Letícia Alves da Rocha

Estudo genômico de indivíduos com deficiência congênita de membros

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Débora Romeo Bertola

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Leticia Alves da
Estudo genômico de indivíduos com deficiência
congenita de membros / Leticia Alves da Rocha. --
São Paulo, 2021.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Débora Romeo Bertola.

Descritores: 1.Deformidades congênitas dos
membros 2.Anomalias congênitas 3.Sequenciamento de
nucleotídeos em larga escala 4.Genética 5.Genética
médica 6.Análise de sequência de DNA 7.Síndrome

USP/FM/DBD-152/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha mãe Cláudia, ao meu pai Edson e ao meu irmão Pedro.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Cláudia e Edson e meu irmão Pedro, por todo o apoio durante toda a minha vida. Agradeço toda dedicação e empenho dos meus pais por me fazer ser a pessoa que sou hoje, por serem meu porto seguro e não soltarem minha mão em momento algum. Ao meu irmão pelo companheirismo e amor desde o dia em que nos tornamos irmãos.

Aos meus amigos que eu ganhei durante a vida, que me acompanham, me amparam e torcem por mim desde os tempos de escola. Agradeço por serem minha família escolhida durante a vida.

Aos meus amigos do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco e do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, em especial aos do Laboratório 200, por me acolherem e me receberem tão bem no dia a dia de trabalho. Por me ajudarem sempre que eu precisei e por compartilharem comigo os diversos assuntos pessoais e profissionais que compartilhamos.

Aos amigos que ganhei no mestrado e com certeza levarei para a minha vida, Gabriela, Sofia, Joyce, Lylyan, Fred, Agatha, Eduarda, Camila, por me inspirarem no ramo profissional, sempre me apoiando e incentivando, e por preencherem meu lado pessoal com tanto amor e amizade. Agradeço imensamente ao mestrado por ter me dado estes presentes.

Aos médicos e residentes da Unidade de Genética do ICr - HC/FMUSP, com os quais foi possível montar minha casuística. Agradeço o trabalho impecável que exercem no ambulatório de genética do ICr com todos os pacientes.

Ao grupo do serviço de sequenciamento do Genoma, por tornar possível a realização desta dissertação, realizando os sequenciamentos com maestria, sempre muito solícitos e companheiros.

Aos pacientes e familiares pertencentes a minha casuística, sem os quais não seria possível este estudo e que se disponibilizam prontamente de acordo com o caminhar do nosso estudo.

Por fim, agradeço imensamente a dra. Débora Romeo Bertola, orientadora deste trabalho, o qual eu tive o prazer de realizar. Agradeço por toda a orientação e paciência, por todos os debates e conversas e por nunca se negar a me ajudar. Não poderia escolher orientadora melhor, como pessoa e como profissional. Sou eternamente grata por estes 3 anos de mestrado, me incentivando, me guiando e me ensinando muito. Muito obrigada!

Sumário

Lista de Abreviações e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1.	Introdução	1
1.1.	Embriologia	2
1.1.1.	Eixo proximal-distal	3
1.1.2.	Eixo ântero-posterior	4
1.1.3.	Eixo dorso-ventral	6
1.2.	Classificações das DCM	7
1.3.	Aspectos clínicos	11
1.3.1.	Formas sindrômicas de DCM.....	12
1.3.2.	Formas não sindrômicas de DCM.....	14
1.4.	Aspectos etiológicos.....	15
1.5.	Alterações cromossômicas: aneuploidias	17
1.6.	Alterações cromossômicas: microduplicação e microdeleção	17
1.7.	Herança mendeliana: Alterações monogênicas.....	18
2.	Objetivos	22
2.1.	Objetivos gerais.....	22
2.2.	Objetivos específicos.....	22
3.	Casuística e Métodos	23
3.1.	Casuística.....	23
3.2.	Avaliação clínico-radiológica	23
3.3.	Classificações.....	24
3.4.	Técnicas moleculares	25
3.4.1.	Extração de DNA.....	26
3.4.2.	<i>Microarray</i> genômico (<i>array-CGH</i>).....	26
3.4.3.	Sequenciamento tradicional de Sanger	27
3.4.4.	Sequenciamento de nova geração (NGS).....	29
3.5.	Análise estatística.....	32
4.	Resultados	33

4.1.	Dados demográficos.....	33
4.2.	Achados clínicos e classificações.....	33
4.2.1.	Formas sindrômicas.....	34
4.2.2.	Formas não-sindrômicas	37
4.3.	Achados genômicos.....	42
4.3.1.	Estudos cromossômicos	42
4.3.2.	Sequenciamento de Sanger.....	42
4.3.3.	Sequenciamento de nova geração	44
4.3.4.	Análise de CNVs.....	47
5.	Discussão.....	62
5.1.	Dados epidemiológicos e características clínicas gerais	62
5.2.	Resultados gerais das análises moleculares na DCM	65
5.3.	Formas sindrômicas clássicas associadas a DCM	69
5.3.1.	Síndrome de Holt-oram e diferentes variantes intragênicas	69
5.3.2.	Síndrome TAR e diferentes polimorfismos	71
5.3.3.	Genodermatoses e anomalias de membros: a síndrome de Rothmund-Thomson e CHILD	73
5.3.4.	Genes da via de sinalização WNT/ β catenina e DCM grave.....	74
5.4.	Síndromes recentemente descritas, ainda em delineamento: síndrome de Richieri-Costa-Pereira, AFD tipo Cincinnati, síndrome de Verheij e síndrome Coats plus.....	79
5.4.1.	Disostoses acrofaciais.....	79
5.4.2.	Síndrome de Verheij.....	81
5.4.3.	Síndrome Coats plus.....	82
5.5.	Formas não-sindrômicas associadas às DCMs	84
5.5.1.	Síndrome SHFLD	84
5.5.2.	Formas não-sindrômicas sem etiologia genética conhecida	86
6.	Conclusão	89
7.	Anexos.....	91
8.	Referências.....	98

Lista de Abreviações e Siglas

ABraOM – Arquivo Brasileiro Online de Mutações

ACMG – Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (*American College of Medical Genetics and Genomics*)

AD – Autossômica dominante

AER – Crista ectodérmica apical (*apical ectodermal ridge*)

AFD – *Acrofacial dysostosis*

AR – Autossômico recessivo

Aus. – Ausente

BMP – Proteína morfogenética óssea (*Bone morphogenetic protein*)

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CHILD – *Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects*

CNV – Variações no número de cópias (*Copy number variation*)

CRMCC – *Cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts*

D. – Danosa

DCM – Deficiência congênita de membros

DEB. – *Diepoxibutano*

ECLAMC – Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênicas

EDTA – Ácido etileno diaminotetracético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

Esp. – Esporádica

F. – Família

FATCO – *Fibular aplasia, tibial campomelia, and oligosyndactyly*

FFS – *Femoral facial syndrome*

FFU – *Femur-fibula-ulna*

FGF – Fatores de crescimento de fibroblasto (*Fibroblast growth factors*)

FISH – Hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluorescence in situ hybridization*)

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Freq. Pop. – Frequência populacional

FS – *Fuhrmann syndrome*

HC – Hospital das Clínicas

HER COMP – Herança composta

Het. – Heterozigose

HET COMP – Heterozigose composta

Homo. – Homozigose

IB – Instituto de Biociências

IGV – *Integrative Genomic Viewer*

ICr – Instituto da Criança

LIM – Laboratório de Investigação Médica

LPM – Placa lateral mesodérmica (*Lateral plate mesoderm*)

LX – Ligada ao cromossomo X

MDR – Região mínima deletada (*Minimum deleted region*)

MLPA - Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (*Multiplex ligation dependent probe amplification*)

MURCS – *Müllerian duct aplasia–renal agenesis–cervicothoracic somite dysplasia*

N. – Neutra

NGS – Sequenciamento de nova geração (*Next generation sequencing*)

NMD – Decaimento do mRNA mediado por variantes nonsense (*mRNA Nonsense-mediated decay*)

OMIM – Banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man*

Pat. – Patogênica

PCR – *Polymerase chain reaction*

PP – Provavelmente patogênica

RA – Ácido retinóico (*Retinoic acid*)

SHFLD – *Split hand/foot malformation with long bone deficiency*

SHFM – *Split hand/foot malformation*

SHH – *Sonic hedgehog*

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphisms*)

TAD – Domínios de Associação Topológica (*Topologically associating domain*)

TAR – *Thrombocytopenia with absent radius*

UCSC – Universidade da Califórnia Santa Cruz (*University of California Santa Cruz*)

USP – Universidade de São Paulo

VACTERL – *Vertebral defects, anal atresia, cardiac defects, tracheo-esophageal fistula, renal anomalies, and limb abnormalities*

VUS – Variante de significado incerto (*Variant of uncertain significance*)

XHMM – *eXome-Hidden Markov Model*

ZPA – Zona de atividade de polarização (*Zone of polarizing activity*)

ZRS – *ZPA regulatory sequence*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Grupo 39 da Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas Genéticas - hipoplasia de membros/defeito de redução (modificado de Mortier et al., 2019 e atualizado em março de 2021)	9
Tabela 2. Síndromes monogênicas clássicas de deficiências de membros associadas a ossos específicos (modificado de Wilcox et al., 2015 e atualizado em março de 2021)	20
Tabela 3. Primers desenhados para as regiões exônicas do gene <i>WNT7A</i> e para a região <i>ZRS</i> , localizada no íntron cinco do gene <i>LMBR1</i>	28
Tabela 4. Dados gerais, classificações, principais achados clínicos e hipótese diagnóstica da casuística	39
Tabela 5. Testes genéticos utilizados, variantes encontradas e frequências e classificações das variantes	56
Tabela 6. Variantes reportadas na literatura descritas em <i>WNT7A</i>	76

Lista de Figuras

Figura 1. Variabilidade clínico-radiológica na Síndrome de Holt-Oram: A1-3) F15.1 aos 6 meses com agenesia do polegar esquerdo e hipoplasia do direito, além de sinostose rádio-ulnar bilateral; B1-3) F15.3 (primo materno de F15.1), adulto sem anormalidades dos ossos do eixo radial (B1-2) e hipoplasia da região tenar (B3); C1-3) F16.1, RX aos 2 anos mostrando agenesia bilateral do polegar (C1 e C3), com sinostose rádio-ulnar bilateralmente (C2).....	35
Figura 2. Síndrome de TAR: A1) F4: caso isolado; B1 e B2) F6.1 e F6.2: gemelares no período neonatal; C1 e C2) F5.1 e F5.2, irmãos com 5 anos e 6 meses e 3 anos, respectivamente. Todos os indivíduos apresentam agenesia radial bilateral, com preservação dos polegares.....	36
Figura 3. Formas sindrômicas com envolvimento de membros superiores e inferiores: A1-A4) Síndrome de Roberts (F1): envolvimento simétrico, generalizado dos membros; B1-B6 e C1-C5) F11 e F12 respectivamente, com diagnósticos de disostoses acrofaciais, com envolvimento assimétrico dos membros. Em C4 e C5, observa-se com polidactilia pré-axial em mãos e pés com háluces trifalangeanos.....	37
Figura 4. DCM isolados com acometimento de múltiplos ossos: A1 e A2) F24 – FS, com envolvimento particularmente acentuado dos membros inferiores, com hipoplasia e encurvamento dos fêmures e ausência das fíbulas; B1-B3) F26 – síndrome FFU, com agenesia da fíbula, ulna e rádio; C1 e C2) F30 – FFS, com hipoplasia proximal do fêmur, agenesia de rádio e ulna do lado direito e oligossindactilia na mão esquerda; D1 e D2) F32 – síndrome FATCO, com hipoplasia da fíbula, encurvamento anterior da tíbia e oligodactilia; E1 e E2) F34 – Acometimento eixo central, ectrodactilia; F1-F3) F35.1 – SHFLD, com ectrodactilia em membros superiores e agenesia da tíbia bilateral.....	38
Figura 5. Resultado do estudo cromossômico com banda C no indivíduo F1	42
Figura 6. Sequenciamento Sanger dos éxons um e quatro do gene <i>WNT7A</i> nos genitores do probando F24: A) Variante encontrada no éxon um do gene <i>WNT7A</i> (c.1A>G) (no probando e pai); B) Variante encontrada no éxon quatro do gene <i>WNT7A</i> (c.931C>A) (no probando e mãe).....	43
Figura 7. Sequenciamento Sanger do éxon quatro do gene <i>TBX5</i> em F15.1 (probando), F15.2 (mãe) e F15.3 (primo materno) evidenciando a variante c.246_247insA	43
Figura 8. Gel de agarose do sequenciamento Sanger do probando F11, comparado com controles exibindo repetições diferentes, três e sete repetições (consideradas normais) e 14 e 16 repetições, consideradas alteradas.....	44
Figura 9. Irmãos com diagnóstico de Coats-Plus. A1 e A2) F13.1 com defeito longitudinal pré-axial bilateral; B1-B3) Tomografia computadorizada de crânio mostrando calcificações cerebrais em núcleos da base em F13.2, associado a defeito pré-axial	46
Figura 10. Sequenciamento Sanger dos éxon 12 e 15 do gene <i>CTC1</i> em F13.1 (probando), F13.2 (irmão) e pais: A) Variante no éxon 12 do gene <i>CTC1</i> (c.1946-1G>C), (em F13.1, F13.2 e mãe); B) Variante no éxon 15 do gene <i>CTC1</i> (c.2611 G>A), (em F13.1, F13.2 e pai)	47
Figura 11. Visualização pelo <i>Genome Browser</i> da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC - https://genome.ucsc.edu) da região duplicada do gene <i>TBX5</i> , englobando o íntron seis, éxon seis e íntron sete, presente no probando F16.1	48
Figura 12. Resultado molecular de F4: A) <i>Array</i> genômico apresentando uma microdeleção de 445 kb em 1q21.1 contendo o gene <i>RBM8A</i> ; B) Painel genômico analisado pelo <i>software</i> IGV identificando o polimorfismo rs139428292	49

Figura 13. Resultado molecular de F5.1: A) <i>Array</i> genômico apresentando uma microdeleção de 381 kb em 1q21.1 contendo o gene <i>RBM8A</i> ; B) Painei genômico analisado pelo <i>software</i> IGV identificando os polimorfismos rs59285351 e rs12079762	50
Figura 14. Resultado de painei genômico identificando a deleção contendo o gene <i>RBM8A</i> , presente na mãe de F5.1 e F5.2, por meio de análise realizada com <i>software</i> XHMM.....	50
Figura 15. Resultado molecular de F6.1 e F6.3: A) <i>Array</i> genômico apresentando uma microdeleção de 195 kb em 1q21.1 contendo o gene <i>RBM8A</i> em F6.3; B) Painei genômico analisado pelo <i>software</i> IGV identificando os polimorfismos rs59285351 e rs12079762 em F6.1 e F6.3.....	51
Figura 16. Resultado de painei genômico identificando a microdeleção em 1q21.1 através de <i>software</i> NextGene em F6.1 e F6.3.....	51
Figura 17. Visualização pelo <i>Genome Browser</i> da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC - https://genome.ucsc.edu) da microduplicação englobando o gene <i>BHLHA9</i> presente na família do probando F35.1	52
Figura 18. Heredogramas dos casos com recorrência nas famílias estudadas com comprovação molecular: A) F5 (síndrome TAR); B) F6 (síndrome TAR); C) F13 (síndrome de Coats plus); D) F15 (síndrome de Holt-Oram); E) F16 (síndrome de Holt-Oram); F) F35 (SHFLD).....	55

