsais devido a sua ação sobre a proteína LMX1B no mesoderma dorsal; participa da padronização do eixo dorsoventral devido a sua ação sobre a proteína SHH na ZPA; e, conseqüentemente, atua no eixo próximo-distal, pois a proteína SHH é um importante componente na manutenção da expressão dos genes *FGFs-AER* (Baham e Clarke, 2008).

O nocauteamento do gene *Wnt7a* em camundongos leva à ventralização do dorso dos autopódios devido à falta da expressão da proteína Lmx1b. Além desse fenótipo, é observada a ausência de diversas estruturas ósseas posteriores (Parr, 1998). Camundongos nocauteados em relação ao gene *Lmx1b* apresentam ventralização do dorso dos autopódios, caracterizada pela ausência de unhas (Chen e col., 1998). De maneira oposta, o nocauteamento em relação ao

gene *En1* em camundongos resulta na dorsalização do ventre dos autopódios (Loomis e col., 1996).

1.2 Alterações genéticas que levam aos defeitos de membros

Alterações em genes que participam das vias de sinalização que controlam o desenvolvimento dos membros possuem o potencial de produzir alterações morfológicas dependendo dos genes alterados, do tecido onde se expressam e do momento do desenvolvimento em que se expressam. Tais situações podem levar a um defeito isolado de membros ou a sua ocorrência como parte de uma síndrome.

Os defeitos de membros podem ser classificados como maiores (quando apresentam consequências médicas ou necessidade de intervenção cirúrgica) ou menores (quando apresentam um efeito mínimo sobre a função ou aceitabilidade social) (Pereira e col., 2008).

A descrição epidemiológica completa de todos os defeitos de membros congênitos, em diferentes países, é extremamente rara (Vasluian e col., 2013). Na Finlândia, um estudo conduzido entre 1964 e 1977 estimou a prevalência ao nascimento dos defeitos de membros em 13/10.000 (Aro e col., 1982). Já na Escócia, entre 1964 e 1968, a prevalência foi estimada em 30/10.000 (Rogala e col., 1964).

Em um estudo recente realizado por Vasluian e col. (2013) entre 1981 e 2010 com 497.751 nascimentos na Holanda, foi estimada a prevalência de malformação de membros ao nascimento de 21,1/10.000. Nesse estudo foram excluídas algumas malformações leves como clinodactilia, braquidactilia do 4º e 5º dígito, dedo em forma de gatilho, sindactilia do 2º/3º dígito, 1º espaço interdigital alargado e dedo curto/grande, assim como, pé torto/malposicionado e deslocamento da patela. Os defeitos isolados (únicos) foram os mais frequentemente observados, presentes em 57% dos afetados. Os defeitos mais comuns foram a polidactilia (8,4/10.000) e a sindactilia (4,7/10.000). O membro superior foi o mais frequentemente acometido e o sexo masculino foi o mais acometido (1,2:1). A ocorrência de malformação de membros em síndromes já conhecidas ocorreu em 37% dos casos.

Pereira e col. (2008) estudaram 2500 recém-nascidos na cidade Maceió (Al, Brasil) no período entre 2002 e 2003. Foi estimada a prevalência de defeitos de membros de 288/10.000. A prevalência é elevada, pois foram considerados todos os tipos leves de defeitos de membros,

incluindo o pé torto, o qual foi o defeito mais frequente (72/10.000). A frequência de polidactilia foi estimada em 40/10.000 neste estudo.

O Quadro 1-1 apresenta os principais defeitos isolados de mãos e pés e os genes identificados como responsáveis pelos defeitos, quando alterados. Convém destacar a enorme heterogeneidade de loci dos defeitos, sendo que vários genes alterados diferentes podem gerar um fenótipo similar, quando não o mesmo. Alterações em um mesmo gene podem resultar em quadros clínicos distintos. Essa heterogeneidade dificulta a identificação dos genes alterados responsáveis por determinadas condições clínicas.

Quadro 1-1: Defeitos isolados de mãos e pés, genes e alterações genéticas correspondentes

Defeitos isolados	Tipo	Mecanismos de herança	Localização Cromossômica	Genes e alterações genéticas
Ectrodactilia	1 (MIM 183600)	AD	7q21.2-21.3	?
	3 (MIM 246560)	AD	10q24	10q24 - dup
	4 (MIM 605289)	AD	3q27	<i>TP63</i>
	5 (MIM 606708)	AD	2q31	?
	6 (MIM 225300)	AR	12q13	<i>WNT10B</i>
	2 (MIM 313350)	XR	Xq26	?
Polidactilia pós-axial	A1 (MIM 174200)	AD	7q14.1	<i>GLI3</i>
	A2 (MIM 602085)	AD	13q21-q32	?
	A3 (MIM 607324)	AD	19p13.2-13.1	?
	B (MIM 174200)	AD	7p14.1	<i>GLI3</i>
Polidactilia pré-axial	I (MIM 17440)	AD	?	?
	II (MIM 174500)	AD	7q36.3	<i>LMBR1</i> (ZRS*)
	III (MIM 174600)	AD	?	?
	IV (MIM 165240)	AD	7q14.1	<i>GLI3</i>
Sindactilia	I (MIM 185900)	AD	2q34-q36	?
	III (MIM 186100)	AD	6q22.31	<i>GJA1</i>
	IV (MIM 186200)	AD	7q36.3	<i>LMBR1</i> (ZRS*)
	V (MIM 186300)	AD	2q31.1	<i>HOXD13</i>
Polissindactilia	I (MIM 186000)	AD	2q31.1	<i>HOXD13</i>
	II (MIM 608180)	AD	22q13.3	<i>FBN1</i>
	III (MIM 610234)	AD	14q11.2-q12	?
Braquidactilia	A1 (MIM 112500)	AD	2q35-q36	<i>IHH</i>
	A2 (MIM 112600)	AD	5p13.3-p13.2	<i>BMPR1B</i>
	A3 (MIM 112700)	AD	20q11.22	<i>GDF5</i>
	A4 (MIM 112800)	AD	20q11.22	5.5kb - dup
	A5 (MIM 112900)	AD	20p12.3	?
	B1 (MIM 113000)	AD	9q22.31	<i>ROR2</i>
	B2 (MIM 611377)	AD	17q22	<i>NOG</i>
	C (MIM 113100)	AD	20q11.22	<i>GDF5</i>
	D (MIM 113100)	AD	2q31.1	<i>HOXD13</i>
	E1 (MIM 113300)	AD	2q31.1	<i>HOXD13</i>
	E2 (MIM 613382)	AD	12p11.22	<i>PTHLH</i>
	E3 (MIM 272150)	AR	?	?

AD, autossômico dominante; AR, autossômico recessivo; XR, ligado ao X.

O Quadro 1-2 apresenta algumas das síndromes que incluem defeitos de membros. Foi dado enfoque especial às causadas por alterações nos genes descritos nos tópicos anteriores e nos que fazem parte das mesmas vias de sinalização. Também se observa heterogeneidade clínica, com alguns genes podendo acarretar mais de uma síndrome, quando alterados. Além disso, o mesmo gene alterado pode estar relacionado tanto com quadros síndrômicos quanto com manifestações isoladas de defeitos de membros.