Resumo

Rocha LA. *Estudo genômico de indivíduos com deficiência congênita de membros* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A deficiência congênita de membros (DCM) é uma das anomalias congênitas mais comuns e caracteriza-se por uma hipoplasia ou aplasia de um ou mais ossos dos membros. A DCM apresenta uma heterogeneidade ampla, com aspectos etiológicos abrangendo fatores genéticos diversos e/ou fatores ambientais. Pode se apresentar como um achado isolado ou estar associado a outras anomalias congênitas. O objetivo do estudo foi caracterizar as bases genéticas e avaliar os achados clínico-radiológicos de um grupo de indivíduos com DCM. A casuística foi composta por 44 indivíduos, pertencentes a 35 famílias, que apresentavam acometimento de múltiplos ossos longos ou um único osso longo associado a outras anomalias congênitas e/ou oligodactilia. Os indivíduos foram classificados em formas isoladas ou sindrômicas, pela localização do acometimento nos membros e pelo comprometimento anatômico. Os estudos moleculares empregados foram direcionados para a hipótese clínica aventada e, na ausência de uma hipótese, ou na eventualidade de não haver uma etiologia conhecida, foram realizados o sequenciamento de nova geração (NGS) e o *array* genômico. Na casuística, o grau de acometimento dos membros foi variável, sendo mais prevalente o envolvimento dos membros superiores e os defeitos longitudinais, particularmente pré e pós-axial. Dentre os ossos acometidos, houve um maior acometimento do rádio (77,3%) e da fíbula (80%) nos membros superiores e inferiores, respectivamente. As formas sindrômicas foram predominantes (65,7%), com uma hipótese clínica estabelecida em 74% dos casos, incluindo síndromes reconhecidamente associadas a DCM, como a síndrome de Rothmund-Thomson (quatro casos) e as síndromes TAR e Holt-Oram, com três casos cada. Em 16 probandos da casuística (45,7%) foram encontradas variantes intragênicas ou uma variação do número de cópias (CNV)s, 14 no grupo sindrômico e dois no grupo dos não sindrômicos, incluindo a confirmação na maioria dos casos com uma hipótese clínica aventada. Esta maior detecção no grupo das formas sindrômicas (60,8%), comparada com o grupo apenas com anomalias dos membros (16,7%), foi estatisticamente

significante, mostrando a efetividade das técnicas empregadas, particularmente o NGS, nas formas sindrômicas. Variantes novas não reportadas previamente na literatura foram encontradas nos genes *NSDHL*, *CTC1*, *PUF60*, *TBX5* e *WNT7A*, ampliando o espectro de variantes associadas a estes genes. Dentre os achados encontrados nas formas sindrômicas clássicas destacam-se dois deles: a presença de uma classe de variante rara, uma duplicação intragênica em *TBX5*, na síndrome de Holt-Oram e a presença de dois polimorfismos novos, um deles na região 3'UTR do gene *RBM8A*, recentemente descrito na literatura em indivíduos de origem africana, em dois dos três indivíduos analisados com a síndrome TAR. Neste caso, este achado enfatiza as diferenças nas frequências alélicas de variantes comuns e a necessidade de estudos em populações menos representadas globalmente e com grande miscigenação, como a brasileira. Em duas síndromes recentemente descritas, a síndrome Coats plus e Verheij, nas quais a DCM não é considerada um achado cardinal, a presença do defeito pré-axial nos dois indivíduos avaliados sugere que este achado possa ser mais comum, a depender das coortes avaliadas. Dentre as formas não sindrômicas, variantes foram encontradas no gene *WNT7A* – o qual pertence a uma das vias importantes para o desenvolvimento dos membros – confirmando a hipótese de síndrome de Fuhrmann em um indivíduo e em uma duplicação de *BHLHA9* em seis indivíduos de uma família com mãos e pés fendidos com deficiência de osso longo (apenas três com expressão fenotípica, demonstrando uma penetrância incompleta). No grupo de oito indivíduos com diagnósticos clínicos de síndromes sem etiologia genética conhecida, mesmo com o uso de análises amplas, incluindo o sequenciamento do exoma do trio e análise de CNVs, não foi possível identificar uma causa genética. O estudo da etiologia genética na DCM é um desafio dada a complexidade de fenótipos distintos associados a esta anomalia congênita, assim como o não conhecimento das bases genéticas em diversas formas isoladas, não-sindrômicas.

Descritores: Deformidades congênitas dos membros; Anomalias congênitas; Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; Genética; Genética médica; Análise de sequência de DNA; Síndrome.

Abstract

Rocha LA. *Genomic study of individuals with congenital limb deficiency* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Congenital limb deficiency (CLD) is one of the most common congenital anomalies and it is characterized by hypoplasia or aplasia of one or more limb bones. CLD presents great heterogeneity, with etiologic aspects comprising diverse genetic and/or environmental factors. CLD may present as an isolated finding or be associated with other congenital anomalies. The objective of this study was to characterize the genetic basis and to evaluate the clinical and radiological findings of a group of individuals with CLD. The cohort included 44 individuals, belonging to 35 families, that presented involvement of multiple long bones or only one long bone associated with other congenital anomalies and/or oligodactyly. The individuals were classified in isolated or syndromic forms, by the location of the involvement in the limbs and the anatomic commitment. The molecular studies employed were directed to the raised clinical hypothesis and, in the absence of a hypothesis, or in the event that there is no known genetic etiology, next-generation sequencing (NGS) and genomic array were performed. In the cohort, the degree of limb involvement was variable, with the upper limbs being more frequently involved, as well as longitudinal defect, particularly pre and post-axial. Among the affected bones, there was a greater involvement of the radius (77,3%) and fibula (80%) in the upper and lower limbs, respectively. Syndromic forms were predominant (65,7%), with a clinical hypothesis established in 74% of the cases, including classical syndromes known to be associated with CLD – such as Rothmund-Thomson syndrome (four cases) and TAR and Holt-Oram syndromes, with three cases each. In 16 probands (45,7%) intragenic variants or copy number variations (CNV)s were detected, 14 in the syndromic group and two in the non-syndromic group, including the confirmation in the majority of the cases with a raised clinical hypothesis. This higher detection rate in syndromic group (60,8%) compared to the group with only limb anomalies (16,7%), was statistically significant, showing the effectiveness of the techniques employed, particularly NGS in the syndromic group. Novel variants, previously not reported in the literature, were found in *NSDHL*, *CTC1*, *PUF60*, *TBX5* and

WNT7A, broadening the spectrum of variants associated with these genes. Among the findings in classic, syndromic forms, two of them stand out: the presence of a rare class of variant, an intragenic duplication in *TBX5*, in Holt-Oram syndrome and the detection of two new polymorphisms, one of them in 3'UTR region in *RBM8A*, recently described in the literature in individuals with an African origin, in two out of three individuals analyzed with TAR syndrome. In this case, this finding emphasizes the differences in allelic frequencies of common variants and the necessity of studies in population less globally represented and highly admixed, as the Brazilian population. In two recently reported syndromes, Coats plus and Verheij, in which CLD is not considered a hallmark, the presence of pre-axial defects in two individuals in this study suggests that this skeletal finding could be more prevalent, depending of the evaluated cohort. Within the non-syndromic group, variants were detected in *WNT7A* gene – which belongs to one important pathway for limb development – confirming the hypothesis of Fuhrmann syndrome in one individual and a duplication of *BHLHA9* in six individuals of one family with split hand and foot with long bone deficiency (just three with phenotypic expression, demonstrating an incomplete penetrance). In the group of eight individuals with a clinical diagnosis of syndromes without a known genetic etiology, even the use of comprehensive analyzes including exome sequencing of the trio and CNVs analysis, did not allow the identification of a genetic cause. The study of the genetic etiology in CLD is challenging caused by the complexity of distinct phenotypes associated with this congenital anomaly, as well as the lack of genetic bases in several isolated, non-syndromic forms.

Descriptors: Limb deformities, Congenital; Congenital abnormalities; High-throughput nucleotide sequencing; Genetics; Genetics, Medical; Sequence analysis, DNA; Syndrome.

1. Introdução

As anomalias congênitas maiores são definidas como fenótipos anatômicos que apresentam um desvio substancial do observado na população de referência e com um impacto significativo na saúde ou na aparência, no momento da avaliação, em um momento prévio, ou futuro (Hennekam et al., 2013). Nas últimas décadas, tem ocorrido uma diminuição global na taxa de óbitos em crianças abaixo dos 5 anos, particularmente em decorrência de um melhor controle das doenças infecto-contagiosas. Desta forma, a categoria das anomalias congênitas destaca-se com uma contribuição relativamente maior e que requer atenção em saúde pública (Glinianaia et al., 2020). Estimativas mostram que em torno de 7,9 milhões de crianças nascem com anomalias congênitas ao ano em todo o mundo (Bermejo-Sánchez & Posada de la Paz, 2017).

A deficiência congênita de membros (DCM) é uma das anomalias congênitas mais comuns. Estudos epidemiológicos realizados em diferentes países, vários deles baseados em registros de anomalias congênitas em geral, mostram prevalências que variam, na grande maioria, entre 5 a 7/10.000 nascimentos, incluindo dados da América Latina através do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), com uma prevalência estimada de 5.9/10.000 nascimentos (Bedard et al., 2015).

A DCM caracteriza-se por uma hipoplasia ou aplasia de um ou mais ossos dos membros, sendo o acometimento dos membros superiores duas vezes maior do que o envolvimento dos membros inferiores e, em geral, bilateral, particularmente dentre os casos sindrômicos (Bergman et al., 2020; James et al., 2004). A DCM pode ser um achado isolado ou estar associada a outras anomalias congênitas, constituindo ou não síndromes clinicamente reconhecidas (Le & Scott-Wyard, 2015; Wilcox et al., 2015).

O impacto das anomalias congênitas maiores em geral, é muitas vezes abordado durante o período da lactância, mostrando um impacto na sobrevida, refletindo-se na taxa de mortalidade infantil. Um menor número de estudos avalia a sobrevida no longo prazo e o impacto na qualidade de vida desses indivíduos com anomalias congênitas. Na DCM, estudos bem conduzidos realizados nos

Estados Unidos e no Reino Unido mostraram diferenças na sobrevida quando levado em consideração a localização do defeito, se em membro superior ou inferior. Nos Estados Unidos, a sobrevida em crianças aos 5 e 8 anos foi semelhante, ao redor de 87 a 89%, englobando tanto as anomalias isoladas, como aquelas com outras malformações associadas. Já no Reino Unido, em um estudo com um menor número de indivíduos com DCM e sem outras anomalias associadas, a sobrevida observada foi maior no grupo com anomalias de membros superiores (99%), quando comparada com membros inferiores (93%) após um ano de idade (Glinianaia et al., 2020). A DCM, além de levar a um comprometimento físico, funcional, também causa um impacto estético, com repercussões psicológicas. Os membros superiores, os mais frequentemente acometidos, são requeridos para a maior parte das atividades diárias, além de atuarem na comunicação e na demonstração de afeto. No caso dos membros inferiores, a DCM pode comprometer a marcha, em alguns casos requerendo o uso de cadeira de rodas (Johansen et al., 2015). Crianças com DCM requerem um maior número de hospitalizações, realizações de procedimentos cirúrgicos ortopédicos, além de terapias de apoio para reabilitação. A depender do nível do acometimento do membro, o uso de próteses pode melhorar a funcionalidade ou ser utilizada por razões estéticas (Johansen et al., 2015; Syvänen et al., 2019). Em um estudo realizado na Noruega com 97 indivíduos adultos (mediana de idade de 39 anos) com DCM, a maioria (79.3%) com anomalia do membro superior unilateral, os autores observaram desdobramentos na qualidade de vida desses indivíduos, seja na saúde, com uma alta frequência de dor crônica e utilização de serviços de fisioterapia; seja no trabalho, com um impacto na jornada de trabalho, utilização de programas sociais para pessoas com deficiências e obtenção de aposentadorias em idade mais precoce (Johansen et al., 2015).

1.1. Embriologia

O desenvolvimento embrionário dos membros requer uma série complexa e orquestrada de comandos e vias de sinalizações para que esses membros se formem adequadamente durante o desenvolvimento. Os membros começam a

se desenvolver no embrião na 4ª semana e prosseguem até a 8ª semana pós-fertilização. O período mais crítico para a ocorrência de anomalias dos membros ocorre entre a 4ª e a 6ª semana, devido à rápida proliferação tecidual neste período (Le & Scott-Wyard, 2015).

O desenvolvimento dos membros se inicia a partir de células mesenquimais não diferenciadas na placa lateral mesodérmica (LPM), cobertas por epitélio, os quais são posicionados em regiões determinadas do embrião, e originarão a divisão dos membros em superiores e inferiores. É fundamental que a orientação do crescimento dos membros esteja correta, assim como a polaridade na sinalização entre eles (Saunders & Gasseling, 1968; Tickle, 2015; Verheyden & Sun, 2017). A partir da LPM, o tecido mesodérmico irá induzir a formação do tecido epitelial ectodérmico na ponta do broto, a crista ectodérmica apical (AER) (Jin et al., 2019; Tickle, 2000).

O padrão de desenvolvimento a partir do broto do membro ocorre em três eixos: eixo proximal-distal, do tronco do corpo à ponta dos dedos e controlado pela AER; eixo ântero-posterior, do polegar ao dedo mínimo, regulado pela zona de atividade de polarização (ZPA); e por fim, o eixo dorso-ventral, do dorso à palma da mão, tendo como centro de comando a ectoderme dorsal (Delgado & Torres, 2017). Desde a identificação destes centros de sinalização, estudos demonstram que há uma interação entre eles, a qual se mostra fundamental para o correto desenvolvimento do membro (Fernandez-Teran & Ros, 2008).

1.1.1. Eixo proximal-distal

O eixo proximal-distal, eixo longo, define a sequência de crescimento dos segmentos do membro (cintura, coxa/braço, perna/antebraço, tornozelo/pulso e pés/mãos) (Petit et al., 2017). Durante o desenvolvimento do membro no eixo proximal-distal, o ácido retinóico (RA) é responsável por sinais iniciais na região proximal. Posteriormente, o eixo sofre a influência, no decorrer de seu crescimento e desenvolvimento, de fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) e da sinalização da via Sonic Hedgehog (Shh) na região distal (Mercader et al., 2000). O RA age ainda na redefinição da expressão de *SHH*, e na duração de sua expressão (Chinnaiya et al., 2014).

Fatores de crescimento, como FGF2, FGF4, FGF8 e FGF10, são importantes durante o desenvolvimento e crescimento dos membros. FGF8 e FGF10 são expressos em fase inicial, antes da indução de AER. FGF8 está presente durante a iniciação do crescimento do membro, ao passo que FGF10 participa da regulação da transição de epitélio mesenquimal em somatopleura (Jin et al., 2019; Ornitz & Marie, 2015). Já FGF4, também relacionado aos padrões de crescimento dos membros, influencia na velocidade do desenvolvimento, além de poder exercer o papel de AER e, com adição do FGF2, agir tanto na manutenção do crescimento correto dos membros, como também na correta expressão gênica (Hara et al., 1998). A sinalização de FGF é consolidada como o principal fator relacionado às funções desempenhadas por AER, molecular e embriologicamente (Verheyden & Sun, 2017).

Outra via relacionada com processos de desenvolvimento, como proliferação e sobrevivência celular, é a via de sinalização Notch. Pesquisas estabelecem a relação da sinalização Notch, envolvendo *NOTCH1*, desempenhando um importante papel na manutenção de FGF8 em AER com a regulação de apoptose celular (Francis et al., 2005). Distúrbios nesta via podem causar deformidades ósseas (Zieba et al., 2020).

Os genes *HOX* também apresentam importante papel durante o desenvolvimento regulatório dos membros e suas respectivas posições ao longo do eixo proximal-distal. Pesquisadores mostraram, por meio de pesquisas em animais, que alterações nos genes *HOXA* e *HOXD* podem resultar em redução dos membros, provenientes da baixa regulação de Shh (Crossley et al., 1996). Genes *HOX* também podem induzir a ação de T-box 5 nos membros superiores e T-box 4 nos membros inferiores (Basson et al., 1997; Bongers et al., 2004).

1.1.2. Eixo ântero-posterior

O eixo ântero-posterior define a diferenciação do primeiro ao quinto dígito e apresenta, como centro de sinalização, a ZPA, a qual é controlada pela via morfogênica Shh (Petit et al., 2017; Riddle et al., 1993).

A expressão de *SHH* é controlada por um *enhancer* denominado ZPA *regulatory sequence* (*ZRS*) presente na região intrônica do gene *LMBR1*, a 1 Mb

de distância do gene *SHH*, requerendo a formação de uma alça da cromatina para a interação deste *enhancer* com o promotor de *SHH* (Lettice et al., 2003; Xiang et al., 2017; Young & Tabin, 2017).

ZRS regula a expressão de *SHH* na região ZPA, na porção distal posterior que ocorre no início do desenvolvimento do membro. Mutações em regiões específicas de *ZRS* já foram relacionadas a fenótipos graves de deficiência de ossos longos (Furniss et al., 2008; Petit et al., 2017).

O controle da expressão de *SHH* também tem o auxílio de sinais dorsais de *WNT7A* (Parr & Mc Mahon, 1995). *WNT7A* está localizado na região ectodérmica dorsal e apresenta duas vias de sinalização importantes: via β -catenina, via canônica, e uma segunda via não-canônica. A via canônica está relacionada com a condrogênese do membro. A interação da β -catenina com fatores de transcrição, resulta na manutenção de *SHH* na ZPA. Esta manutenção é fundamental no padrão de crescimento do eixo ântero-posterior, indução de FGF4, relacionado ao eixo proximal-distal, e indução de componentes do grupo *HOX*, para correto crescimento do membro (Adamska et al., 2004; Parr & Mc Mahon, 1995). Na via não canônica, a expressão de *LMX-1* está relacionada ao desenvolvimento das estruturas dorsais da mão (Kengaku et al., 1998). *LMX-1* é expresso nas células mesênquimas da região dorsal do membro e auxilia na dorsalização da ectoderme, bem como na orientação do padrão dorsal (Riddle et al., 1995). Pesquisadores mostraram que outros genes do grupo *WNT* também podem estar relacionados com o desenvolvimento dos membros. *WNT3*, necessário na formação de AER, e *WNT3A*, expresso na ectoderme, são fundamentais para um desenvolvimento normal do membro (Barrow et al., 2003). Além de ambos os componentes do grupo *WNT*, por fim, há também a expressão de *WNT5* e *WNT5A* no controle da desdiferenciação de células em estágios iniciais da regeneração do membro, os quais são expressos, portanto, na região distal do broto do membro (Al-Qattan, 2011; Ghosh et al., 2008).

Já os genes do grupo *HOX5* mostraram-se fundamentais no desenvolvimento da região anterior dos membros superiores (Xu et al., 2013), enquanto *HOX9*, é fundamental no desenvolvimento da região posterior dos membros superiores e da polarização ântero-posterior destes membros (Xu & Wellik, 2011).

1.1.3. Eixo dorso-ventral

O eixo dorso-ventral define a diferenciação do extensor ao flexor, do dorso para a palma e planta das mãos e pés, respectivamente. Esta sinalização ocorre através do ectoderma dorsal, que cobre os lados dos membros e é regulada por *WNT7A* da família *WNT* (Tickle, 2000). Muitos genes estão relacionados a coordenação do desenvolvimento desse eixo, os quais estão sobre controle de elementos regulatórios como *promoters* e *enhancers*. Embora as vias de sinalização relacionadas com o desenvolvimento dos membros sejam conservadas, muitas diferenças morfológicas são observadas entre as espécies, explicitando assim o importante papel dos genes na regulação deste processo (Petit et al., 2017).

O eixo dorso-ventral é governado por sinais diferentes presentes em sua polarização. Sinais de *bone morphogenetic proteins* (BMPs) estão relacionados ao crescimento do lado ventral e da regulação do fator de transcrição *Engrailed 1* (EN1), necessário no desenvolvimento do eixo dorso-ventral, enquanto a sinalização de *WNT7A*, se relaciona ao lado dorsal do eixo (Huettl et al., 2015; Loomis et al., 1996; Parr & Mc Mahon, 1995; Pizette et al., 2001).

Apesar dos eixos apresentarem padrões de crescimento e desenvolvimento que envolvem diferentes fatores moleculares, algumas regulações podem estar relacionadas entre estes eixos. O eixo proximal-distal apresenta diferentes partes do seu segmento relacionadas com partes específicas do desenvolvimento do eixo ântero-posterior. Desta forma, partes mais proximais estão relacionadas aos ossos úmero e fêmur, um segmento médio, com rádio, tíbia, ulna ou fíbula, e em sua parte mais distal, tarsos, metatarsos e dedos. Portanto, todas as vias estão interligadas entre si para a formação final dos membros em três dimensões (Delgado & Torres, 2017). Os centros de sinalização ZPA e AER, apesar de serem centros responsáveis por diferentes eixos dos membros, estão diretamente interligados em diferentes aspectos. Algumas interações acontecem entre todos os três eixos durante o desenvolvimento dos membros. Apesar de AER ser responsável pela sinalização ao longo do eixo proximal-distal, o eixo ântero-posterior influencia na anatomia

e expressão gênica de AER, enquanto o controle de sua localização ocorre através do eixo dorso-ventral (Delgado & Torres, 2017).

1.2. Classificações das DCM

Pela complexidade na avaliação da DCM, diversos sistemas de classificação foram propostos por grupos distintos de especialistas desde a década de 60, não havendo um consenso de qual seria o ideal (Lowry & Bedard, 2016). No entanto, vários especialistas convergem para a classificação das DCMs nas categorias intercalar, transversal terminal e longitudinal. Segundo Gold e colaboradores (2011), a primeira etapa é avaliar se a deficiência de membros inclui a ausência total (amelia) ou uma ausência parcial do membro. Essas anomalias parciais se subdividem em intercalar, transversal terminal e longitudinal, sendo que dentro desta última categoria, há uma subdivisão em pré-axial, central e pós-axial (Gold et al., 2011).

Os defeitos intercalares são definidos pela ausência ou hipoplasia de ossos longos da sessão central do membro, não ocorrendo alteração em estruturas distais. Estes defeitos podem ocorrer em ossos, como o fêmur ou o rádio, com preservação das estruturas distais.

As alterações transversais terminais são definidas pelo nível da amputação, com ausência das estruturas distais, a partir de certo ponto localizado perpendicularmente ao membro. Algumas regiões foram previamente identificadas como específicas para ocorrência de deficiências transversais, nos membros superiores e inferiores, como as articulações metacarpo-falangeanas e metatarso-falangeanas, região medial da mão e pé, punho e tornozelo, antebraço e perna e braço e coxa nos membros superiores e inferiores, respectivamente. A região terminal destas deficiências pode apresentar uma estrutura lisa, com fossetas, ou mesmo com pequenos apêndices, estruturas que se assemelham a dedos rudimentares (Wilcox et al., 2015). Os defeitos transversais são os mais prevalentes, sendo que sua etiologia é atribuída, através de estudos clínicos e em modelos animais, a disrupções vasculares. A exposição durante o período gestacional a fatores ambientais com ação vasoativa, como cigarro, álcool e medicamentos, também foram avaliados como

possíveis fatores que levariam a disrupções vasculares e DCM transversais. Em um estudo caso-controle realizado entre 1997 e 2011 nos Estados Unidos, avaliando fatores ambientais em casos isolados de DCM transversais terminais, Adrien e colaboradores (2020) observaram uma associação com o uso de substâncias com ação vasoconstrictoras, como cigarros e descongestionantes. O uso combinado de ambas aumentava em mais de duas vezes o risco para esta anomalia congênita (Adrien et al., 2020). Por fim, as alterações longitudinais, ausência ou hipoplasia de ossos paralelamente ao eixo longo do membro, são divididas em subgrupos, de acordo com o acometimento no eixo ântero-posterior em pré-axial (envolvimento do eixo radial), central, pós-axial (eixo ulnar) e combinada, com acometimento de estruturas tanto pré, como pós-axiais (Gold et al., 2011). Dentre as alterações longitudinais, as deficiências pré-axiais (eixo radial) são as mais comuns dentre as DCM, com uma prevalência estimada em 1 em 10.000 nascimentos. O acometimento do eixo radial tem um grau variável de apresentação, abrangendo desde uma hipoplasia e/ou agenesia do polegar até a hipoplasia/agenesia do osso longo do eixo, o rádio (Elmakky et al., 2015; Sevilla-Montoya et al., 2017).

As deficiências pós-axiais (eixo ulnar) têm como principal característica o acometimento da ulna. Estas deficiências são muito raras, a forma menos comum de deficiência congênita longitudinal, com frequência de um em cada 50.000 a 100.000 nascidos vivos. Ao longo dos anos, pesquisas foram realizadas com o objetivo de melhor classificar as deficiências do eixo ulnar, nas quais foi observada uma prevalência maior de hipoplasia da ulna, ao invés de ausência total deste osso, com acometimento bilateral nas formas não-sindrômicas (Al-Qattan et al., 2010; Al-Qattan & Al-Thunyan, 2015).

Outra classificação utilizada na prática da Genética Médica, mais ampla, engloba todas as doenças esqueléticas genéticas. Na última versão da nomenclatura internacional de doenças esqueléticas de 2019 (*International Nomenclature of Constitutional Diseases of Bone*), inicialmente proposta em 1970 e atualizada nove vezes neste período (Mortier et al., 2019), foram incluídas 461 doenças, agrupadas em 42 grupos de acordo com critérios clínicos, moleculares, bioquímicos e/ou radiográficos. As deficiências de membros estão agrupadas no grupo 39 (hipoplasia de membros - defeito de redução). O grupo 39 é constituído por 28 doenças distintas, incluindo aquelas com etiologia

genética definida (67,8%) e outras sem base molecular conhecida até o momento (32,2%), conforme a Tabela 1. Apesar de outro grupo (40) incluir uma forma específica de anomalia de membros, as ectrodactilias, uma condição particular com deficiência do eixo central, a malformação de mãos e pés fendidos com deficiência de osso longo (SHFLD – OMIM #612576) está presente no grupo 39 nesta nova classificação.

Tabela 1. Grupo 39 da Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas Genéticas - hipoplasia de membros/defeito de redução (modificado de Mortier et al., 2019 e atualizado em março de 2021)

Síndrome	Etiologia/padrão de herança	Gene responsável
Ulnar-mamária (OMIM #181450)	Monogênica (AD)	<i>TBX3</i>
Cornelia de Lange (OMIM #122470)	Monogênica (AD, LX)	<i>NIPBL</i> (AD) <i>SMC1A</i> (LX) <i>SMC3</i> (AD) <i>RAD21</i> (AD) <i>HDAC8</i> (LX)
Pancitopenia de Fanconi (OMIM #227650)	Monogênica (AR)	Diversos genes <i>FANCA</i> (mais prevalente)
Trombocitemia com defeito distal dos membros (OMIM #187950)	Monogênica (AD)	<i>THPO</i>
Holt-Oram (OMIM #142900)	Monogênica (AD)	<i>TBX5</i>
Okihiro (OMIM #607323)	Monogênica (AD)	<i>SALL4</i>
Cousin (OMIM #260660)	Monogênica (AR)	<i>TBX15</i>
Roberts (OMIM #268300)	Monogênica (AR)	<i>ESCO2</i>

Werner (OMIM #188740)	Monogênica (AD)	<i>SHH</i>
Aqueiropodia (OMIM #200500)	Monogênica (AR)	<i>LMBR1</i>
Tetra-amelia (OMIM #273392)	Monogênica (AR)	<i>WNT3</i> <i>RSP02</i>
Al-Awadi/Raas-Rothschild (AARRS) (OMIM #276820)	Monogênica (AR)	<i>WNT7A</i>
Fuhrmann (FS) (OMIM #228930)	Monogênica (AR)	<i>WNT7A</i>
RAPADILINO (OMIM #266280)	Monogênica (AR)	<i>RECQL4</i>
Adams-Oliver (OMIM #100300)	Monogênica (AD, AR)	<i>ARHGAP31</i> (AD) <i>DOCK6</i> (AR) <i>RBPJ</i> (AD) <i>EOGT</i> (AR) <i>NOTCH1</i> (AD) <i>DLL4</i> (AD)
Pé torto com ou sem deficiência de ossos longos e/ou polidactilia em espelho (OMIM #119800)	Monogênica (AD)	<i>PITX1</i>
Gollop – Wolfgang (OMIM #228250)	Microduplicação em 17p13.3	<i>BHLHA9</i>
SHFLD	Microduplicação em 17p13.3	<i>BHLHA9</i>
Trombocitopenia com ausência do rádio (TAR)	Herança composta	<i>RBM8A</i> (microdeleção em 1q21.1 ou uma variante de perda

(OMIM #274000)		de função em <i>RBM8A</i> , em <i>trans</i> com um alelo comum, hipomórfico)
Hemimelia tibial (OMIM #275220)	Sem etiologia definida (AR)	-
Poland (OMIM #173800)	Sem etiologia definida (ESP, AD)	-
Femoral-Facial (FFS) (OMIM #134780)	Sem etiologia definida (ESP)	-
Aplasia Fibular, Campomelia Tibial, Oligossindactilia (FATCO) (OMIM #246570)	Sem etiologia definida (ESP, AD?)	-
Fêmur, Fíbula, Ulna – FFU (OMIM #228200)	Sem etiologia definida (ESP)	-
Hanhart (OMIM #103300)	Sem etiologia definida (AD)	-
Displasia escápulo-ilíaca (OMIM #169550)	Sem etiologia definida (AD)	-
Sirenomelia	Sem etiologia definida (ESP)	-
Defeitos terminal transversal (OMIM #102650)	Sem etiologia definida (ESP)	-

AR: autossômica recessiva; AD: autossômica dominante; LX: ligada ao cromossomo X; ESP: esporádica; OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

1.3. Aspectos clínicos

As manifestações clínicas na DCM variam consideravelmente, a depender do número de ossos acometidos e de sua localização. Nas formas sindrômicas, outros achados, esqueléticos ou de outros órgãos e sistemas, podem estar presentes, sendo que algumas síndromes apresentam acometimento preferencial de um determinado grupo ósseo.

1.3.1. Formas sindrômicas de DCM

As formas sindrômicas de DCM abrangem deficiências nos membros em associação com anomalias de outros órgãos e/ou sistemas. Podem constituir síndromes clinicamente reconhecidas, associações ou sequências.

Uma síndrome é definida por um padrão de anomalias, com pelo menos uma destas alterações morfológicas, comprovadamente ou supostamente determinadas por uma etiologia comum. Ao passo que uma associação é definida pela presença de um padrão de anomalias, com pelo menos duas delas morfológicas, ocorrendo com uma frequência maior do que a esperada ao acaso e sem uma causa identificada (Hennekam et al., 2013).

Diversos estudos, em diferentes países, mostraram que indivíduos com DCM podem apresentar pelo menos uma outra anomalia congênita maior, ao redor de 50%. Os achados associados mais comuns incluem as anomalias dos sistemas cardiovascular, nervoso, urogenital e gastrointestinal (Klungsoyr et al., 2019; Stoll et al., 2010). No registro de anomalias congênitas da região de Alberta, no Canadá (*Alberta Congenital Anomalies Surveillance System*), no período de 1980 a 2012, cerca de 56,4% do registro de casos de deficiência de membros apresentava anomalias associadas. Nos indivíduos com a forma sindrômica de DCM, os membros superiores, e o lado direito, foram os mais afetados. As anomalias associadas foram de diferentes sistemas, dentre eles, o sistema musculoesquelético, o cardiovascular e o gastrointestinal (Bedard et al., 2015, 2018). Wilcox et al. (2015) também mostraram que os membros superiores, particularmente as deficiências do eixo radial, são as mais frequentemente associadas a causas genéticas e relacionadas a outras anomalias congênitas.

Dentre as síndromes com um padrão monogênico de herança associadas a defeitos radiais, as mais frequentes são a síndrome de Cornelia de Lange, a pancitopenia de Fanconi, a síndrome de Holt-Oram e a síndrome TAR (Wilcox et al., 2015). Dentre estas, a síndrome de Holt-Oram, causada por mutação em heterozigose no gene *TBX5*, apresenta alterações nos membros superiores associadas a lesão cardíaca congênita, particularmente defeitos septais (Chrysosostomidis et al., 2014). Já a síndrome TAR é caracterizada por apresentar agenesia/hipoplasia de rádio com presença de polegares, além de trombocitopenia transitória (Albers et al., 2013).