1.3 Identificação de genes e variantes patogênicas que levam aos defeitos de membros

Diversas técnicas foram utilizadas para identificar as variantes genéticas causativas de determinados quadros clínicos na história da genética. Contudo, ainda não existe uma única técnica ideal capaz de avaliar com eficiência todos os tipos possíveis de variantes genéticas capazes de explicar as doenças humanas. Nos próximos subtópicos será apresentada a importância de algumas das metodologias utilizadas na investigação das causas genéticas dos defeitos de membros.

1.3.1 Estudos citogenéticos convencionais e de variação de número de cópias

Uma metodologia clássica para a identificação de alterações genéticas em grande escala é a análise em microscópio óptico de cromossomos metafásicos por meio da técnica de bandeamento G. Alterações genéticas grandes o suficientes para serem vistas por bandeamento G (comumente 5 Mb ou maiores) são quase sempre patogênicas e não fazem parte da variação genética humana normal, salvo algumas raras exceções. Essa técnica também possibilita a identificação de translocações de segmentos cromossômicos.

Quadro 1-2: Algumas síndromes com defeitos de membros e os genes já associados

Síndrome	OMIM	Her.	Gene alterado	Defeito de Membros	Outros defeitos
Holt-Oram	142900	AD	<i>TBX5</i>	Membros superiores: anomalia dos raios radiais	Malf. cardíaca
Okihiro	607323	AD	<i>SALL4</i>	Anomalia dos raios radiais	Anom. de Duane; Defeito renal, cardíaco, vertebral e coanal
Displasia isquiopatelar	147891	AD	<i>TBX4</i>	Ossificação anormal da junção isquiopubica; patela hipoplásica	Micrognatia; fenda lábiopalatina
Pé torto congênito	119800	AD	<i>PITX1</i>	Pé torto, assimetria dos membros inferiores	
LADD	149730	AD	<i>FGF10; FGFR3/2</i>	Membro inferior: 1º dígito largo; sindactilia II-III e III-IV	Def. de orelha, ducto lacrimal e dental; surdez; agen. renal
Tetramelia	273395	AR	<i>WNT3</i>	Tetramelia	Def. pulmonar, gastro-intestinal, renal e cardíaco; dismorfia
Cenani-Lenz	212780	AR	<i>LRP4</i>	Oligosindactilia; rádio e ulna curtos e fundidos	
EEC	604292	AD	<i>TP63</i>	Ectrodactilia	Displasia ectodérmica; fenda labiopalatina
ADULT	103285	AD	<i>TP63</i>	Ectro/sindactilia	Displasia ectodérmica; hipoplasia de seios e mamilos; sardas
Membro-mamária	603543	AD	<i>TP63</i>	Ectro/sindactilia; fenda no pé	Def. no ducto lacrimal; displasia ungueal; seios hipoplásicos
AEC	106260	AD	<i>TP63</i>	Ectro/sindactilia	Displasia ectodérmica; fenda labiopalatina; anquilobléfaro
Greig	175700	AD	<i>GLI3</i>	Sindactilia; polidactilia pré/pós-axial	Macrocefalia; proeminência frontal; hipertelorismo
Pallister-Hall	146510	AD	<i>GLI3</i>	Sindactilia; polidactilia central/pós-axial	Hamartoma hipotalâmico; disfunção pituitária
Aquiropodia	200500	AR	<i>LMBR1 (ZRS)*</i>	amputação das extremidades distais	
Ulnar-mamária	181450	AD	<i>TBX3</i>	Anomalia dos raios ulnares	Hipoplasia mamária; anom. cardíaca, dental e genital
Smith-Lemli-Optiz	270400	AR	<i>DHCR7</i>	Sindactilia II-III no pé; polidactilia pós-axial	Def. intelectual/desenvolvimento; malf. mult., dism. Facial
Fuhrmann	228930	AR	<i>WNT7A</i>	Unhas displásicas/ausentes; fíbula hipoplásica/ausente	
AARRS	276820	AR	<i>WNT7A</i>	focomelia, oligodactilia, unhas ausentes	Anomalias genitais
Unha-patela	161200	AD	<i>LMX1B</i>	Defeitos de unha, patela e joelho	Glaucoma de ângulo aberto; anom. Glomerular
Mão-pé-genital	140000	AD	<i>HOXA13</i>	1º raio curo; 5º dedo da mão curto; fusão do carpo	Defeito urogenital
Guttmacher	176305	AD	<i>HOXA13</i>	Anomalia pré-axial; polidactilia pós-axial na mão	Hipospadias
RUSAT	605432	AD	<i>HOXA11</i>	Sinostose radio-ulnar proximal	Trombocitopenia amegacariocítica
Hunter-Thompson	201250	AR	<i>GDF5</i>	Membro curto, regiões intermediárias e distais mais afetadas	
Condrolasia de Grebe	200700	AR	<i>GDF5</i>	Encurtamento dos mebrs; polidactilia pós-axial	
Du Pan	228900	AR	<i>GDF5</i>	Ausência de fíbula; braquiodactilia; pé torto	
SYM1A	185800	AD	<i>NOG</i>	Anquilose da junta interfalangeal proximal; fusão carpal/tarsal	surdez condutiva
Townes-Brocks	107480	AD	<i>SALL1</i>	Polidactilia pré-axial; polegar trifalângico	Imperfuração anal; defeitos de orelha e urogenitais
Robinow AR	268310	AR	<i>ROR2</i>	Braquiomelia meso/acromélica; anormalidades do rádio/ulna	Dism. facial; defeito orodental; hipoplasia genital
Robinow AD	180700	AD	<i>WNT5A</i>	Mesomelia; mão pequena; falange terminal bífida	Dism. facial; hiperplasia gengival; defeitos renal e genitais

Apenas algumas características clínicas das síndromes são apresentadas. Para uma descrição completa é recomendado acessar o portal do OMIM.

AD, autossômico dominante; AR, autossômico recessivo; dism, distúrbio Her, padrão de herança; def, defeito; malf, malformação; anom, anomalia.

* Na região intrônica do gene *LMRB1* há um importante *enhancer* do gene *SHH*, conhecido como ZRS.

A técnica de hibridação fluorescente in situ (FISH, do inglês, *fluorescence in situ hybridization*) complementa a técnica de bandeamento por introduzir componentes moleculares (citogenética molecular) e permitir a identificação de pequenos segmentos cromossômicos ao microscópio óptico, o que não seria possível por meio da citogenética convencional. A observação de translocações cromossômicas equilibradas por bandeamento G e delimitação das regiões alteradas por FISH pode ser uma excelente estratégia para se identificar a causa de doenças a nível gênico. Essas ocorrências já permitiram inúmeras vezes o estabelecimento de correlações entre alterações gênicas no ponto de quebra (ou próximos a ele) e doenças.

Por exemplo, utilizando essas técnicas, David e col. (2009) identificaram um locus relacionado à ectrodactilia. O cariótipo seguido do bandeamento G inicialmente permitiu identificar uma translocação equilibrada, t(2;11) (q14.2;q14.2). Contudo, a técnica de FISH revelou uma perda de material genético na região 2q14.1-q14.2, uma região intergênica próxima aos genes *GLI2* e *EN1*. Supõe-se nesse estudo que um *enhancer* do gene *EN1* tenha sido afetado pela translocação e seja essa a causa da ectrodactilia no paciente. Em outro estudo, Fonseca e col. (2013), utilizando as técnicas de bandeamento G e de FISH, identificaram duas translocações aparentemente equilibradas, t(7;17) (p13;q24) e t(17;20) (q24.3;q11.2), em dois casos esporádicos com diagnóstico de displasia campomélica acampomélica. Os pontos de quebra destas translocações eram intergênicos e estavam localizados a aproximadamente 700 kb do gene *SOX9*, o qual já foi relacionado com defeitos esqueléticos. Foi postulado que estas translocações provavelmente ocorreram em um *enhancer* adicional do gene *SOX9*.