Uma associação que aparece como uma das causas de DCM pré-axial é a associação VACTERL (OMIM #192350), acrônimo referente aos seguintes achados: anomalias Vertebrais, atresia ou estenose Anal, anomalias Cardíacas, fístula Traqueo-Esofágica, anomalias Radiais e Renais e anomalia de membros – *Limb*. Embora não haja critérios mínimos estabelecidos para o diagnóstico desta associação, normalmente os clínicos e pesquisadores estabelecem o diagnóstico pela presença de pelo menos três dos achados, particularmente requerendo a presença de achados menos comuns, como malformações anorretais e atresia de esôfago com fístula traqueo-esofágica. Ainda, o diagnóstico é muitas vezes feito após serem excluídas condições que apresentam uma sobreposição clínica e uma causa definida (Solomon, 2018).

Outro exemplo é a associação MURCS (OMIM #601076), caracterizada por anomalias dos ductos de Müller, anomalia Renal, anomalias dos Somitos da região Cervical (Hennekam et al., 2013; Kim et al., 2019). A etiologia ainda é desconhecida, apesar das malformações encontradas sugerirem defeitos envolvendo a fase da embriogênese (Bjørsum-Meyer et al., 2016; Hofstetter et al., 2008).

Dentre as síndromes com acometimento de diversos membros, uma das mais comuns é a síndrome de Roberts (Wilcox et al., 2015), decorrente de variantes bialélicas em *ESCO2* e caracterizada por tetrafocomelia, anomalias craniofaciais, alterações cardíacas e renais, e deficiência intelectual e de crescimento (Schneeberger et al., 2020). A síndrome com acometimento dos quatro membros, tetraamelia (OMIM #273392), pode apresentar outras características como fenda lábio/palatina bilateral, defeito de diafragma, hipoplasia da pélvis, dentre outras. Variantes bialélicas em dois genes já foram

associados a esta síndrome: *WNT3* e *RSPO2* (Niemann et al., 2004; Szenker-Ravi et al., 2018).

1.3.2. Formas não sindrômicas de DCM

As formas não sindrômicas de DCM englobam condições, na maioria dos casos, sem etiologia definida, muitas vezes tratando-se de casos isolados nas famílias e, portanto, com maior dificuldade no diagnóstico clínico.

Dentre as formas não sindrômicas, destacam-se as seguintes condições: a síndrome FFU e FATCO, ambas sem etiologia conhecida, e as síndromes FS e AARRS, estas últimas, doenças monogênicas, decorrentes de variantes bialélicas em *WNT7A*.

Originalmente, o termo FFU era utilizado para descrever alterações que englobavam uma ausência de parte do fêmur, ausência da fíbula e malformações no eixo pós-axial (ulnar). Posteriormente, achados com alterações de fêmur e fíbula, mas ulna não acometida, passaram a ser incluídos na síndrome FFU. Atualmente, a síndrome FFU é caracterizado como defeitos congênitos de fêmur, fíbula e/ou ulna (Kalaycioglu & Aynaci, 2001; Ludwig et al., 2010).

Devido à sobreposição clínica entre FATCO e outras síndromes, como FS ou AARRS, o gene *WNT7A*, relacionado às duas síndromes, foi estudado como possível gene candidato para FATCO, e posteriormente, excluído como causa etiológica da síndrome (Abdalla & El-Beheiry, 2017; Bieganski et al., 2012).

Mãos e pés fendidos (*Split hand/foot malformation* (SHFM) OMIM #183600) são alterações de membros que resultam em redução dos raios centrais, com uma expressividade variável e penetrância incompleta, normalmente associadas com anomalias genéticas e desregulação de genes relacionados à função e manutenção de AER. Dentre as diversas associações envolvendo SHFM, uma delas apresenta deficiência de osso longo, particularmente da tíbia (SHFLD). Esta associação decorre de ganhos no número de cópias do gene *BHLHA9*, gerando um aumento no nível de apoptose em AER. A dosagem gênica pode alterar a gravidade do fenótipo, assim como o controle da expressão gênica influencia no adequado crescimento do membro (Klopocki et al., 2012; Paththinige et al., 2019). Pesquisas recentes em

camundongos mostraram que *BHLHA9* é expresso na região ectodérmica, face ventral e dorsal, próximo a AER, e sua expressão acontece nos estágios iniciais da fase embrionária. Testes realizados a partir do bloqueio de *BHLHA9* mostraram alterações na regulação e expressão de genes, como *TP63*, um gene comumente associado a ectrodactilia associada ou não a outras anomalias congênitas (Kataoka et al., 2018).

1.4. Aspectos etiológicos

As deficiências de membros constituem um grupo complexo, heterogêneo de doenças, abrangendo desde anomalias cromossômicas, doenças monogênicas, associações e sequências, até exposição a teratógenos e disrupções vasculares, embora, em diversas situações, não se consiga identificar o fator etiológico (Bergman et al., 2020).

Diferentes estudos mostraram que a probabilidade de se obter um diagnóstico etiológico aumenta na presença de mais de um membro acometido, quando comparado com um único membro; quando o defeito for em um único membro, mas este estiver associado a malformações em outros órgãos/sistemas e na eventualidade de envolvimento bilateral em casos de defeitos longitudinais pré-axiais (Bergman et al., 2020; James et al., 2004). Quanto ao emprego de testes genéticos, a maior positividade foi obtida no grupo de defeitos longitudinais pré-axiais (48%) e centrais (38%) com acometimento de múltiplos membros (Bergman et al., 2020).

Dentre os fatores não genéticos, destaca-se o uso de medicamentos/drogas ilícitas no período pré-natal, além de traumas e realização de diagnóstico pré-natal por biópsia de vilocorial em idade gestacional precoce (Holmes, 2002). Entre eles, a talidomida é um exemplo que ganhou muito destaque na década de 60 e, na atualidade, é um medicamento utilizado no Brasil particularmente para o tratamento de hanseníase. Seu uso durante o período gestacional precoce pode causar DCM, particularmente defeitos pré-axial e intercalar bilateral, além de outras anomalias, como anotia/microtia, anoftalmia/microftalmia, defeitos cardíacos, geniturinários e gastrintestinais (Vargesson, 2015; Vianna et al., 2011). Outros exemplos incluem os

medicamentos anti-convulsivantes, como a fenitoína, que pode causar malformações mais brandas como hipoplasia dos dedos dos pés e das mãos e ácido valpróico, ocasionado defeitos pré-axiais (Holmes et al., 2001; Rodríguez-Pinilla et al., 2000); o misoprostol, um sintético análogo à prostaglandina E1, utilizado como um protetor gástrico, apresenta um efeito potente na contração uterina, tendo sido empregado como um método abortivo. Na eventualidade de não ocorrer a perda fetal, esta medicação pode ocasionar defeitos transversais nos membros, além de outros achados, como a sequência de Moebius e a artrogripose, em decorrência de disrupções vasculares (Gonzalez et al., 1998). O uso de cocaína, por apresentar um efeito vasoconstritor, foi considerado como um fator que poderia levar a anomalia de membros por uma disrupção vascular durante o período gestacional, mas estudos adicionais ainda são necessários para estabelecer uma relação causal (Holmes, 2002; Hoyme et al., 1990; Marles et al., 2003). Além dos medicamentos/drogas ilícitas, condições maternas como o diabetes materno insulino-dependente, também é um fator etiológico da DCM, destacando-se malformações raras de membros inferiores, como a polidactilia pré-axial e a sirenomelia, fusão completa ou parcial de ambas as pernas (Martinez-Frias, 1994). Baseado em estudos que apontam fatores vasculares como uma possível causa da DCM, Ordal e colaboradores (2016) mostraram uma associação entre trombofilia materna e DCM do tipo transversal (Ordal et al., 2016).

De forma semelhante, diversos fatores genéticos também podem causar deficiências congênitas de membros. Esta etiologia é implicada principalmente na presença de anomalias bilaterais e/ou simétricas, além de associação com outras anomalias. Dois grupos etiológicos principais se destacam: as anomalias cromossômicas e as doenças mendelianas ou monogênicas (Gold et al., 2011; Tayel et al., 2005). Nesta última categoria, alguns genes são mais diretamente relacionados às DCM por estarem presentes nas vias de sinalização embriologicamente importantes para o desenvolvimento dos membros, ou por apresentarem funções importantes em vascularização ou coagulação (Browne et al., 2012).

1.5. Alterações cromossômicas: aneuploidias

As aneuploidias são alterações no número dos cromossomos os quais não são múltiplos do conjunto haploide, como as trissomias e as monossomias. Dentre as aneuploidias envolvendo os cromossomos autossômicos que podem ser observadas ao nascimento, compatíveis com uma sobrevivência pós-natal, destaca-se a trissomia do cromossomo 18, síndrome de Edwards, a qual pode apresentar defeito longitudinal pré-axial (Hixson et al., 2015; Wilcox et al., 2015). O principal teste genético utilizado para a confirmação de um diagnóstico de uma anomalia cromossômica clássica, como a síndrome de Edwards em recém-nascidos, é o estudo cromossômico com banda G (Hixson et al., 2015).

1.6. Alterações cromossômicas: microduplicação e microdeleção

No grupo 39 da classificação atualizada de Mortier e colaboradores (2019), das 28 doenças listadas, duas (7,1%) decorrem de microdeleções/microduplicações cromossômicas, também conhecidas como *Copy number variation* (CNVs), envolvendo um único gene ou um grupo de genes: as síndromes da ectrodactilia com deficiência de osso longo e a síndrome de Gollop-Wolfgang decorrem de duplicações de *BHLHA9*. Além disso, na síndrome TAR, causada por um mecanismo denominado de herança composta, a maioria dos indivíduos apresenta uma microdeleção em 1q21.1 associada em *trans* a um alelo hipomórfico (Albers et al., 2012; Mortier et al., 2019).

O estudo de microdeleções/microduplicações requer o emprego de técnicas de análises citogenômicas, que podem ser direcionadas a regiões cromossômicas específicas, como a Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) e a Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA), ou amplas, envolvendo todo o genoma, como as técnicas de *array* genômico. Mais recentemente, *softwares* para análise de CNVs em sequenciamentos de nova geração (NGS) tem sido cada vez mais empregados com sucesso na realização desta análise (Pirooznia et al., 2015).

Embora a maioria das alterações genéticas que levam a um fenótipo mendeliano estejam localizadas em regiões codificadoras (Chong et al., 2015), alterações em elementos regulatórios localizados em regiões não-codificadoras do genoma, também podem ser responsáveis pelas DCM. O estudo da organização espacial do genoma no núcleo da célula tem mostrado que regiões cromossômicas são organizadas em regiões menores, denominadas Domínios de Associação Topológica (TADs). TADs são consideradas como uma unidade estrutural fundamental do genoma que direcionam elementos regulatórios a promotores específicos, localizados à distância e, ao mesmo tempo, suas regiões fronteiriças impedem a interação com regiões vizinhas. Alterações cromossômicas estruturais têm sido implicadas na etiologia de anomalia de membros pelo fato de alterarem as fronteiras das TADs, levando a ativação de genes por *enhancers* que não ocorreria normalmente (Lupiáñez et al., 2015).

1.7. Herança mendeliana: Alterações monogênicas

As doenças monogênicas constituem um grupo extenso de condições, com mais de 5.000 fenótipos listadas no catálogo de doenças mendelianas com etiologia conhecida (OMIM – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>). A procura por DCM neste banco de dados resulta em mais de 120 fenótipos clínicos (Wilcox et al., 2015).

No grupo 39 da classificação internacional de doenças ósseas de etiologia genética (Mortier et al., 2019), das 28 doenças listadas, 16 (57,1%) tem como base etiológica uma alteração em um gene único, constituindo um padrão de herança mendeliano. Muitas dessas condições apresentam malformações de outros órgãos/sistemas, constituindo formas sindrômicas de DCM.

Para o estudo de variantes pontuais (troca de base e pequenas inserções e deleções), o exame de escolha é o sequenciamento gênico, seja pela técnica tradicional de Sanger, utilizada desde a década de 70, ou pela técnica mais recente e amplamente utilizada na atualidade, o NGS (Beck et al., 2016; Moraes & Góes, 2016). Na última década, com uma queda dos valores destes experimentos, esta nova técnica vem demonstrando um papel efetivo na análise

genômica, uma vez que gera um número grande de dados em um único experimento, diminuindo significativamente o trabalho e o tempo da aquisição dos resultados. O NGS tem sido utilizado tanto na pesquisa, possibilitando a identificação das bases moleculares das doenças monogênicas, quanto como um teste diagnóstico na prática clínica, especialmente em doenças com grande heterogeneidade genética de loco ou nas quais o gene é muito grande, situações que dificultam ou encarecem o emprego da técnica do sequenciamento tradicional de Sanger. As diferentes modalidades do NGS incluem o estudo de um grupo seletivo de genes (painel de genes), o sequenciamento de todas as regiões codificadoras dos genes (sequenciamento do exoma) ou, ainda, o sequenciamento do genoma (Chong et al., 2015; Sikkema-Raddatz et al., 2013; Yamamoto et al., 2014).

Algumas das deficiências pré-axiais sindrômicas são mais prevalentes e reconhecidas, como a síndrome de Cornelia de Lange, a pancitopenia de Fanconi, a disostose acrofacial tipo Nager (OMIM #154400) e a síndrome de Holt-Oram (Wilcox et al., 2015). Em relação às deficiências pós-axiais, aquelas que afetam o eixo ulnar do indivíduo, destacam-se a síndrome de Miller (OMIM #263750), a síndrome ulnar-mamária e a síndrome de Weyers e oligodactilia (OMIM #602418) (Wilcox et al., 2015).

O mecanismo molecular da síndrome TAR, também observado em outra anomalia esquelética, a escoliose congênita associada ao gene *TBX6*, apresenta peculiaridades, recebendo a denominação de herança composta (Wu et al., 2015). Na síndrome TAR, em geral encontra-se uma microdeleção de tamanho variável em 1q21.1, envolvendo o gene *RMB8A*, ou mais raramente a presença de uma variante de ponto de perda de função, associada a um alelo hipomórfico, uma variante comum, um polimorfismo de base única (SNP) na outra cópia do gene. Albers et al. (2012), identificaram dois SNPs em regiões regulatórias do gene *RBM8A* associados ao alelo nulo em indivíduos de origem europeia com TAR: rs139428292 (NM_005105.4:c.-21G>A), na região 5' não-traduzida (5'UTR) do gene e frequência alélica de 3,05%, ou rs201779890 (NM_005105.4:c.67+32G>C), localizado no primeiro íntron e frequência alélica de 0,42% (Albers et al., 2012). Estudos funcionais mostraram uma diminuição na transcrição e também na expressão da proteína nas plaquetas dos indivíduos com TAR. Recentemente, Boussion et al. (2020) avaliando 26 indivíduos com

TAR, identificaram a presença de um novo SNP, rs12079762 (c.*6C>G), na região 3'UTR em quase metade dos indivíduos (42%), frequência equivalente ao SNP mais comum e conhecido (c.-21G>A). Na análise da frequência alélica deste SNP, observou-se que ele é particularmente frequente na população de ancestralidade africana, sendo que sete dos 11 indivíduos com este SNP no estudo de Boussion e colaboradores eram do Norte ou Oeste da África e das Antilhas. Este artigo demonstra a heterogeneidade particularmente das variantes comuns em populações distintas, de diferentes etnias (Boussion et al., 2020).