Outra técnica importante na citogenética molecular é a hibridação genômica comparativa por microarranjos (*array*-CGH, do inglês, *array-comparative genomic hybridization*). Essa técnica permite a detecção de variações no número de cópias (CNV, do inglês, *copy number variation*) em milhares de sequências alvo distribuídas por todo o genoma. Essa metodologia não permite a observação direta da estrutura cromossômica e, por isso, não permite detectar translocações cromossômicas equilibradas.

Por exemplo, Klopocki e col. (2011), em estudo colaborativo que incluiu o nosso grupo de pesquisa, identificaram o gene alterado responsável pelo quadro clínico de ectrodactilia associada a hemimelia tibial por meio de *array*-CGH (OMIM #612576). Primeiramente, a região candidata a conter o gene foi mapeada por estudo de ligação no Brasil, por Lezirovitz e col. (2008). Das 56 famílias estudadas, 17 delas, incluindo a brasileira, apresentavam duplicações de

tamanhos variados na região 17p13.3, com uma sobreposição mínima de 11,8 kb em uma região que contém um único gene, o *BHLHA9*. A duplicação do gene *BHLHA9* foi confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) em tempo real, ou PCR quantitativo (qPCR), e estudos funcionais confirmaram o papel da duplicação do gene *BHLHA9* na origem do quadro clínico.

1.3.2 Mapeamento por estudos de ligação

O estudo de ligação tem por finalidade mapear a região cromossômica que contém um gene alterado, responsável por um determinado fenótipo que segrega em uma família. O princípio básico é a observação de que alelos em loci que residem fisicamente próximos em um cromossomo têm uma probabilidade maior de serem transmitidos em conjunto (ligados) na meiose.

Para se realizar o estudo de ligação, algumas condições são necessárias: (1) família com grande número de indivíduos apresentando o fenótipo com um claro padrão de herança mendeliana e (2) os marcadores genéticos utilizados devem ser polimórficos, residir em posição conhecida no cromossomo, ser numerosos e estar espalhados por todo o genoma.

Os marcadores moleculares mais comumente utilizados nestes estudos são os do tipo microssatélites e os polimorfismos de único nucleotídeo (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*). Marcadores do tipo microssatélites têm a vantagem de serem polialélicos e consequentemente, são altamente informativos, enquanto que os marcadores do tipo SNPs são geralmente bialélicos. Contudo, devido à alta densidade e ampla distribuição dos marcadores do tipo SNPs e em virtude da automação do processo de genotipagem, esses marcadores permitem varreduras genômicas muito eficientes (Kruglyak, 1997). Atualmente existem métodos fáceis e rápidos para se genotipar mais de 1,5 milhões de SNPs, distribuídos por todo o genoma, de uma única vez, por meio de *arrays* de SNPs de alta densidade.

Para determinar se o locus do marcador genético co-segrega com o locus responsável pelo fenótipo é necessário realizar o cálculo de *Lod score* (logaritmo de chances, do inglês, *logarithm of the odds*). *Lod scores* elevados indicam as regiões cromossômicas candidatas a conter o gene que se busca mapear. No entanto, essas regiões mapeadas geralmente são grandes, muitas vezes com dezenas ou mesmo com centenas de genes. A busca da alteração

genética causativa é trabalhosa e muitas vezes requer o sequenciamento convencional de diversos segmentos genômicos.

Por exemplo, como já mencionado, nosso grupo (Lezirovitz e col., 2008) mapeou um novo locus (OMIM #612576) relacionado com ectrodactilia associada a hemimelia tibial no cromossomo 17, utilizando a varredura genômica com 382 marcadores de microssatélites seguida de cálculo de lod *score* de múltiplos pontos. Como descrito, o gene responsável foi posteriormente identificado pela análise de *array*-CGH nesta e em outras famílias.

Al-Qattan e col. (2013a) identificou um novo locus de sindactilia cutânea do tipo III na região 7q36 utilizando *array* com 250k SNPs em amostras de oito indivíduos afetados de uma mesma família. Nessa região está localizado o *enhancer* do gene *SHH*, o ZRS, já associada com a sindactilia do tipo IV. Contudo, apesar do mapeamento correto, nenhuma variante ou CNV foram identificadas pelas técnicas de sequenciamento de Sanger e *array*-CGH. Até hoje não se conhece a natureza da mutação neste caso.

1.3.3 Sequenciamento de Sanger e sequenciamento massivo em paralelo

Para identificar alterações genéticas de pequena escala (substituições e deleções/duplicações de um único nucleotídeo ou de um pequeno segmento de DNA) são utilizadas técnicas moleculares como o sequenciamento convencional de Sanger e o sequenciamento massivo em paralelo.

Desde os anos 90, o sequenciamento convencional de Sanger é realizado de forma automatizada, porém o princípio da técnica é o mesmo desenvolvido por Sanger nos anos 70. Como o genoma humano é muito grande e o sequenciamento convencional de Sanger abrange apenas um pequeno trecho do genoma em cada reação, torna-se necessário, a priori, ter uma região candidata pequena a conter a variante responsável pelo fenótipo. Essa região candidata pode ser indicada pela (1) busca de genes já descritos na literatura que, quando alterados, condizem com o fenótipo apresentado pelo indivíduo e/ou (2) busca de genes presentes em regiões candidatas mapeadas por estudo de ligação. Em ambos os casos, pode ser caro, trabalhoso e demorado encontrar a variante que explica o quadro clínico.

Uma técnica de sequenciamento relativamente nova revolucionou a forma de buscar alterações gênicas. O sequenciamento massivo em paralelo tem a capacidade de sequenciar

um amplo conjunto de regiões genômicas selecionadas (painel de genes), todos os éxons (exoma) ou mesmo todo o genoma de um indivíduo, simultaneamente.

Com essa metodologia é possível identificar todas as variantes, em relação ao genoma de referência, que um indivíduo possui. Um grande desafio na interpretação desses dados é a tarefa de filtrar essas variantes, a fim de encontrar a variante responsável pelo fenótipo dentre dezenas de milhares de variantes que cada indivíduo possui em relação à referência.

Por exemplo, Jamsheer e col. (2013), utilizando sequenciamento massivo em paralelo do exoma em trios (pai, mãe e filho afetado), identificou uma variante sem sentido no gene *FGF16* no cromossomo X como responsável pelo quadro clínico de fusão metacarpal 4/5. Essa variante estava presente em hemizigose no afetado e havia sido herdada de sua mãe heterozigota. Essa variante foi sequenciada nos demais membros da família por sequenciamento de Sanger.

Em outro exemplo, Allen e col. (2014) identificaram por sequenciamento massivo em paralelo do genoma a perda de material genético no ponto de quebra de uma translocação cromossômica $t(2;7)(p25.1;q22)$ no locus da ectrodactilia do tipo I. Essa deleção de 106 kb inclui um éxon do gene *DYNC1I1*, recentemente identificado também como *enhancer* dos genes *DLX5* e *DLX6*, importantes no processo de desenvolvimento dos membros.