As características clínicas principais e os achados moleculares das formas mendelianas e herança composta associadas com defeitos pré e pós-axial encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Síndromes monogênicas clássicas de deficiências de membros associadas a ossos específicos (modificado de Wilcox et al., 2015 e atualizado em março de 2021)

Envolvimento pré-axial	Quadro clínico	Genes	Padrão de herança
Cornelia de Lange	Crescimento intrauterino restrito, microcefalia, deficiência intelectual, dismorfismos faciais e deficiência de membros	<i>NIPBL</i> , <i>SMC3</i> , <i>RAD21</i> <i>SMC1A</i> , <i>HDAC8</i>	AD LX
Pancitopenia de Fanconi	Baixa estatura, falência medular, anomalias renais, anomalia do eixo radial	Vários genes <i>FANCA</i> – mais prevalente	AR LX
Disostose acrofacial tipo Nager	Perda auditiva, hipoplasia malar, anomalia do eixo radial	<i>SF3B4</i>	AD AR

Síndrome de Holt-Oram	Cardiopatía congênita (defeitos septais), anomalia do eixo radial	<i>TBX5</i>	AD
TAR	Polegares presentes, agenesia/hipoplasia radial e trombocitopenia	<i>RBM8A</i>	Herança composta
Síndrome de Richieri-Costa-Pereira (OMIM #268305)	Sequência de Pierre Robin, agenesia de epiglote, defeitos pré e pós-axiais em membros	<i>EIF4A3</i>	AR
Envolvimento pós-axial			
Síndrome de Miller	Hipoplasia malar, lábio leporino/fenda palatina, micrognatia, anomalia do eixo ulnar	<i>DHODH</i>	AR
Síndrome ulnar-mamária	Hipoplasia da mama e glândulas sudoríparas, anomalias genitais e atraso puberal em homens	<i>TBX3</i>	AD

AD: autossômica dominante; AR: autossômica recessiva; LX: ligada ao cromossomo X

Pela grande heterogeneidade de fatores genéticos e ambientais envolvidos na etiologia da DCM, a história e avaliação clínicas detalhadas são fundamentais para estabelecer uma hipótese clínica e avaliar a necessidade ou não da realização de testes genéticos e qual o melhor deles a ser empregado. Contribuindo ainda para esta complexidade observada na DCM, um número ainda expressivo de fenótipos não apresenta uma etiologia definida. Desta forma, estudos adicionais de indivíduos com esses fenótipos específicos são necessários para desvendar se fatores genéticos clássicos ou mecanismos mais complexos desempenham um papel na etiologia dessas anomalias congênitas.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Caracterizar as bases genéticas e avaliar os achados clínico-radiológicos em indivíduos com DCM, forma isolada ou associada a outras malformações.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar variantes intragênicas ou CNVs, responsáveis pela DCM.
2. Avaliar o espectro fenotípico no grupo de indivíduos com DCM.

3. Casuística e Métodos

3.1. Casuística

A casuística é composta de indivíduos avaliados no Ambulatório de Doenças Ósseas da Unidade de Genética do Instituto da Criança (ICr) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP).

Os pacientes com DCM em seguimento ou em novo atendimento na Unidade foram convidados a participar deste estudo, sendo incluídos após a assinatura do termo de consentimento/assentimento, conforme a idade do participante, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC/FMUSP – CAPPesq processo nº 0558/10 em setembro de 2017 – e contemplado na Plataforma Brasil sob o número CAAE86055518.1.0000.0068 em março de 2018.

3.2. Avaliação clínico-radiológica

Para a avaliação clínico-radiológica, foi realizada uma anamnese, com particular atenção a fatores ambientais no período pré-natal relacionados à DCM, uma história familiar e exame físico detalhados e estudos radiológicos. A presença de outras anomalias congênitas foi investigada por exames complementares, como o ecocardiograma e ultrassonografia abdominal, para a pesquisa de anomalias cardíacas e renais, respectivamente. Outras avaliações foram feitas, como a avaliação oftalmológica e/ou auditiva, além de outros exames bioquímicos ou de imagem, a partir de alguma suspeita clínica.

Foram selecionados os indivíduos com DCM que se enquadravam prioritariamente no grupo 39 da Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas Genéticas (defeitos de redução-hipoplasia de membros), com exceção da inclusão de indivíduos classificados em outros grupos, mas que apresentavam DCM graves e relevantes para o presente estudo (Mortier et al., 2019).

Os critérios de inclusão, priorizando as causas mais raras de DCM, foram: indivíduos com deficiência congênita de múltiplos ossos longos ou deficiência de um único osso longo/defeito do eixo radial ou ulnar, associado a outras malformações congênitas e/ou oligodactilia. O defeito de membro constituía um achado clínico cardinal no quadro clínico do indivíduo ou era o motivo do encaminhamento para o Ambulatório de Genética.

Não foram incluídos indivíduos nos quais havia, na história clínica, relato de fatores não-genéticos reconhecidamente associados à DCM, como o uso de medicamentos pela mãe durante a gestação (talidomida, medicamentos anticonvulsivantes e o misoprostol), a realização de diagnóstico pré-natal por biópsia de vilocorial abaixo de 12 semanas de idade gestacional ou diabetes materno insulino-dependente. Também não foram incluídos os indivíduos com um diagnóstico confirmado de anomalias cromossômicas clássicas, como a trissomia do cromossomo 18 e indivíduos com atresia de esôfago com ou sem fístula traqueoesofágica, sugestivos da Associação VACTERL.

3.3. Classificações

A casuística foi composta por 44 indivíduos pertencentes a 35 famílias (35 probandos e 9 parentes afetados) apresentando DCM associada ou não a outras anomalias congênitas.

Foram realizadas as seguintes classificações da DCM na casuística estudada:

1. Associação ou não com outras anomalias congênitas: DCM isolada, não sindrômica (sem associação com anomalias congênitas de outros órgãos/sistemas) ou sindrômica (presença de outras malformações associadas), constituindo ou não uma síndrome reconhecida.
2. Localização em membros: envolvimento preferencial dos membros superiores, dos membros inferiores ou acometimento de ambos.
3. Anatômica: ausência completa do membro (amelia) ou parcial. No caso de ser parcial longitudinal, as anomalias foram subdivididas em pré-axiais (eixo radial), centrais e/ou pós-axiais (eixo ulnar) (Gold et al., 2011).

3.4. Técnicas moleculares

Pela complexidade das causas etiológicas nas DCM e das indicações e limitações dos diferentes testes genéticos disponíveis, estes foram empregados de forma única ou sequencial, baseado nas classificações realizadas na casuística, assim como na presença ou não de um diagnóstico clínico presumido.

Na presença de uma hipótese clínica provável, tanto em uma DCM sindrômica, como em formas isoladas, o teste molecular realizado foi direcionado à causa conhecida da doença genética suposta do probando. Desta forma, os testes realizados para doenças mendelianas incluíram o sequenciamento de um gene específico, pelo sequenciamento tradicional de Sanger (por exemplo, o sequenciamento do gene *TBX5*, para o diagnóstico da síndrome de Holt-Oram) ou de um grupo de genes, pelo NGS. Nas doenças decorrentes de anomalias cromossômicas submicroscópicas, foi realizado, preferencialmente, o *array* genômico.

Alguns testes genéticos disponíveis em nosso serviço e laboratório de pesquisa foram empregados previamente a exames genômicos, de análises mais amplas, nas seguintes condições: a) para os defeitos pré-axiais de membro superior, foi realizado o estudo cromossômico com indutor de quebras cromossômicas (diepoxibutano – DEB) para o diagnóstico da síndrome da pancitopenia de Fanconi; b) para o diagnóstico da síndrome de Roberts, foi realizado o estudo cromossômico com banda C para separação prematura dos centrômeros; c) para os defeitos isolados envolvendo os membros superiores e inferiores, foi realizado o sequenciamento tradicional de Sanger do gene *WNT7A*, para o possível diagnóstico de FS ou AARRS, e da região *ZRS*, na região intrônica (íntron 5) do gene *LMBR1*, *enhancer* do gene *SHH*. Dentre os fenótipos associados a alterações nesta região, destacam-se a hipoplasia tibial e polidactilia (OMIM #188740) e a síndrome de Laurin-Sandrow (OMIM #135750).

Nas formas sindrômicas sem um diagnóstico clínico provável e nas formas não-sindrômicas, incluindo condições sem etiologia definida, o estudo gênico pela técnica do NGS foi priorizado (sequenciamento do exoma), uma vez que a

maioria das causas etiológicas contempladas na Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas Genéticas é decorrente de um padrão de herança mendeliano (Mortier et al., 2019). No caso de um resultado negativo, a avaliação prosseguiu para a avaliação de CNVs pela técnica do *array* genômico.

A realização de estudos cromossômicos específicos, como aquele com indutor de quebras cromossômicas (DEB) para a síndrome da pancitopenia de Fanconi e outro com um bandamento não-convencional (banda C), foram realizados no Laboratório de Citogenética da Hematologia do Instituto Central do HC/FMUSP e no Laboratório de Investigação Médica (LIM) 36, respectivamente.

Os exames do *array* genômico (para análise de CNVs) e o sequenciamento tradicional de Sanger e o NGS (para análise de variantes pontuais e pequenas deleções/inserções gênicas), seja o estudo focado em um grupo de genes (painel) ou o sequenciamento do exoma, foram realizados no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP).

3.4.1. Extração de DNA

Para a realização dos testes moleculares, foi coletada uma amostra de sangue periférico de 4 mililitros (mL) dos indivíduos desta casuística em um tubo contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA). A extração do DNA dos leucócitos foi realizada por meio de um robô QIA Symphony (Qiagen, Alemanha), com o kit de extração de DNA do próprio fabricante. O DNA extraído foi armazenado em uma geladeira com as demais amostras, sendo retirada uma alíquota por vez quando necessário. Para cada alíquota retirada, o DNA foi quantificado e avaliado quanto à pureza da amostra, razão de comprimentos de onda 260/280 nm calculada, a qual necessita ser maior que 1,80. A quantificação foi realizada no Epoch – *Microplate Spectrophotometer* (Biotek).

3.4.2. Microarray genômico (*array-CGH*)

O teste de *microarray* genômico (*array-CGH*) empregado, na maioria dos indivíduos da casuística, foi um *oligoarray* contendo 180.000 sondas (plataforma 180K) distribuídas pelo genoma humano, sendo que cada sonda tem um

tamanho de 60 pares de base com espaçamento médio de 16,7 kb entre elas. Foram utilizadas lâminas da Agilent, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Como DNA de referência, foi utilizado um pool de DNA comercial da fabricante Promega. O DNA de interesse hibridiza nas sondas de regiões homólogas e pode ser observada a fluorescência da amostra. As imagens resultantes foram obtidas com o scanner Agilent e extraídas a partir do programa *Feature Extraction* v10.7.3.1 (Agilent Technologies). A análise foi realizada utilizando-se o *software Genomic Workbench* 6.9 (Agilent Technologies) e o algoritmo estatístico ADM-2, com limiar de sensibilidade 6,7, com um mínimo de três sondas consecutivas indicando deleção ou duplicação, uma resolução mínima de aproximadamente 35 kb de segmento cromossômico. A referência do genoma padrão utilizado foi o GRCh37/hg19 do *Genome Browser* da *University of California Santa Cruz* (UCSC; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Foram considerados para análise a presença de duplicações e deleções de segmentos genômicos maiores que 300 kb ou duplicações e deleções de genes reconhecidamente associados a doenças genéticas, independentemente do tamanho da alteração. Não foram consideradas na análise CNVs descritas no banco de dados DGV - Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>), com exceção de CNVs relacionadas as síndromes estudadas. Outros bancos de dados consultados foram o DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>); o ClinGen - Clinical Genome Resource (<https://www.clinicalgenome.org/>); o OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man e o Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Em cinco indivíduos, *arrays* com outras especificações foram utilizados, ou pela disponibilidade do laboratório (plataforma 60K e SNP-*array*) ou no caso de requerer uma densidade de sondas maior, este último, com 1.000.000 de sondas, empregado em um caso familiar com interesse na região cromossômica 17p13.3, realizado em laboratório externo.

3.4.3. Sequenciamento tradicional de Sanger

Em relação ao sequenciamento tradicional de Sanger, foram desenhados pares de *primers* (*forward* e *reverse*) que flanqueiam a região de interesse. Os

primers desenhados para os genes *WNT7A* e a região *ZRS* estão contemplados na Tabela 3. Realizou-se a amplificação das regiões codificadoras dos genes (éxons) e suas regiões flangeadoras, que atuam no processamento do RNA, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com utilização do Platinum PCR SuperMix (Thermo Fisher Scientific) em termociclador ABI Applied Biosystems Veriti, com temperaturas e número de ciclos padronizados para cada reação. O produto desta reação foi purificado por ExoSAP-IT (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguido de uma nova reação de sequenciamento utilizando-se o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) e posterior purificação por Sephadex (GE Healthcare Life Sciences). O produto foi então injetado no sequenciador, ABI3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), para posterior análise pelo *software* Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, EUA).

Tabela 3. *Primers* desenhados para as regiões exônicas do gene *WNT7A* e para a região *ZRS*, localizada no íntron cinco do gene *LMBR1*

Primers <i>WNT7A</i>	
Éxon 1	Forward: GCTCCTCCCTCCCTCCTC
	Reverse: AGTCCCCCTGCCTATATCTCC
Éxon 2	Forward: CCCTTGCTGGCCTAATGCT
	Reverse: AGGGGCAGGTGAGGGAGT
Éxon 3	Forward: CTCTCAGATGCTTGGGACCT
	Reverse: CCAGATGTTACAAACAAGCCATT
Éxon 4	Forward: GGCGTGCAGTGACCTGTG
	Reverse: GTCCAGTCCTCCCAGCAATC
Primers <i>LMBR1</i> (região <i>ZRS</i> – íntron 5)	
<i>Primer 1</i>	Forward: CAACTTAATGAAAGTGGGAGAAAA
	Reverse: CCTTAATCACTCATTTCCAACAAT
<i>Primer 2</i>	Forward: TGAGCAACATGACAGCACAA
	Reverse: TTCTGATCCATAACCATTCTAAG

3.4.4. Sequenciamento de nova geração (NGS)

Para a realização do NGS, foram utilizadas as plataformas Illumina MiSeq e HiSeq, seguindo a preparação recomendada pelo fabricante, com utilização de diferentes kits (TruSeq library preparation, TruSeq custom enrichment ('P1' - 485 genes, Anexo I; 'P2' - 496 genes, Anexo II), Illumina Trusight One expanded (painel comercial com 6.700 genes associados a fenótipos mendelianos), Agilent SureSelect exome v6, IDT exome xGen v1, MiSeq sequencing by synthesis, HiSeq sequencing by synthesis).

O NGS requer três etapas: a preparação de uma biblioteca (preparo das amostras), o sequenciamento em si e a análise de bioinformática. Desta forma, o DNA, após quantificação e verificação da sua integridade por um gel de agarose, foi fragmentado em tamanhos de 100 a 600 pares de base, com posterior incorporação dos adaptadores e indexes para identificação das amostras. Os fragmentos obtidos foram amplificados por PCR, seguido da captura das regiões de interesse, seja das regiões codificadoras (éxons e regiões flangeadoras) de um grupo de genes de interesse (painel), ou de todos os genes (exoma). A captura ocorreu pelo emprego de sondas de homologia ligadas a *beads* magnéticas com estreptavidina. Realizou-se o sequenciamento com clusterização em lâminas de vidro e armazenamento das imagens para serem convertidas em arquivo de texto em formato "*basecall*" (bcl) dos fragmentos de DNA com seus indexes. Nesta etapa da bioinformática, os arquivos bcl são transformados em arquivos fastq, por *softwares* próprios do fabricante, e posterior alinhamento das sequências com as posições nos cromossomos humanos (referência hg19), pelo *software Burrows-Wheeler-Aligner* (bwa), recomendado pelo Instituto Broad, da Harvard Medical School, Boston, MA, Estados Unidos. Com este alinhamento são gerados arquivos *binary alignment map* (BAM), que já podem ser visualizados a partir de *softwares* como o *Integrative Genomic Viewer* (IGV), do Instituto Broad para avaliação de variantes específicas de interesse. Para a análise global das variantes presentes em um indivíduo, foi utilizado o *software Genome Analysis Tool Kit* (GATK) – do Instituto Broad, gerando arquivos denominados *variant call format* (VCF). Neste arquivo, com o intuito de avaliar a patogenicidade de uma determinada variante, foi

utilizado o *software* ANNOVAR para incorporar diversas características que auxiliam nesta interpretação, como os obtidos em bandos de dados públicos de frequências alélicas populacionais (ABraOM, ExAC, GnomAD), bancos de associação com doenças como ClinVar, OMIM e HGMD; predição *in silico* de dano à proteína codificada pelo gene que contém uma variante específica, como *Mutation Taster* e *Revel*. Os dados foram armazenados em computadores e servidores do IB/USP, com acesso restrito para posterior análise.