1.3.4 Filtragem de variantes

É estimado que um ser humano saudável possua em média 5 milhões de variantes em relação ao genoma de referência. Embora 99,9% sejam variantes em pequena escala (substituições, pequenas deleções/inserções), um genoma característico da espécie humana contém também de 2100 a 2500 variantes estruturais (1000 *genomes project consortium*, 2015).

Comumente a identificação da variante patogênica se dá por um processo criterioso de exclusão de variantes potencialmente não patogênicas e de inclusão de variantes potencialmente patogênicas. A esse procedimento damos o nome de filtragem de variantes. No processo de filtragem de variantes, a sua busca nos diferentes bancos de dados de sequências humanas como o “Exome Aggregation Consortium” (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>), o “NHLBI Exome Sequencing Project” (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) e o 1000 *genomes project* (<http://www.1000genomes.org/>) é essencial. Quase todas as variantes patogênicas são raras na população, sendo encontradas em frequências inferiores a 0,01.

Em casos familiares de doença, o estudo de ligação é muito útil durante o processo de filtragem das variantes. Com os dados da análise de ligação, pode-se selecionar apenas variantes presentes em regiões candidatas indicadas pelo cálculo de *Lod score*.

A tentativa de predição da patogenicidade de variantes pode ser valiosa no processo de filtragem. Diversos programas disponíveis na rede, cada um utilizando seu próprio algoritmo, fazem essa predição, como o PolyPhen-2 (Adzhubei e col., 2010), o MutationTaster2 (Schwarz e col., 2014), o SIFT (Kumar e col., 2009) e o Provean (Choi e col., 2012). As bases da predição da patogenicidade são o grau de conservação dos resíduos de aminoácidos entre diferentes espécies e a busca da variante em diferentes bancos de dados. Contudo, essa é uma predição *in silico* e é considerável a taxa de erros. Os resultados combinados de múltiplas ferramentas podem aumentar a possibilidade de aferir corretamente a patogenicidade da variante, que pode estar subestimada ou superestimada por uma ferramenta quando utilizada individualmente.

Desse modo, nos dias de hoje, apesar da disponibilidade de inúmeras técnicas sofisticadas de análise do genoma, a interpretação do significado da variação encontrada é um desafio. Estudos clínicos, moleculares e funcionais criteriosos são importantes etapas neste processo.

Embora os genes mais importantes no desenvolvimento de membros já tenham sido descobertos e as vias de sinalização, de uma forma geral, já estejam descritas, ainda existem inúmeras lacunas sobre vias de sinalização da embriogênese dos membros e muitos genes que participam desse processo permanecem obscuros. A descoberta de variantes em genes ainda não relacionados ao desenvolvimento de membros ou a descoberta de novas manifestações clínicas que resultam de variantes em genes já conhecidos têm o potencial de aumentar a nossa compreensão, tanto sobre as vias de sinalização do desenvolvimento quanto sobre a manifestação de determinadas doenças.

2 Conclusões

Na família 1, os resultados apontam que a variante .1037C>G no gene *TP63* é a causa da síndrome EEC. Este estudo contribui para elucidar a complexa correlação fenótipo-genótipo na síndrome EEC. Eles indicam também a possibilidade da variante c.1037C>G no gene *TP63* vir a ser relacionada com a síndrome ADULT e com a ectrodactilia não sindrômica.

Na família 2, os resultados apontam que a variante c.410dupG no gene *SALL4* é a causa da síndrome de Okihiro sem anomalia de Duane. Este estudo também sugere uma possível correlação entre o número de ZFM presentes na proteína truncada e a gravidade dos defeitos de membros inferiores associados à síndrome.

N família 3, baseado na classificação proposta por Malik (2012) e nos achados moleculares, o quadro clínico apresentado pela família aqui estudada se classifica como na sindactilia do tipo IV e tem como causa uma duplicação de aproximadamente 97 kb incluindo o *enhancer* ZRS do gene *SHH*. Esses dados contribuem para expandir a compreensão do espectro de fenótipos resultantes de duplicações que incluem a região ZRS.

Na família 4, concluímos que a ocorrência da síndrome de Santos é plausivelmente explicada pela variante c.934G>A (p.Gly312Ser) em homozigose no gene *WNT7A*. A variante encontrada é alélica às variantes responsáveis pelas síndromes de Fuhrmann e AARRS. O filho do probando manifesta defeitos de membros menos graves como resultado da manifestação branda da variante c.934G>A, em heterozigose. Nossos achados contribuem para ampliar o conhecimento sobre o espectro dos sinais clínicos associados às variantes no gene *WNT7A*.

Referências bibliográficas

- 1000 Genomes Project Consortium**, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):68-74.
- Abecasis GR**, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet*. 2002 Jan;30(1):97-101.
- Adamska M**, MacDonald BT, Sarmast ZH, Oliver ER, Meisler MH. En1 and Wnt7a interact with Dkk1 during limb development in the mouse. *Dev Biol*. 2004 Aug 1;272(1):134-44.
- Adzhubei IA**, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging *missense* mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248-9.
- Aerts S**, Lambrechts D, Maity S, Van Loo P, Coessens B, De Smet F, Tranchevent LC, De Moor B, Marynen P, Hassan B, Carmeliet P, Moreau Y. Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat Biotechnol*. 2006 May;24(5):537-44.
- Aguiar RTS**. Estudos moleculares em famílias com defeitos de membros [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.
- Al-Baradie R**, Yamada K, St Hilaire C, Chan WM, Andrews C, McIntosh N, Nakano M, Martonyi EJ, Raymond WR, Okumura S, Okihiro MM, Engle EC. Duane radial ray syndrome (Okihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *Am J Hum Genet*. 2002 Nov;71(5):1195-9.
- Allen LH**, Caswell R, Xie W, Xu X, Wragg C, Turnpenny PD, Turner CL, Weedon MN, Ellard S. Next generation sequencing of chromosomal rearrangements in patients with split-hand/split-foot malformation provides evidence for DYNC111 exonic enhancers of DLX5/6 expression in humans. *J Med Genet*. 2014 Apr;51(4):264-7.
- Al-Qattan MM**, AlAbdulkareem I, Ballow M, Al Balwi M. A report of two cases of Al-Awadi Raas-Rothschild syndrome (AARRS) supporting that "apparent" Phocomelia differentiates AARRS from Schinzel Phocomelia syndrome (SPS). *Gene*. 2013(C) Sep 15;527(1):371-5.
- Al-Qattan MM**, Shamseldin HE, Al Mazyad M, Al Deghaither S, Alkuraya FS. Genetic heterogeneity in type III familial cutaneous syndactyly and linkage to chromosome 7q36. *Am J Med Genet A*. 2013(A) Jul;161A(7):1579-84.
- Al-Qattan MM**, Shamseldin HE, Alkuraya FS. The WNT7A G204S mutation is associated with both Al-Awadi-Raas Rothschild syndrome and Fuhrmann syndrome phenotypes. *Gene*. 2013(B) Mar 1;516(1):168-70.
- Al-Qattan MM**. Molecular basis of the clinical features of Al-Awadi-Raas-Rothschild (limb/pelvis/uterus-hypoplasia/aplasia) syndrome (AARRS) and Fuhrmann syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Sep;161A(9):2274-80.