Os filtros utilizados para a classificação das variantes de interesse nas tabelas de resultados provenientes da bioinformática foram:

1. Variantes raras, não-sinônimas, com frequência alélica em populações controles menor ou igual a 1% nos seguintes bancos de dados de populações mundiais e brasileira:

GnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org/>

AbraOM: <http://abraOM.ib.usp.br>

2. Ferramentas *in silico* para avaliar o impacto de uma variante em seu produto proteico. Foram considerados os resultados que sugerem dano à proteína em regiões conservadas evolutivamente:

Mutation Taster: <http://www.mutationtaster.org/>

Revel

As variantes foram classificadas em cinco categorias de acordo com as recomendações do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (*American College of Medical Genetics and Genomics* - ACMG) em patogênica, provavelmente patogênica, *Variant of uncertain significance* (VUS), benigna ou provavelmente benigna (Richards et al., 2015).

A segregação das variantes em casos familiares ou em situações na qual era importante avaliar se aquelas encontradas no indivíduo haviam sido herdadas cada uma de um genitor (para estabelecer que eram bialélicas no probando) ou se constituía um evento *de novo*, foi realizada, preferencialmente, pelo sequenciamento Sanger.

3. As variantes presentes em um único gene deviam seguir o padrão estabelecido para a doença associada: presença de uma variante em heterozigose para o padrão de herança AD ou hemizigose no caso de

herança LX e duas variantes em heterozigose composta ou homozigose para o padrão de herança AR.

Uma variante foi considerada nova, não reportada previamente, caso não fosse encontrada em dados da literatura e no banco de dados público ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Para estudo dos indivíduos com anomalias de múltiplos ossos longos, forma não-sindrômica e sem etiologia conhecida, foi realizada a análise de exoma de trio (probando e genitores não afetados), priorizando-se a análise de genes presentes nos probandos em vias de sinalização previamente relacionadas com desenvolvimento embrionário dos membros:

1. Via Sonic hedgehog (Shh)
2. Via Notch
3. Via Wnt

Os genes presentes nestas três vias foram pesquisados no banco de dados KEGG PATHWAY Database (<https://genome.jp/kegg/pathway.html>). Ao todo, 281 genes foram identificados pertencentes às três vias de sinalização estudadas (56 da via Shh, 59 da via Notch e 166 da via Wnt) (Anexo III).

Pela possibilidade de fatores de predisposição à trombofilia poderem estar associados à DCM, foram avaliados os principais fatores genéticos de predisposição conhecidos, como as variantes c.*97G>A (rs1799963) em *F2*, c.1601G>A, fator V de Leiden (rs6025) e o polimorfismo c.677 C>T (rs1801133) em *MTHFR* (Ordal et al., 2016).

Em dois casos familiares, a investigação de CNV foi também realizada por NGS pelo emprego de um *software* específico para esta análise (NextGene). O arquivo BAM foi modificado para a extensão .pjt para fazer uma contagem relativa de fragmentos de DNA nas regiões de captura e a amostra foi analisada em comparação com outras amostras da mesma corrida. Regiões com cobertura inferior a 40x e extensão menor que 20bp não foram incluídas. A razão para determinação de deleção ou duplicação de uma região é obtida entre o número de cópias da amostra e o número de cópias dos controles utilizados (nº de cópias da amostra dividida pelo número de cópias da amostra somado ao número de cópias controle). Na ausência de deleção e duplicação, espera-se duas cópias na amostra analisada e duas no controle, gerando uma razão de 0,5, classificada

como normal. Para deleção espera-se uma cópia na amostra para duas cópias de controle (razão de 0,3) e para duplicação, espera-se três cópias na amostra e duas no controle (razão de 0,6). Em um outro caso familiar, a deleção foi avaliada pelo *software eXome-Hidden Markov Model – XHMM*.

3.5. Análise estatística

Para a realização de análise estatística dos dados estudados, foi realizada uma análise descritiva, com os dados categóricos expostos em números absoluto e relativo.

A comparação das frequências das variáveis categóricas entre dois grupos foi feita através do teste exato de Fisher, adotando-se um nível de significância de 5%.

4. Resultados

4.1. Dados demográficos

Foram incluídos 44 indivíduos com DCM neste estudo, sendo 35 probandos (35 famílias) e nove parentes afetados, nos quais foram realizadas avaliações clínicas e estudos genômicos. Desta forma, casos familiares constituíram 7/35 (20%) da amostra (Tabela 4), porém, em um deles os parentes afetados não foram testados e, portanto, não foram incluídos na tabela 4. O número de afetados nos casos familiares, obtido nos heredogramas, variou de dois a 26, sendo observado o maior número de indivíduos afetados em famílias com uma hipótese clínica da síndrome de Holt-Oram, com nove, 13 e 26 indivíduos em três famílias (F15.1, F16.1 e F14, respectivamente).

Entre os probandos, 17 eram do sexo masculino e 18, do feminino, mostrando um leve predomínio do sexo feminino (51,4%). A idade dos probandos à primeira avaliação variou desde um dia de vida até 27 anos e 11 meses, com média de 9,17 anos e mediana de 6 anos e 11 meses. Dois probandos da casuística já faleceram, um ao nascimento (F3) e outro aos 11 meses de idade (F21). Consanguinidade estava presente em quatro famílias (11,4% - F1, F8, F19, F22) e recorrência em sete casos (20% - F5, F6, F13, F14, F15, F16 e F35). Destes casos com recorrência, em seis deles o estudo molecular permitiu a confirmação da hipótese clínica ou estabelecer um diagnóstico definitivo, não aventado previamente (Figura 18).

4.2. Achados clínicos e classificações

A maioria dos indivíduos com DCM incluídos neste estudo apresentavam hipóteses clínicas pertencentes ao grupo 39 da Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas Genéticas. Quatro probandos pertenciam a grupos diferentes: F2 ao grupo 21 (condrodisplasias punctatas), F11 e F12 ao grupo 34 (disostoses com envolvimento predominantemente craniofacial) e F34 ao grupo 40 (ectrodactilia com ou sem outras manifestações) (Mortier et al., 2019).

Embora a síndrome de Rothmund-Thomson (OMIM #618625 e #268400) não esteja diretamente incluída no grupo 39, ela tem uma sobreposição clínica com a síndrome RAPADILINO presente neste grupo, ambas com um padrão de herança autossômico recessivo, decorrentes de variantes bialélicas no gene *RECQL4*.

O grau de acometimento dos membros foi variável nos probandos, desde uma ausência completa dos quatro membros (tetra-amelia) em F3 e F31, até casos mais leves de malformações nas mãos, como uma hipoplasia do polegar (eixo pré-axial) (F20). A maioria dos indivíduos estudados, probando e familiares, apresentavam anomalias apenas nos membros superiores (54,3%) ou nos membros superiores e inferiores (34,3%). Com exceção dos dois casos de tetra-amelia, e um caso de malformação intercalar do membro, todos os demais apresentavam defeitos longitudinais, com a maioria apresentando acometimento pré e pós-axiais 18/32 (56,2%), seguido de defeitos pré-axiais apenas (28,1%). O número de ossos longos acometidos em braços, antebraços, coxas e pernas, variou de um a 12, com média de 3,8 (Tabela 4).

4.2.1. Formas sindrômicas

As formas sindrômicas foram as predominantes 23/35 probandos (65,7%), sendo que uma hipótese clínica foi estabelecida em 17 deles (74%). O diagnóstico mais prevalente nos probandos foi a síndrome de Rothmund-Thomson em quatro casos, seguida pela síndrome TAR e pela síndrome de Holt-Oram, ambas com três casos cada. Outras síndromes clínica e molecularmente reconhecidas foram a síndrome de Roberts, CHILD (acrônimo para Hemidisplasia Congênita, com eritrodermia Ictiosiforme e Defeitos de membros – *Limb*; OMIM #308050), e a síndrome de Richieri-Costa-Pereira (Tabela 4).

Dentre os achados clínicos de outros órgãos e sistemas que não o esquelético, o mais comum foi a presença de anomalias cardíacas, particularmente nos indivíduos com hipótese diagnóstica da síndrome de Holt-Oram.

Observou-se um predomínio do acometimento do rádio nos probandos com membros superiores afetados (17/22 – 77,3%) e da fíbula, nos probandos

com membros inferiores afetados (4/5 – 80%). Nos casos com defeito longitudinal pré-axial, o acometimento do eixo radial, normalmente com uma deficiência das estruturas desta região, variou desde uma hipoplasia da região tenar ou do polegar, até a agenesia do polegar e do rádio, o que pode ser observado na síndrome de Holt-Oram (Figura 1). Na síndrome TAR, os indivíduos apresentavam anomalias do rádio, com preservação dos polegares (Figura 2). Mais raramente, observou-se uma duplicação do polegar, uma polidactilia pré-axial (Figura 3).

Figura 1. Variabilidade clínico-radiológica na Síndrome de Holt-Oram: A1-3) F15.1 aos 6 meses com agenesia do polegar esquerdo e hipoplasia do direito, além de sinostose rádio-ulnar bilateral; B1-3) F15.3 (primo materno de F15.1), adulto sem anormalidades dos ossos do eixo radial (B1-2) e hipoplasia da região tenar (B3); C1-3) F16.1, RX aos 2 anos mostrando agenesia bilateral do polegar (C1 e C3), com sinostose rádio-ulnar bilateralmente (C2)

Figura 2. Síndrome de TAR: A1) F4: caso isolado; B1 e B2) F6.1 e F6.2: gemelares no período neonatal; C1 e C2) F5.1 e F5.2, irmãos com 5 anos e 6 meses e 3 anos, respectivamente. Todos os indivíduos apresentam agenesia radial bilateral, com preservação dos polegares

Três probandos apresentaram um envolvimento ósseo mais generalizado: F1, com diagnóstico da síndrome de Roberts, e F11 e F12, com diagnóstico de disostoses acrofaciais (Figura 3).

Figura 3. Formas sindrômicas com envolvimento de membros superiores e inferiores: A1-A4) Síndrome de Roberts (F1): envolvimento simétrico, generalizado dos membros; B1-B6 e C1-C5) F11 e F12 respectivamente, com diagnósticos de disostoses acrofaciais, com envolvimento assimétrico dos membros. Em C4 e C5, observa-se com polidactilia pré-axial em mãos e pés com háluces trifalangeanas

Apesar de serem afetados pela mesma anomalia óssea, os dois probandos com tetra-amelia foram classificados em grupos diferentes, uma vez que F3 foi incluído no grupo dos probandos sindrômicos, por apresentar fenda palatina associada, e F31 foi classificado como não-sindrômico.

4.2.2. Formas não-sindrômicas

Pertencentes ao grupo das formas não-sindrômicas, 12 probandos foram classificados em sete hipóteses diagnósticas distintas. Destas hipóteses, a síndrome FFU foi a mais prevalente, 6/12 – 50% (F25, F26, F27, F28, F29 e F30). Com exceção de tetra-amelia, os demais probandos do grupo não-

sindrômico foram classificados como indivíduos com acometimento longitudinal, sendo a maioria com ossos envolvendo os eixos pré e pós-axiais (9/11 – 81,8%), algumas vezes mostrando um envolvimento mais complexo (Tabela 4). Neste grupo, houve um maior acometimento dos ossos rádio e ulna nos membros superiores (6/9 - ambos com 66,6% de prevalência) e tíbia nos membros inferiores (10/11 – 90,9%) (Figura 4).

Figura 4. DCM isolados com acometimento de múltiplos ossos: A1 e A2) F24 – FS, com envolvimento particularmente acentuado dos membros inferiores, com hipoplasia e encurvamento dos fêmures e ausência das fíbulas; B1-B3) F26 – síndrome FFU, com agenesia da fíbula, ulna e rádio; C1 e C2) F30 – FFS, com hipoplasia proximal do fêmur, agenesia de rádio e ulna do lado direito e oligossindactilia na mão esquerda; D1 e D2) F32 – síndrome FATCO, com hipoplasia da fíbula, encurvamento anterior da tíbia e oligodactilia; E1 e E2) F34 – Acometimento eixo central, ectrodactilia; F1-F3) F35.1 – SHFLD, com ectrodactilia em membros superiores e agenesia da tíbia bilateral

Os principais achados clínicos dos indivíduos deste estudo, a localização do acometimento ósseo, a classificação anatômica e a hipótese clínica aventada estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Dados gerais, classificações, principais achados clínicos e hipótese diagnóstica da casuística

Família/ Indivíduos	Sexo	Idade atual (anos/meses)	Recorrência na família	Consanguinidade entre os genitores	Acometimento dos membros	Classificação anatômica	OL acometidos (N)	Oligodactilia	Achados clínico-radiológicos adicionais	Hipótese diagnóstica inicial
Formas sindrômicas										
F1	F	5a/6m	N	S	MS e MI	AP/L/Pré e Pós-axial	T, Fi, R, UI (8)	S	Déficit pôndero-estatural, anomalia ocular, fenda labial, insuficiência velofaríngea	Síndrome de Roberts
F2	F	5a	N	N	MI (esquerdo)	AP/L/Pré e Pós-axial	Fe, T, Fi (3)	S	Lesão eritemato-descamativa em hemitorço E	Síndrome de CHILD
F3	F	óbito ao nascimento	N	N	MS e MI	Ausência completa de membros	Fe, T, Fi, Um, R, UI (12)	N	Déficit pôndero-estatural, fenda lábio-palatina, uso materno de Ondansetrona na gestação	Tetra-amelia com fenda lábio-palatina
F4	M	8a/3m	N	N	MS	AP/Intercalar/Pré e Pós-axial	R, UI (4)	N	Agnesia renal, cardiopatia congênita (CIA/CIV), trombocitopenia	Trombocitopenia - ausência de rádio
F5.1	M	5a/11m	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	R (2)	N	Trombocitopenia	Trombocitopenia - ausência de rádio
F5.2 (irmão)	M	3a/6m	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	R (2)	N	Trombocitopenia	Trombocitopenia - ausência de rádio
F6.1	F	3a	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	R (2)	N	Trombocitopenia	Trombocitopenia - ausência de rádio
F6.2 (irmã gemelar)	F	3a	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	R (2)	N	Trombocitopenia	Trombocitopenia - ausência de rádio
F6.3 (pai)	M	33a/6m	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	R (2)	N	Trombocitopenia	Trombocitopenia - ausência de rádio
F7	F	19a/3m	N	N	MS	AP/L/Pré-axial	R (2)	S	Poiquidermia, sobrancelhas e cabelos esparsos, baixa estatura	Síndrome de Rothmund-Thomson tipo II
F8	F	9a/8m	N	S	MS	AP/L/Pré-axial	(Hipoplasia do polegar e região tenar)	N	Poiquidermia, sobrancelhas e cabelos esparsos, baixa estatura, cardiopatia congênita operada	Síndrome de Rothmund-Thomson tipo II
F9	M	2a/3m	N	N	MS	AP/L/Pré e Pós-axial	R, UI (4)	S	Déficit pôndero-estatural, poiquidermia, sobrancelhas e cabelos esparsos, fenda palatina	Síndrome de Rothmund-Thomson tipo II
F10	F	6a/4m	N	N	MS (esquerdo)	AP/L/Pré-axial	R (1)	S	Eritema facial, sem progressão para poiquidermia	Síndrome de Rothmund-Thomson tipo II
F11	M	6a/9m	N	N	MS e MI	AP/L/Pré e Pós-axial	T, Fi, R, UI (8)	S	Sequência de Pierre-Robin, agnesia da epiglote	Síndrome de Richieri-Costa-Pereira
F12	F	6a/6m	N	N	MS e MI	AP/L/Pré e Pós-axial	R, UI (4), (háluxes - trifalangeanos, duplicação do polegar)	N	Dismorfismos faciais, fenda palatina posterior	Síndrome de Richieri-Costa-Pereira

F13.1	F	2a/7m	S	N	MS	AP/L/Pré e Pós-axial	R, UI (4)	S	Déficit pômdero-estatural, calcificação das artérias lenticulo-estriadas	
F13.2 (irmão)	M	5a/3m	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	-	S	Déficit pômdero-estatural, calcificações na região dos tálamos	
F14	M	16a/6m	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	R (2)	S	Cardiopatia congênita (CIV + PCA)	Síndrome de Holt-Oram
F15.1	F	9a/1m	S	N	MS	AP/L/Pré e Pós-axial	R, UI (4)	S	Cardiopatia congênita (CIA)	Síndrome de Holt-Oram
F15.2 (mãe)	F	29a/6m	S	N	N	N	-	N	Cardiopatia congênita (CIA)	Síndrome de Holt-Oram
F15.3 (primo materno)	M	23a	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	(Hipoplasia da região tenar)	N	Cardiopatia congênita (CIA)	Síndrome de Holt-Oram
F16.1	M	4a	S	N	MS	AP/L/Pré e Pós-axial	R, UI (4)	S	Cardiopatia congênita (CIV + CIA) - cor triatriatum. Prima com quadro clínico semelhante e possível duplicação do éxon 7 de <i>TBX5</i> (VUS)	Síndrome de Holt-Oram
F16.2 (mãe)	F	44a/6m	S	N	MS	AP/L/Pré-axial	-	S	Cardiopatia congênita (CIA)	Síndrome de Holt-Oram
F17	F	21a/6m	N	N	MS (direito)	AP/L/Pré e Pós-axial	R, UI (2)	S	Anomalia de corpos vertebrais (bloco C2-C3 e C7-T1 + hemivértebra L4-L5), hiperpasia congênita de supra-renal, forma não-clássica, útero bicornio/vagina septada	Associação MURCS
F18	F	27a/11m	N	N	MS	AP/L/Pré-axial	(Hipoplasia do polegar)	N	Deficiência intelectual, baixa estatura, dismorfismos faciais, resquício branquial em pescoço, luxação do quadril	
F19	F	10a/3m	N	S	MS	AP/L/Pré-axial	(Hipoplasia do polegar)	N	Deficiência intelectual, dismorfismos faciais, cardiopatia congênita (tetralogia de fallot), plaquetopenia medicamentosa (secundário ao ácido valpróico)	Pancitopenia de Fanconi
F20	M	15a/4m	N	N	MS	AP/L/Pré e Pós-axial	R, UI (2)	N	Pseudoartrose da clavícula	
F21	M	óbito com 11 meses	N	N	MS	AP/L/Pré-axial	R (2)	S	Anomalia de Cimitarra	
F22	M	19a/6m	N	S	MS (direito)	AP/L/Pós-axial	UI (1)	S	Hipoplasia sacral e anomalia anorretal	
F23	F	20a/4m	N	N	MS (direito)	AP/L/Pós-axial	-	S	Ptose palpebral, fenômeno de Marcus-Gunn, cardiopatia congênita (dupla via de saída do VD + EPIV)	

Formas não sindrômicas

F24	F	7a/11m	N	N	MS e MI	AP/L/Pré e Pós-axial	Fe, T, Fi, R, UI (10)	S	Síndrome de Fuhrmann
F25	M	6a/6m	N	N	MI	AP/L/Pré e Pós-axial	Fe, T, Fi (5)	S	Síndrome FFU
F26	F	8a/11m	N	N	MS e MI	AP/L/Pré e Pós-axial - Transversal (MS)	Fe, T, Fi, Um, R, UI (11)	S	Síndrome FFU
F27	F	9a/3m	N	N	MS e MI	AP/L/Pré e Pós-axial - Amelia(MI)	Fe, T, Fi, Um, R, UI (9)	S	Síndrome FFU
F28	M	5a/6m	N	N	MS e MI	AP/L/Pré e Pós-axial	Fe, R, UI (5)	S	Síndrome FFU
F29	M	6a/11m	N	N	MI	AP/L/Pré e Pós-axial	Fe, T, Fi (4)	S	FFU
F30	M	9a/8m	N	N	MS e MI	AP/L/Pré e Pós-axial - Transversal (MS)	Fe, T, Fi, R, UI (7)	S	FFU
F31	M	6a/3m	N	N	MS e MI	Ausência completa de membros	Fe, T, Fi, Um, R, UI (12)	N	Tetra-amelia
F32	M	6a/6m	N	N	MI	AP/L/Pré e Pós-axial	T (com encurvamento anterior), Fi (2)	S	FATCO
F33	M	13a/4m	N	N	MS e MI	AP/L/Pré, Central e Pós-axial	T (com encurvamento anterior), Fi (2)	S	FATCO
F34	F	8a/7m	N	N	MS e MI	AP/L/Central	-	S	SHFM
F35.1	M	5a/7m	S	N	MS e MI	AP/L/Pré-axial e Central	T (2)	S	SHFLD
F35.2 (pai)	M	41a/6m	S	N	MS e MI	AP/L/Pré-axial e Central	T (2)	S	SHFLD
F35.3 (tio paterno)	M	38a/6m	S	N	MS e MI	AP/L/Pré-axial e Central	T (2)	S	SHFLD

4.3. Achados genômicos

4.3.1. Estudos cromossômicos

Nenhum indivíduo deste estudo com defeito do eixo radial apresentou quebras cromossômicas em níveis superiores aos controles no estudo com DEB.

O estudo cromossômico com banda C no indivíduo F1 evidenciou uma separação prematura entre os centrômeros, característica presente na síndrome de Roberts (Figura 5).

Figura 5. Resultado do estudo cromossômico com banda C no indivíduo F1

4.3.2. Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento do gene *WNT7A* mostrou a presença de duas variantes no indivíduo F24: c.1A>G e c.931C>A:p.(Arg311Ser). A segregação nos pais permitiu estabelecer que essas variantes se encontravam em *trans* no propósito, herdadas do pai e da mãe, respectivamente, sendo ambas

classificadas como provavelmente patogênica, comprovando o diagnóstico de FS (Figura 6).

Figura 6. Sequenciamento Sanger dos éxons um e quatro do gene *WNT7A* nos genitores do probando F24: A) Variante encontrada no éxon um do gene *WNT7A* (c.1A>G) (no probando e pai); B) Variante encontrada no éxon quatro do gene *WNT7A* (c.931C>A) (no probando e mãe)

Nenhum indivíduo apresentou variantes classificadas como patogênica ou provavelmente patogênica na região *ZRS*.

O sequenciamento Sanger do gene *TBX5* evidenciou uma variante, classificada como patogênica em F15.1: c.246_247insA:p.(Met83Asnfs*13). A variante estava presente em dois outros parentes afetados na família (a mãe do probando e um primo materno) avaliados neste estudo, confirmando-se o caso familiar de Holt-Oram (Figura 7).

Figura 7. Sequenciamento Sanger do éxon quatro do gene *TBX5* em F15.1 (probando), F15.2 (mãe) e F15.3 (primo materno) evidenciando a variante c.246_247insA

Em dois pacientes com hipótese clínica da síndrome de Richieri-Costa-Pereira (F11 e F12), o estudo da expansão na região 5'UTR do gene *EIF4A3*

responsável por este fenótipo, realizado por PCR e análise em gel de agarose, mostrou a presença da expansão (16 repetições) apenas em F11 (Figura 8). O sequenciamento Sanger confirmou este achado e mostrou que os genitores eram heterozigotos para a expansão de 16 repetições.

Figura 8. Gel de agarose do sequenciamento Sanger do probando F11, comparado com controles exibindo repetições diferentes, três e sete repetições (consideradas normais) e 14 e 16 repetições, consideradas alteradas

4.3.3. Sequenciamento de nova geração

Foram realizados 12 painéis e 20 exomas, sendo que variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas foram identificadas em dez probandos (Tabela 6), todos pertencentes ao grupo dos síndrômicos. Uma variante classificada como VUS foi identificada em um probando com diagnóstico da síndrome de Verheij (OMIM #615583). Este estudo confirmou a hipótese diagnóstica em oito probandos, todos eles diagnosticados por painel, e estabeleceu um diagnóstico não presumido em três probandos pelo sequenciamento do exoma (F12, F13.1 e F18).

No indivíduo F12, com hipótese clínica inicial da síndrome de Richieri-Costa-Pereira, descartada pela ausência de um número elevado de repetições

na região 5'UTR do gene *EIF4A3*, o estudo prosseguiu pelo sequenciamento da região *ZRS*, também sem alterações, e posterior realização do NGS (exoma). Este estudo realizado em laboratório externo evidenciou uma variante em heterozigose no gene *POLR1A*: c.3649delC:p.(Gln1217Argfs*10), classificada como patogênica, estabelecendo o diagnóstico da disostose acrofacial tipo Cincinnati (OMIM #616462). Pela presença da mesma variante em um caso previamente reportado (Weaver et al., 2015) e, também, em um indivíduo controle da população brasileira (ABraOM), foi realizada a segregação desta variante por sequenciamento de Sanger em seus genitores, evidenciando que ela havia sido herdada de seu pai, sem características fenotípicas desta disostose, demonstrando uma penetrância incompleta.

No caso familiar (F13.1 e F13.2), com recorrência em irmãos de sexos distintos, o sequenciamento do exoma realizado em serviço externo evidenciou a presença de duas variantes no gene *CTC1*: c.1946-1G>C e c.2611G>A: p.(Val871Met), no qual variantes bialélicas são responsáveis pela síndrome de Coats plus (OMIM #612199). A partir do resultado do exoma no irmão do probando (probando ainda em período pré-natal), avaliações complementares permitiram identificar calcificações cerebrais, sinal cardinal desta síndrome (Figura 9). Ao nascimento, realizou-se o exoma no probando, bem como a segregação das variantes nos genitores pelo sequenciamento Sanger, comprovando a presença de ambas as variantes em F13.1 e F13.2, em *trans*, cada uma delas proveniente de um genitor (Figura 10).

Figura 9. Irmãos com diagnóstico de Coats-Plus. A1 e A2) F13.1 com defeito longitudinal pré-axial bilateral; B1-B3) Tomografia computadorizada de crânio mostrando calcificações cerebrais em núcleos da base em F13.2, associado a defeito pré-axial

Figura 10. Sequenciamento Sanger dos éxon 12 e 15 do gene *CTC1* em F13.1 (probando), F13.2 (irmão) e pais: A) Variante no éxon 12 do gene *CTC1* (c.1946-1G>C), (em F13.1, F13.2 e mãe); B) Variante no éxon 15 do gene *CTC1* (c.2611 G>A), (em F13.1, F13.2 e pai)

Nos indivíduos com formas não-sindrômicas, nos quais foi realizado o sequenciamento do exoma do trio, nenhuma variante patogênica ou provavelmente patogênica foi encontrada, incluindo os genes da via Wnt, Shh e Notch e as variantes de susceptibilidade à trombofilia. Nenhum gene foi encontrado na busca por variante *de novo* nos probandos analisados.

4.3.4. Análise de CNVs

O estudo de microdeleções/microduplicações foi realizado, na maioria dos casos, pela técnica do *array* genômico. Este teste permitiu a identificação de microdeleções de tamanhos variados em 1q21.1, associada a síndrome TAR, em F4, F5.1 e F6.3. Em um caso familiar (F6.1 e F6.3) com hipótese clínica de TAR, a pesquisa de CNVs foi realizada pelo *software* NextGene (Figura 16), a partir de um painel por NGS e no indivíduo F16.1, um caso familiar da síndrome de Holt-Oram, a pesquisa de CNVs envolveu ambas as técnicas, *array* genômico e NGS, para melhor caracterização de uma duplicação intragênica (Figura 11).

O estudo dos polimorfismos em *RBM8A* (rs139428292, localizado na região 5'UTR e rs201779890, localizado no íntron 1), realizado pela técnica do NGS (painel de genes), mostrou a presença do polimorfismo mais comum (rs139428292) apenas em F4 (Figura 12).

Figura 12. Resultado molecular de F4: A) Array genômico apresentando uma microdeleção de 445 kb em 1q21.1 contendo o gene *RBM8A*; B) Painel genômico analisado pelo software IGV identificando o polimorfismo rs139428292

A pesquisa de outros polimorfismos presentes em *RBM8A* mostrou que F5.1 e F6.1 compartilhavam dois outros polimorfismos: rs12079762 (com frequência alélica populacional de 4,17% no banco de dados GnomAD e 3,84% no banco de dados ABraOM), localizado na região 3'UTR, e rs59285351 (com frequência populacional de 9,52% no GnomAD e 8,15% no ABraOM), presente no íntron 2. Foi realizada a segregação da microdeleção e dos novos polimorfismos identificados nas duas famílias (Figura 13 e 15).

Figura 13. Resultado molecular de F5.1: A) *Array* genômico apresentando uma microdeleção de 381 kb em 1q21.1 contendo o gene *RBM8A*; B) Painei genômico analisado pelo *software* IGV identificando os polimorfismos rs59285351 e rs12079762

A segregação na família de F5.1, realizada por painel genômico possibilitou a identificação da microdeleção na mãe do probando. A análise do painel foi realizada por meio do *software* XHMM (Figura 14).

Figura 14. Resultado de painel genômico identificando a deleção contendo o gene *RBM8A*, presente na mãe de F5.1 e F5.2, por meio de análise realizada com *software* XHMM

Figura 15. Resultado molecular de F6.1 e F6.3: A) Array genômico apresentando uma microdeleção de 195 kb em 1q21.1 contendo o gene *RBM8A* em F6.3; B) Painel genômico analisado pelo *software* IGV identificando os polimorfismos rs59285351 e rs12079762 em F6.1 e F6.3

Figura 16. Resultado de painel genômico identificando a microdeleção em 1q21.1 através de *software* NextGene em F6.1 e F6.3

No indivíduo F35.1, com hipótese clínica de ectrodactilia com deficiência de osso longo, o *array* genômico customizado mostrou a presença de uma microduplicação de 62 kb englobando o gene *BHLHA9* em 17p13.3, frequentemente associada à esse tipo de ectrodactilia (Lezirovitz et al., 2008). Outros membros da família, tanto com fenótipo, como sem características

clínico-radiológicas, também foram avaliados, mostrando haver penetrância incompleta nesta família (Figura 17).

Figura 17. Visualização pelo *Genome Browser* da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC - <https://genome.ucsc.edu>) da microduplicação englobando o gene *BHLHA9* presente na família do probando F35.1

Dos casos com recorrência na família, em seis deles foi possível realizar o diagnóstico molecular. Os heredogramas estão listados na figura 18.