- Alves LU**, Pardono E, Otto PA, Mingroni Netto RC. A novel c.1037C > G (p.Ala346Gly) mutation in TP63 as cause of the ectrodactyly-ectodermal dysplasia and cleft lip/palate (EEC) syndrome. *Genet Mol Biol*. 2015 Mar;38(1):37-41.
- Alves LU**, Perez AB, Alonso LG, Otto PA, Mingroni-Netto RC. Novel frameshift variant in gene SALL4 causing Okihiro syndrome. *Eur J Med Genet*. 2016 Feb;59(2):80-5.
- Aro T**, Heinonen OP, Saxén L. Incidence and secular trends of congenital limb defects in Finland. *Int J Epidemiol*. 1982 Sep;11(3):239-44.
- Barham G**, Clarke NM. Genetic regulation of embryological limb development with relation to congenital limb deformity in humans. *J Child Orthop*. 2008 Feb;2(1):1-9.
- Berk DR**, Armstrong NL, Shinawi M, Whelan AJ. ADULT syndrome due to an R243W mutation in TP63. *Int J Dermatol*. 2012 Jun;51(6):693-6.
- Böhm J**, Sustmann C, Wilhelm C, Kohlhase J. SALL4 is directly activated by TCF/LEF in the canonical Wnt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Sep 29;348(3):898-907.
- Borozdin W**, Graham JM Jr, Böhm D, Bamshad MJ, Spranger S, Burke L, Leipoldt M, Kohlhase J. Multigene deletions on chromosome 20q13.13-q13.2 including SALL4 result in an expanded phenotype of Okihiro syndrome plus developmental delay. *Hum Mutat*. 2007 Aug;28(8):830.
- Borozdin W**, Wright MJ, Hennekam RC, Hannibal MC, Crow YJ, Neumann TE, Kohlhase J. Novel mutations in the gene SALL4 provide further evidence for acro-renal-ocular and Okihiro syndromes being allelic entities, and extend the phenotypic spectrum. *J Med Genet*. 2004 Aug;41(8):e102.
- Brassington AM**, Sung SS, Toydemir RM, Le T, Roeder AD, Rutherford AE, Whitby FG, Jorde LB, Bamshad MJ. Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype. *Am J Hum Genet*. 2003 Jul;73(1):74-85.
- Browne G**, Cipollone R, Lena AM, Serra V, Zhou H, van Bokhoven H, Dötsch V, Merico D, Mantovani R, Terrinoni A, Knight RA, Candi E, Melino G. Differential altered stability and transcriptional activity of Δ Np63 mutants in distinct ectodermal dysplasias. *J Cell Sci*. 2011 Jul 1;124(Pt 13):2200-7.
- Carmon KS**, Loose DS. Wnt7a interaction with Fzd5 and detection of signaling activation using a split eGFP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Apr 4;368(2):285-91.
- Celik TH**, Buyukcam A, Simsek-Kiper PO, Utine GE, Ersoy-Evans S, Korkmaz A, Yntema HG, Bodugroglu K, Yurdakok M. A newborn with overlapping features of AEC and EEC syndromes. *Am J Med Genet A*. 2011 Dec;155A(12):3100-3. Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG, van Essen AJ, de Waal R, Vriend G, Haber DA, Yang A, McKeon F, Brunner HG, van Bokhoven H. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*. 1999 Oct 15;99(2):143-53.

- Chen H**, Lun Y, Ovchinnikov D, Kokubo H, Oberg KC, Pepicelli CV, Gan L, Lee B, Johnson RL. Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome. *Nat Genet.* 1998 May;19(1):51-5.
- Chiang C**, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 1996 Oct 3;383(6599):407-13.
- Choi Y**, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 2012;7(10):e46688.
- Clements SE**, Techanukul T, Coman D, Mellerio JE, McGrath JA. Molecular basis of EEC (ectrodactyly, ectodermal dysplasia, clefting) syndrome: five new mutations in the DNA-binding domain of the *TP63* gene and genotype-phenotype correlation. *Br J Dermatol.* 2010 Jan;162(1):201-7.
- Dai L**, Guo H, Meng H, Zhang K, Hu H, Yao H, Bai Y. Confirmation of genetic homogeneity of syndactyly type IV and triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome in a Chinese family and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 2013 Nov;172(11):1467-73.
- David D**, Marques B, Ferreira C, Vieira P, Corona-Rivera A, Ferreira JC, van Bokhoven H. Characterization of two ectrodactyly-associated translocation breakpoints separated by 2.5 Mb on chromosome 2q14.1-q14.2. *Eur J Hum Genet.* 2009 Aug;17(8):1024-33.
- Diehl A**, Mu W, Batista D, Gunay-Aygun M. An atypical 0.73 MB microduplication of 22q11.21 and a novel *SALL4* missense mutation associated with thumb agenesis and radioulnar synostosis. *Am J Med Genet A.* 2015 Jul;167(7):1644-9.
- Duboc V**, Logan MP. Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology. *Dev Dyn.* 2011 May;240(5):1017-27.
- Duchartre Y**, Kim YM, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Mar;99:141-9.
- Evans JA**, Reed MH, Greenberg CR. Fibular aplasia with ectrodactyly. *Am J Med Genet.* 2002 Nov 15;113(1):52-8.
- Eyaid W**, Al-Qattan MM, Al Abdulkareem I, Fetaini N, Al Balwi M. A novel homozygous missense mutation (c.610G>A, p.Gly204Ser) in the *WNT7A* gene causes tetra-amelia in two Saudi families. *Am J Med Genet A.* 2011 Mar;155A(3):599-604.
- Fajardo FKV**, Adams D; NISC Comparative Sequencing Program, Mason CE, Sincan M, Tifft C, Toro C, Boerkoel CF, Gahl W, Markello T. Detecting false-positive signals in exome sequencing. *Hum Mutat.* 2012 Apr;33(4):609-13.
- Fonseca AC**, Bonaldi A, Bertola DR, Kim CA, Otto PA, Vianna-Morgante AM. The clinical impact of chromosomal rearrangements with breakpoints upstream of the *SOX9* gene: two novel de

- novo balanced translocations associated with acampomelic campomelic dysplasia. *BMC Med Genet.* 2013 May 7;14:50. doi: 10.1186/1471-2350-14-50.
- Fraisse J**, Bertheas MF, Frere F, Lauras B, Rolland MO, Brizard CP. Un nouveau syndrome: del(20)(q13-qter). Localisation segmentaire de gene de l'adenosine deaminase (ADA). *Ann Genet.* 1981;24:216-9. *BMC Med Genet.* 2013 May 7;14:50. doi: 10.1186/1471-2350-14-50.
- Fuhrmann W**, Fuhrmann-Rieger A, de Sousa F. Poly-, syn- and oligodactylyl, aplasia or hypoplasia of fibula, hypoplasia of pelvis and bowing of femora in three sibs--a new autosomal recessive syndrome. *Eur J Pediatr.* 1980 Mar;133(2):123-9.
- Fuhrmann W**, Fuhrmann-Rieger A, Jovanović V, Rehder H. A new autosomal recessive skeletal dysplasia syndrome--prenatal diagnosis and histopathology. *Prog Clin Biol Res.* 1982;104:519-24.
- Garavelli L**, Wischmeijer A, Rosato S, Gelmini C, Reverberi S, Sassi S, Ferrari A, Mari F, Zabel B, Lausch E, Unger S, Superti-Furga A. Al-Awadi-Raas-Rothschild (limb/pelvis/uterus-hypoplasia/aplasia) syndrome and WNT7A mutations: genetic homogeneity and nosological delineation. *Am J Med Genet A.* 2011 Feb;155A(2):332-6.
- Genuardi M**, Zollino M, Bellussi A, Fuhrmann W, Neri G. Brachy/ectrodactyly and absence or hypoplasia of the fibula: an autosomal dominant condition with low penetrance and variable expressivity. *Clin Genet.* 1990 Nov;38(5):321-6.
- Grandel H**, Lun K, Rauch GJ, Rhinn M, Piotrowski T, Houart C, Sordino P, Küchler AM, Schulte-Merker S, Geisler R, Holder N, Wilson SW, Brand M. Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development.* 2002 Jun;129(12):2851-65.
- Guerrini L1**, Costanzo A, Merlo GR. A symphony of regulations centered on p63 to control development of ectoderm-derived structures. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:864904.
- Hill RE**. How to make a zone of polarizing activity: insights into limb development via the abnormality preaxial polydactyly. *Dev Growth Differ.* 2007 Aug;49(6):439-48.
- Hu T**, Phiwpan K, Guo J1, Zhang W, Guo J, Zhang Z, Zou M, Zhang X, Zhang J, Zhou X. MicroRNA-142-3p Negatively Regulates Canonical Wnt Signaling Pathway. *PLoS One.* 2016 Jun 27;11(6):e0158432.
- Ianakiev P**, Kilpatrick MW, Toudjarska I, Basel D, Beighton P, Tsipouras P. Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27. *Am J Hum Genet.* 2000 Jul;67(1):59-66.
- Jamsheer A**, Zemojtel T, Kolanczyk M, Stricker S, Hecht J, Krawitz P, Doelken SC, Glazar R, Socha M, Mundlos S. Whole exome sequencing identifies FGF16 nonsense mutations as the cause of X-linked recessive metacarpal 4/5 fusion. *J Med Genet.* 2013 Sep;50(9):579-84.

- Kantaputra PN**, Mundlos S, Sripathomsawat W. A novel homozygous Arg222Trp missense mutation in WNT7A in two sisters with severe Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzell phocomelia syndrome. *Am J Med Genet A*. 2010 Nov;152A(11):2832-7.
- Kengaku M**, Capdevila J, Rodriguez-Esteban C, De La Peña J, Johnson RL, Izpisua Belmonte JC, Tabin CJ. Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*. 1998 May 22;280(5367):1274-7.
- Keupp K**, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, Fischer B, Yigit G, Janda CY, Becker J, Breer S, Altunoglu U, Grünhagen J, Krawitz P, Hecht J, Schinke T, Makareeva E, Lausch E, Cankaya T, Caparrós-Martín JA, Lapunzina P, Temtamy S, Aglan M, Zabel B, Eysel P, Koerber F, Leikin S, Garcia KC, Netzer C, Schönau E, Ruiz-Perez VL, Mundlos S, Amling M, Kornak U, Marini J, Wollnik B. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet*. 2013 Apr 4;92(4):565-74.
- Klopocki E**, Lohan S, Doelken SC, Stricker S, Ockeloen CW, Soares Thiele de Aguiar R, Lezirovitz K, Mingroni Netto RC, Jamsheer A, Shah H, Kurth I, Habenicht R, Warman M, Devriendt K, Kordass U, Hempel M, Rajab A, Mäkitie O, Naveed M, Radhakrishna U, Antonarakis SE, Horn D, Mundlos S. Duplications of BHLHA9 are associated with ectrodactyly and tibia hemimelia inherited in non-Mendelian fashion. *J Med Genet*. 2012 Feb;49(2):119-25.
- Klopocki E**, Ott CE, Benatar N, Ullmann R, Mundlos S, Lehmann K. A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *J Med Genet*. 2008 Jun;45(6):370-5.
- Kohlhase J**, Chitayat D, Kotzot D, Ceylaner S, Froster UG, Fuchs S, Montgomery T, Rösler B. SALL4 mutations in Okihiro syndrome (Duane-radial ray syndrome), acro-renal-ocular syndrome, and related disorders. *Hum Mutat*. 2005 Sep;26(3):176-83.
- Kohlhase J**, Heinrich M, Schubert L, Liebers M, Kispert A, Laccone F, Turnpenny P, Winter RM, Reardon W. Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet*. 2002 Nov 1;11(23):2979-87.
- Kohlhase J**, Schubert L, Liebers M, Rauch A, Becker K, Mohammed SN, Newbury-Ecob R, Reardon W. Mutations at the SALL4 locus on chromosome 20 result in a range of clinically overlapping phenotypes, including Okihiro syndrome, Holt-Oram syndrome, acro-renal-ocular syndrome, and patients previously reported to represent thalidomide embryopathy. *J Med Genet*. 2003 Jul;40(7):473-8.
- Koshiba-Takeuchi K**, Takeuchi JK, Arruda EP, Kathiriya IS, Mo R, Hui CC, Srivastava D, Bruneau BG. Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nat Genet*. 2006 Feb;38(2):175-83.
- Kruglyak L**. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):21-4.
- Kumar P**, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81. Leoyklang P,

- Siriwan P, Shotelersuk V. A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip. *J Med Genet.* 2006 Jun;43(6):e28.
- Lettice LA**, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet.* 2003 Jul 15;12(14):1725-35.
- Lewandoski M**, Sun X, Martin GR. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet.* 2000 Dec;26(4):460-3.
- Lewin SO**, Opitz JM. Fibular a/hypoplasia: review and documentation of the fibular developmental field. *Am J Med Genet Suppl.* 1986;2:215-38.
- Lezirovitz K**, Maestrelli SR, Cotrim NH, Otto PA, Pearson PL, Mingroni-Netto RC. A novel locus for split-hand/foot malformation associated with tibial hemimelia (SHFLD syndrome) maps to chromosome region 17p13.1-17p13.3. *Hum Genet.* 2008 Jul;123(6):625-31.
- Li H**, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754-60.
- Li Y**, Pawlik B, Elcioglu N, Aglan M, Kayserili H, Yigit G, Percin F, Goodman F, Nürnberg G, Cenani A, Urquhart J, Chung BD, Ismail S, Amr K, Aslanger AD, Becker C, Netzer C, Scambler P, Eyaid W, Hamamy H, Clayton-Smith J, Hennekam R, Nürnberg P, Herz J, Temtamy SA, Wollnik B. LRP4 mutations alter Wnt/beta-catenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani-Lenz syndrome. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):696-706.
- Lindahl VE**, Garcia EL, Mills AA. An allelic series of Trp63 mutations defines TAp63 as a modifier of EEC syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013 Aug;161A(8):1961-71.
- Lo Iacono N**, Mantero S, Chiarelli A, Garcia E, Mills AA, Morasso MI, Costanzo A, Levi G, Guerrini L, Merlo GR. Regulation of Dlx5 and Dlx6 gene expression by p63 is involved in EEC and SHFM congenital limb defects. *Development.* 2008 Apr;135(7):1377-88.
- Lohan S**, Spielmann M, Doelken SC, Flöttmann R, Muhammad F, Baig SM, Wajid M, Hülsemann W, Habenicht R, Kjaer KW, Patil SJ, Girisha KM, Abarca-Barriga HH, Mundlos S, Klopocki E. Microduplications encompassing the Sonic hedgehog limb enhancer ZRS are associated with Haas-type polysyndactyly and Laurin-Sandrow syndrome. *Clin Genet.* 2014 Oct;86(4):318-25.
- Lorda-Diez CI**, Garcia-Riart B, Montero JA, Rodriguez-León J, Garcia-Porrero JA, Hurle JM. Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging (Albany NY).* 2015 Nov;7(11):974-85.
- Malik S**. Syndactyly: phenotypes, genetics and current classification. *Eur J Hum Genet.* 2012 Aug;20(8):817-24.
- Manouvrier-Hanu S**, Florence P, Holder-Espinasse H, Escande-Narducci F. Limb development anomalies: Genetics. *LS.JohnWiley&Son, Ltd:Chichester.* 2012 Jan.
- Maquat LE**. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Feb;5(2):89-99.

- Mariani FV**, Ahn CP, Martin GR. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):401-5.
- Mercader N**, Leonardo E, Piedra ME, Martínez-A C, Ros MA, Torres M. Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development*. 2000 Sep;127(18):3961-70.
- Merlo GR**, Paleari L, Mantero S, Genova F, Beverdam A, Palmisano GL, Barbieri O, Levi G. Mouse model of split hand/foot malformation type I. *Genesis*. 2002 Jun;33(2):97-101.
- Miertus J**, Borozdin W, Freceer V, Tonini G, Bertok S, Amoroso A, Miertus S, Kohlhase J. A SALL4 zinc finger missense mutation predicted to result in increased DNA binding affinity is associated with cranial midline defects and mild features of Okihiro syndrome. *Hum Genet*. 2006 Mar;119(1-2):154-61.
- Miettinen M**, Wang Z, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Biernat W, Lasota J, Lee YS. SALL4 expression in germ cell and non-germ cell tumors: a systematic immunohistochemical study of 3215 cases. *Am J Surg Pathol*. 2014 Mar;38(3):410-20.
- Miller JR**. The Wnts. *Genome Biol*. 2002;3(1):REVIEWS3001.
- Mills AA**, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):708-13.
- Montavon T**, Le Garrec JF, Kerszberg M, Duboule D. Modeling Hox gene regulation in digits: reverse collinearity and the molecular origin of thumbness. *Genes Dev*. 2008 Feb 1;22(3):346-59.
- Monti P**, Russo D, Bocciardi R, Foggetti G, Menichini P, Divizia MT, Lerone M, Graziano C, Wischmeijer A, Viadiu H, Ravazzolo R, Inga A, Fronza G. EEC- and ADULT-associated TP63 mutations exhibit functional heterogeneity toward P63 responsive sequences. *Hum Mutat*. 2013 Jun;34(6):894-904.
- Naiche LA**, Papaioannou VE. Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development*. 2003 Jun;130(12):2681-93.
- Niederreither K**, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*. 2002 Aug;129(15):3563-74.
- Niswander L**. Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet*. 2003 Feb;4(2):133-43.
- Oberg KC**, Feenstra JM, Manske PR, Tonkin MA. Developmental biology and classification of congenital anomalies of the hand and upper extremity. *J Hand Surg Am*. 2010 Dec;35(12):2066-76.
- Pajni-Underwood S**, Wilson CP, Elder C, Mishina Y, Lewandoski M. BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development*. 2007 Jun;134(12):2359-68.

- Paradisi I**, Arias S. IVIC syndrome is caused by a c.2607delA mutation in the SALL4 locus. *Am J Med Genet A*. 2007 Feb 15;143(4):326-32.
- Parr BA**, Avery EJ, Cygan JA, McMahon AP. The classical mouse mutant postaxial hemimelia results from a mutation in the Wnt 7a gene. *Dev Biol*. 1998 Oct 15;202(2):228-34.
- Pereira RJS**, Abreu LC, Valenti VE, Albuquerque WDM, Pereira SC, Araújo R, Ferreira Neto ML, Santos SM. Frequência de Malformações Congênitas das Extremidades em Recém- Nascidos. *Rev Bras Crescimento Desenvol Hum*. 2008; 18(2): 155-162.
- Pfeiffer RA**, Stöss H, Voight HJ, Wündisch GF. Absence of fibula and ulna with oligodactyly, contractures, right-angle bowing of femora, abnormal facial morphology, cleft lip/palate and brain malformation in two sibs: a possibly new lethal syndrome. *Am J Med Genet*. 1988 Apr;29(4):901-8.
- Pineault KM**, Wellik DM. Hox genes and limb musculoskeletal development. *Curr Osteoporos Rep*. 2014 Dec;12(4):420-7.
- Rallis C**, Bruneau BG, Del Buono J, Seidman CE, Seidman JG, Nissim S, Tabin CJ, Logan MP. Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development*. 2003 Jun;130(12):2741-51.
- Reisler TT**, Patton MA, Meagher PP. Further phenotypic and genetic variation in ADULT syndrome. *Am J Med Genet A*. 2006 Nov 15;140(22):2495-500.
- Restelli M**, Lopardo T, Lo Iacono N, Garaffo G, Conte D, Rustighi A, Napoli M, Del Sal G, Perez-Morga D, Costanzo A, Merlo GR, Guerrini L. DLX5, FGF8 and the Pin1 isomerase control $\Delta Np63\alpha$ protein stability during limb development: a regulatory loop at the basis of the SHFM and EEC congenital malformations. *Hum Mol Genet*. 2014 Jul 15;23(14):3830-42.
- Richardson RJ**, Dixon J, Malhotra S, Hardman MJ, Knowles L, Boot-Handford RP, Shore P, Whitmarsh A, Dixon MJ. Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat Genet*. 2006 Nov;38(11):1329-34.
- Riddle RD**, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993 Dec 31;75(7):1401-16.
- Rinne T**, Hamel B, van Bokhoven H, Brunner HG. Pattern of p63 mutations and their phenotypes--update. *Am J Med Genet A*. 2006 Jul 1;140(13):1396-406.
- Rodini ES**, Richieri-Costa A. EEC syndrome: report on 20 new patients, clinical and genetic considerations. *Am J Med Genet*. 1990 Sep;37(1):42-53.
- Roelfsema NM**, Cobben JM. The EEC syndrome: a literature study. *Clin Dysmorphol*. 1996 Apr;5(2):115-27.
- Rogala EJ**, Wynne-Davies R, Littlejohn A, Gormley J. Congenital limb anomalies: frequency and aetiological factors. Data from the Edinburgh Register of the Newborn (1964-68). *J Med Genet*. 1974 Sep;11(3):221-33.

- Sakaki-Yumoto M**, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R. The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development*. 2006 Aug;133(15):3005-13.
- Santos S**, Kok F, Weller M, de Paiva FR, Otto PA. Inbreeding levels in Northeast Brazil: Strategies for the prospecting of new genetic disorders. *Genet Mol Biol*. 2010 Apr;33(2):220-3.
- Santos SC**, Pardono E, Ferreira da Costa MI, de Melo AN, Graciani Z, de Albuquerque e Souza AC, Lezirovitz K, Thiele-Aguiar RS, Mingroni-Netto RC, Opitz JM, Kok F, Otto PA. A previously undescribed syndrome combining fibular agenesis/hypoplasia, oligodactylous clubfeet, anonychia/ungual hypoplasia, and other defects. *Am J Med Genet A*. 2008 Dec 15;146A(24):3126-31.
- Scherz PJ**, McGlinn E, Nissim S, Tabin CJ. Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev Biol*. 2007 Aug 15;308(2):343-54.
- Schwarz JM**, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014 Apr;11(4):361-2.
- Sekine K**, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1):138-41.
- Sharpe J**, Lettice L, Hecksher-Sorensen J, Fox M, Hill R, Krumlauf R. Identification of sonic hedgehog as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant Sasquatch. *Curr Biol*. 1999 Jan 28;9(2):97-100.
- Sievers F**, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011 Oct 11;7:539.
- Staal FJ**, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol*. 2008 Aug;8(8):581-93.
- Stratford T**, Horton C, Maden M. Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Curr Biol*. 1996 Sep 1;6(9):1124-33.
- Summerbell D**. A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol*. 1974 Dec;32(3):651-60.
- Sun Y**, Liu R, Zhao G, Zheng M, Sun Y, Yu X, Li P, Wen J. Genome-wide linkage analysis and association study identifies loci for polydactyly in chickens. *G3 (Bethesda)*. 2014 Apr 21;4(6):1167-72.
- te Welscher P**, Zuniga A, Kuijper S, Drenth T, Goedemans HJ, Meijlink F, Zeller R. Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):827-30.

- Temtam SA**, McKusick VA: Syndactyly. In: *The Genetics of Hand Malformations*. New York: Alan R Liss, 1978; 301–322.
- Terhal P**, Rösler B, Kohlhase J. A family with features overlapping Okihiro syndrome, hemifacial microsomia and isolated Duane anomaly caused by a novel SALL4 mutation. *Am J Med Genet A*. 2006 Feb 1;140(3):222-6.
- Tonkin MA**. Failure of differentiation part I: Syndactyly. *Hand Clin*. 2009 May;25(2):171-93.
- Uez N**, Lickert H, Kohlhase J, de Angelis MH, Kühn R, Wurst W, Floss T. Sall4 isoforms act during proximal-distal and anterior-posterior axis formation in the mouse embryo. *Genesis*. 2008 Sep;46(9):463-77.
- van Bokhoven H**, Hamel BC, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PH, Vanmolkot KR, van Beusekom E, van Beersum SE, Celli J, Merkx GF, Tenconi R, Fryns JP, Verloes A, Newbury-Ecob RA, Raas-Rotschild A, Majewski F, Beemer FA, Janecke A, Chitayat D, Crisponi G, Kayserili H, Yates JR, Neri G, Brunner HG. p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*. 2001 Sep;69(3):481-92.
- van Bokhoven H**, Melino G, Candi E, Declercq W. p63, a story of mice and men. *J Invest Dermatol*. 2011 Jun;131(6):1196-207.
- VanderMeer JE**, Lozano R, Sun M, Xue Y, Daentl D, Jabs EW, Wilcox WR, Ahituv N. A novel ZRS mutation leads to preaxial polydactyly type 2 in a heterozygous form and Werner mesomelic syndrome in a homozygous form. *Hum Mutat*. 2014 Aug;35(8):945-8.
- Vasluian E**, van der Sluis CK, van Essen AJ, Bergman JE, Dijkstra PU, Reinders-Messelink HA, de Walle HE. Birth prevalence for congenital limb defects in the northern Netherlands: a 30-year population-based study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013 Nov 16;14:323.
- Wang B**, Sinha T, Jiao K, Serra R, Wang J. Disruption of PCP signaling causes limb morphogenesis and skeletal defects and may underlie Robinow syndrome and brachydactyly type B. *Hum Mol Genet*. 2011 Jan 15;20(2):271-85.
- Wang K**, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data *Nucleic Acids Research*, 38:e164, 2010
- Weller M**, Tanieri M, Pereira JC, Almeida Edos S, Kok F, Santos S. Consanguineous unions and the burden of disability: a population-based study in communities of Northeastern Brazil. *Am J Hum Biol*. 2012 Nov-Dec;24(6):835-40.
- Wieczorek D**, Pawlik B, Li Y, Akarsu NA, Caliebe A, May KJ, Schweiger B, Vargas FR, Balci S, Gillissen-Kaesbach G, Wollnik B. A specific mutation in the distant sonic hedgehog (SHH) cis-regulator (ZRS) causes Werner mesomelic syndrome (WMS) while complete ZRS duplications underlie Haas type polysyndactyly and preaxial polydactyly (PPD) with or without triphalangeal thumb. *Hum Mutat*. 2010 Jan;31(1):81-9.

- Woods CG**, Stricker S, Seemann P, Stern R, Cox J, Sherridan E, Roberts E, Springell K, Scott S, Karbani G, Sharif SM, Toomes C, Bond J, Kumar D, Al-Gazali L, Mundlos S. Mutations in WNT7A cause a range of limb malformations, including Fuhrmann syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006 Aug;79(2):402-8.
- Wu L**, Liang D, Niikawa N, Ma F, Sun M, Pan Q, Long Z, Zhou Z, Yoshiura K, Wang H, Sato D, Nishimura G, Dai H, Zhang X, Xia J. A ZRS duplication causes syndactyly type IV with tibial hypoplasia. *Am J Med Genet A.* 2009 Feb 15;149A(4):816-8.
- Wu Q**, Chen X, Zhang J, Loh YH, Low TY, Zhang W, Zhang W, Sze SK, Lim B, Ng HH. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2006 Aug 25;281(34):24090-4.
- Yang MM**, Ho M, Lau HH, Tam PO, Young AL, Pang CP, Yip WW, Chen L. Diversified clinical presentations associated with a novel sal-like 4 gene mutation in a Chinese pedigree with Duane retraction syndrome. *Mol Vis.* 2013 May 6;19:986-94.
- Yu P**, Yang W, Han D, Wang X, Guo S, Li J, Li F, Zhang X, Wong SW, Bai B, Liu Y, Du J, Sun ZS, Shi S, Feng H, Cai T. Mutations in WNT10B Are Identified in Individuals with Oligodontia. *Am J Hum Genet.* 2016 Jul 7;99(1):195-201.
- Zeller R**, López-Ríos J, Zuniga A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet.* 2009 Dec;10(12):845-58.
- Zhang J**, Tam WL, Tong GQ, Wu Q, Chan HY, Soh BS, Lou Y, Yang J, Ma Y, Chai L, Ng HH, Lufkin T, Robson P, Lim B. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol.* 2006 Oct;8(10):1114-23.

Referências de portais da *internet*

- 1000 *genomes project*, www.1000genomes.org/ (último acesso em Abr/2016)
- ExAC, exac.broadinstitute.org (último acesso em Abr/2016)
- GeneCard, www.genecards.org/ (último acesso em Jun/2016)
- KEGG pathway database, www.genome.jp/kegg/pathway.html (último acesso em Jan/2013)
- MGI, www.informatics.jax.org/ (último acesso em Jun/2016)
- NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ (último acesso em Jun/2016)
- NHLBI-ESP, evs.gs.washington.edu/EVS (último acesso em Abr/2016)
- OMIM, www.omim.org/ (último acesso em Jun/2016)
- UCSC, genome.ucsc.edu/ (último acesso em Jan/2016)