BF6 – Síndrome
TAR **C**F13 – Síndrome
de Coats plus **D**F15 – Síndrome
de Holt-Oram

E
F16 – Síndrome
de Holt-Oram

Figura 18. Heredogramas dos casos com recorrência nas famílias estudadas com comprovação molecular: A) F5 (síndrome TAR); B) F6 (síndrome TAR); C) F13 (síndrome de Coats plus); D) F15 (síndrome de Holt-Oram); E) F16 (síndrome de Holt-Oram); F) F35 (SHFLD)

Tabela 5. Testes genéticos utilizados, variantes encontradas e frequências e classificações das variantes

Família/ indivíduos	Testes genéticos	Gene (NM)	Status da variante	Nucleotídeo	Proteína	Posição genômica (GRCh37/hg19)	dbSNP	GnomAD v3.1 (Freq. pop.)	ABraOM (Freq. pop.)	Predição in silico (Mutation Taster/Re vel)	Classificação ACMG (critérios)	Hipótese clínica inicial - > Diagnóstico final	Descrição prévia na literatura
Formas síndrômicas (14/23)													
F1	Cariótipo banda C + Painel (Illumina Trusight One expanded)	ESCO2 (NM_0010 17420)	HOMO	c.874_877del	p.(Asp292Glufs*48)	chr8: 27637703- 27637706	rs80359856	0.000006573	0	D (NMD)	PAT (PVS1 + PM2 + PM3_sup)	Síndrome de Roberts (1/1)	(Gordillo et al., 2008)
F2	Painel (Illumina Trusight One expanded)	NSDHL (NM_0159 22)	HET	c.865G>T	p.(Glu289*)	chrX: 152037403G>T	Aus	0	0	D (NMD)	PP (PVS1 + PM2)	Síndrome CHILD (1/1)	-
F3	Exoma do probando (Agilent SureSelect exome v6)											Tetra-amelia com fenda orofacial (0/1)	
F4	Array (Array-CGH plataforma 180K)	RBM8A (NM_0051 05)	HER COMP			arr[GRCh37] 1q21.1(14538835 5_145833054)x1		Aus	Aus	Aus	PAT (*)	TAR (3/3)	(Albers et al., 2012)
	Painel (Illumina Trusight One expanded)	RBM8A (NM_0051 05)		c.-21G>A	p.(?)	chr1: 145507646G>A	rs139428292	0.018	0.020513	Aus	PAT (PS3_sup + PS4 + PM3_vs + BS2)		(Albers et al., 2012)
F5.1	Array (Array-CGH plataforma 60K)	RBM8A (NM_0051 05)	HER COMP - herdada da mãe			arr[GRCh37] 1q21.1(14541882 2_145799602)x1		Aus	Aus	Aus	PAT (*)		(Albers et al., 2012)
	Painel (Illumina Trusight One expanded)	RBM8A (NM_0051 05)	HER COMP - herdada do pai	c.*6C>G	p.(?)	chr1: 145509217C>G	rs12079762	0.04174	0.038429	Aus	PAT (PS4 + PS3_sup + PP4 + PM3_strong)		

F11	Sanger (ABI3730 DNA Analyser)	EIF4A3 (NM_014740)	HOMO	16 repetições em 5'UTR		chr17: 80147042-80147059		Aus	Aus	Aus	PAT (PS4 + PM2 + PM3_vs)	Síndrome de Richieri-Costa-Pereira (1/1)	(Favaro et al., 2014)
F12	Sanger (ABI3730 DNA Analyser) > Exoma do probando (Laboratório externo)	POLR1A (NM_015425)	HET - herdada do pai	c.3649del	p.(Gln1217Argfs*10)	chr2: 86267606	rs875989814	0	0.0004	D (NMD)	PAT (PVS1 + PM2 + PS4_sup + PM3)	Síndrome de Richieri-Costa-Pereira --> Acrodisostose Tipo Cincinnati (1/1)	(Weaver et al., 2015)
F13.1	Exoma do probando (Agilent SureSelect exome v6) + Sanger (ABI3730 DNA Analyser)	CTC1 (NM_025099)	HET COMP - herdada da mãe	c.1946-1G>C	p.(?)	chr17: 8135794C>G	Aus	0	0	D	PP (PVS1_strong + PM2 + PM3_sup)	? --> Síndrome Coats plus (1/1)	-
		CTC1 (NM_025099)	HET COMP - herdada do pai	c.2611G>A	p.(Val871Met)	chr17: 8134652C>T	rs369255297	0.00005914	0	N	PP (PS4_sup + PM2 + PM3_strong)		(Anderson et al., 2012)
F13.2*	Exoma (Laboratório externo) + Sanger (ABI3730 DNA Analyser)	CTC1 (NM_025099)	HET COMP - herdada da mãe	c.1946-1G>C	p.(?)	chr17: 8135794C>G	Aus	0	0	D	PP (PVS1_strong + PM2 + PM3_sup)		-
		CTC1 (NM_025099)	HET COMP - herdada do pai	c.2611G>A	p.(Val871Met)	chr17: 8134652C>T	rs369255297	0.00005914	0	N	PP (PS4_sup + PM2 + PM3_strong)		(Anderson et al., 2012)
F14	Array (Array-CGH plataforma 180K) + Painel (Illumina Trusight One expanded)											Síndrome de Holt-Oram (2/3)	
F15.1	Sanger (ABI3730 DNA Analyser)	TBX5 (NM_000192)	HET	c.247dup	p.(Met83Asnfs*13)	chr12: 114837433_114837434insT	Aus	0	0	D (NMD)	PP (PVS1 + PM2)		
F15.2*	Sanger (ABI3730 DNA Analyser)	TBX5(NM_000192)		c.247dup	p.(Met83Asnfs*13)	chr12: 114837433_114837434insT	Aus	0	0	D (NMD)	PP (PVS1 + PM2)		

Não síndrômicos (2/11)													
F24	Sanger (ABI3730 DNA Analyser)	WNT7A (NM_004625)	HET COMP - herdada do pai	c.1A>G	p.(?)	chr3: 13921313T>C	Aus	0	0	N	PP (PM2 + PM4 + PP4_mod)	Fuhrmann (1/1)	-
		WNT7A (NM_004625)	HET COMP - herdada da mãe	c.931C>A	p.(Arg311Ser)	chr3: 13860560G>T	Aus	0	0	D	PP (PM2 + PP3 + PM3 + PP4_mod)		-
F25	Exoma de trio (Agilent SureSelect exome v6) > Array (Array-CGH plataforma 180K)											FFU (0/6)	
F26	Exoma de trio (Agilent SureSelect exome v6) > Array (Array-CGH plataforma 180K)												
F27	Exoma do probando (Agilent SureSelect exome v6)												
F28	Exoma de trio (Agilent SureSelect exome v6) > Array (Array-CGH plataforma 180K)												
F29	Exoma de trio (Agilent SureSelect exome v6) > Array (Array-CGH plataforma 180K)												

F30	Exoma de trio (Agilent SureSelect exome v6)										
F31	Exoma do probando (Agilent SureSelect exome v6)										Tetra-amelia (0/1)
F32	Exoma de trio (Agilent SureSelect exome v6) > Array (Array-CGH plataforma 180K)										FATCO (0/2)
F33	Exoma de trio (Agilent SureSelect exome v6) > Array (Array-CGH plataforma 180K)										
F34	Exoma do probando (Agilent SureSelect exome v6) > Array (Array-CGH plataforma 180K) + Painel (Illumina Trusight One expanded)										SHFM (0/1)
F35.1	Array (Array-CGH plataforma 180K) + (Array 1M - Laboratório externo)	BHLHA9 (NM_0011 64405)	HET	arr[GRCh37] 17p13.3(1130137 _1191860)x3	Aus	Aus	Aus	Aus	PAT (*)	SHFLD (1/1)	(Lezirovitz et al., 2008)
F35.2*	Array (Array-CGH plataforma 180K) + (Array 1M - Laboratório externo)	BHLHA9 (NM_0011 64405)		arr[GRCh37] 17p13.3(1130137 _1191860)x3	Aus	Aus	Aus	Aus	PAT (*)		
F35.3*	Array (Array-CGH plataforma 180K) + (Array 1M - Laboratório externo)	BHLHA9 (NM_0011 64405)		arr[GRCh37] 17p13.3(1130137 _1191860)x3	Aus	Aus	Aus	Aus	PAT (*)		

Abreviações e siglas: F - Família; HOMO - Homozigose; HET - Heterozigose; HET COMP - Heterozigose composta; HER COMP - Herança composta; Aus - Ausente; Freq. Pop. - Frequência populacional; D - Danosa ; NMD - Decaimento do mRNA mediado por variantes nonsense; N - Neutra; PAT - Patogênica; PP - Provavelmente patogênica; VUS - Variante de significado incerto; ? - Sem hipótese diagnóstica inicial; * - parentes testados

5. Discussão

5.1. Dados epidemiológicos e características clínicas gerais

O estudo da etiologia genética na DCM é um desafio, dada a grande complexidade de fenótipos distintos associados a esta anomalia congênita (formas sindrômicas), assim como o não conhecimento das bases genéticas em diversas formas isoladas, não-sindrômicas (Mortier et al., 2019). Além disso, algumas síndromes do grupo da DCM podem apresentar expressividade variável, bem como, penetrância incompleta, o que impõem dificuldades maiores em identificar fatores genéticos que possam estar contribuindo para os fenótipos. Nomenclaturas e classificações distintas dos DCM foram criadas ao longo dos anos, demonstrando a dificuldade de análise deste grupo de anomalias congênitas. Gold e colaboradores realizaram uma classificação com o intuito de facilitar a identificação entre deficiências semelhantes, para diagnóstico clínico e etiológico (Gold et al., 2011).

Na presente casuística, dos 44 indivíduos incluídos, a grande maioria dos probandos eram casos isolados (80%) e constituíam uma casuística jovem, derivada de um serviço pediátrico terciário. De forma semelhante, em uma análise em quase 200 indivíduos com DCM no Japão, menos de 10% representavam casos familiares (Mano et al., 2018). Houve um leve predomínio do sexo feminino no presente estudo, o que contrasta com estudos epidemiológicos em diferentes populações, com uma maior prevalência de recém-nascidos do sexo masculino (Bedard et al., 2015; Vasluian et al., 2013), o que também foi observado em um estudo avaliando indivíduos com DCM não ao nascimento, mas em departamentos que acompanhavam crianças com essa anomalia congênita, como o de Pediatria, Ortopedia e Cirurgia Plástica, no Japão (Mano et al., 2018). Nas sete famílias com recorrência neste estudo, cinco (57%) delas apresentavam um padrão de herança mendeliano clássico, tanto autossômico dominante, particularmente naquelas que apresentavam o

diagnóstico da síndrome de Holt-Oram (F14-F16), como autossômico recessivo, no caso de F13, com irmãos de sexos distintos afetados.

O grau de acometimento dos membros foi amplo, desde a ausência total dos quatro membros, nos casos de tetra-amelia, até casos mais leves, sem uma anomalia evidente dos ossos longos, mas com uma hipoplasia do polegar ou da região tenar, no envolvimento do eixo pré-axial, em geral em familiares dos casos índices.

Na análise dos probandos (35 indivíduos), os membros superiores foram mais afetados, em geral, bilateralmente, porém, não necessariamente simétrico. De forma isolada, o comprometimento do membro superior estava presente em mais da metade da casuística (51,4%), o que contrasta com o observado com o acometimento isolado dos membros inferiores (11,4%). Estudos epidemiológicos avaliando DCM em diferentes países também observaram um maior envolvimento dos membros superiores. Na análise de detecção de anomalias congênitas entre os anos de 1980 e 2012 em Alberta, Canadá, Bedard e colaboradores (2015) observaram um envolvimento dos membros superiores de 63,9%, bem maior ao dos membros inferiores, de 25,3%. Na Holanda, este predomínio era duas vezes maior nos membros superiores (Vasluian et al., 2013).

Dentre os 30 probandos com ambos os lados afetados, a maioria (20/30 – 66,6%) apresentava mais de um tipo de osso longo acometido, sendo o mais comumente afetado, o rádio. Nos restantes, este osso também foi mais comumente afetado de forma individual.

Empregando a classificação anatômica proposta por Gold e colaboradores (2011), no presente estudo, incluindo indivíduos com vários ossos acometidos, houve um predomínio majoritário do comprometimento longitudinal dos membros (32/35 – 91,4%) e, dentro deste grupo, particularmente do eixo pré-axial, seja isolado, (28,1%), seja associado ao eixo pós-axial (59,4%).

A maior prevalência de acometimento de mais de um eixo, sendo pré-axial, central, pós-axial, também foi observada por Bedard et al., (2015). Quando os defeitos longitudinais foram analisados pelos envolvimento dos membros superiores e inferiores separadamente, Mano e colaboradores (2018) observaram que, diferente dos membros inferiores, nos quais os eixos pré e pós-axial eram acometidos com frequências semelhantes, nos membros superiores

havia um predomínio do acometimento do eixo radial (pré-axial). No presente estudo, dos 18 indivíduos com anomalias apenas nos membros superiores, apenas dois deles apresentavam acometimento isolado da ulna (11%). Nas outras situações, o eixo radial estava acometido de forma isolada, ou associado com anomalias da ulna, mas o envolvimento mais acentuado era do rádio. No envolvimento isolado dos membros inferiores, todos eles apresentavam acometimento pré e pós-axial, em concordância com os achados de Mano e colaboradores (2018).

No presente estudo, anomalias congênicas ou outros achados clínicos estavam presentes em 23/35 probandos (65,7%), constituindo as formas sindrômicas. Na literatura, a frequência de anomalias associadas aos DCM tem uma ampla variação. No estudo de Stoll e colaboradores (2010), analisando dados dos registros de anomalias congênicas na região de Strasburgo, na França, entre os anos de 1979 e 2004, a frequência geral de anomalias associadas foi de 57,9% (Stoll et al., 2010). Em alguns estudos, há exclusão no cálculo da frequência de outras anomalias congênicas de certas categorias, como a presença de outros sinais no sistema musculoesquelético ou mesmo de casos com etiologia definida ou um diagnóstico provável, como as associações. Nestas situações, a prevalência de outras anomalias congênicas fica ao redor de 27% (Klungsøyr et al., 2019). No presente estudo, a grande maioria dos casos com anomalias congênicas associadas apresentava um diagnóstico clínico de uma síndrome específica ou uma associação (17/23 – 74%). Nos casos restantes (6), excluindo ainda as anomalias musculoesqueléticas, observou-se a presença de anomalias congênicas associadas ao redor de 22%, semelhante ao reportado por Klungsøyr e colaboradores (2019).

O achado mais comum associado às DCM no presente estudo foram as anomalias do sistema cardiovascular em 8/23 (35%) indivíduos com achados adicionais, semelhante aos dados da literatura (Bedard et al., 2015; Klungsøyr et al., 2019; Mano et al., 2018; Vasluian et al., 2013). Estudos na literatura mostram que ocorre uma predominância do eixo radial associado a formas sindrômicas e dentre as anomalias, particularmente as cardíacas (Froster-Iskenius & Baird, 1989; Rosano et al., 2000; Syvänen et al., 2014). No presente estudo, todos os probandos com acometimento pré-axial estão contidos no grupo dos sindrômicos e dentre aqueles com anomalias cardíacas, 7/8 (87,5%)

apresentavam defeito do eixo pré-axial exclusivo ou predominante. Outras anomalias congênitas frequentes descritas por Klungsøyr e colaboradores (2019), além das anomalias cardíacas, foram as anomalias do sistema nervoso e as anomalias do sistema digestivo. Paralelo a isto, Stoll e colaboradores (2010) descreveram, além das anomalias associadas já descritas, anomalias urogenitais com uma maior porcentagem que as demais em seus estudos. Essas anomalias não foram frequentes no presente estudo. Por outro lado, outros achados comuns observados, após as anomalias cardiovasculares foram déficit de crescimento e/ou baixo peso (7/23 – 31%), anomalias craniofaciais, particularmente com fissura labial e/ou palatal (5/23 – 22%), anomalias cutâneas 5/23 (22%) e anomalias hematológicas, plaquetopenia (3/23 – 13%). Outros achados esqueléticos incluíram as anomalias vertebrais, a luxação congênita do quadril e a pseudo-atrofia da clavícula (Tabela 4).

Na presente casuística, os casos com acometimento central estão presentes no grupo dos não-sindrômicos, mesmo entre os que apresentavam acometimento conjunto pré e pós-axial (F33), central e pré-axial (F35.1) e apenas central (F34). Alguns estudos mostram correlação de acometimento de eixo central em malformações isoladas como SHFM (Elliott et al., 2005).

Em casos com múltiplos membros afetados, estudos mostram que a probabilidade de se obter um diagnóstico etiológico é maior quando comparada com indivíduos com apenas um membro acometido (Bergman et al., 2020; Stoll et al., 2001). Dos 35 probandos da casuística, 30 apresentavam acometimento de mais de um membro (85,7%). Dos cinco probandos restantes, três apresentavam o membro superior direito acometido (F17, F22 e F23), um apresentava o membro superior esquerdo afetado (F10) e um apresentava o membro inferior esquerdo afetado (F2).

5.2. Resultados gerais das análises moleculares na DCM

No presente estudo, variantes raras, classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes associados a fenótipos mendelianos foram encontradas em *ESCO2*, *NSDHL*, *RECQL4*, *EIF4A3*, *POLR1A*, *CTC1*,

TBX5 e *WNT7A*. Destas, quatro estavam em homozigose, duas em *RECQL4*, e uma em cada um dos genes *ESCO2* e *EIF4A3*, com histórico de consanguinidade entre os genitores em 2/4 (50%) desses probandos (F8 – *RECQL4* e F1 – *ESCO2*). Uma variante em *PUF60* foi classificada como VUS. A maioria das variantes eram de perda de função, incluindo as variantes do tipo *frameshift* e *nonsense*. Diferentes padrões de herança mendeliano foram observados nesta casuística, com sete fenótipos com um padrão de herança autossômico recessivo, cinco com um padrão autossômico dominante e um com fenótipo ligado ao X dominante (Tabela 5).

Em toda a casuística, dos 35 probandos, 16 (45,7%) apresentavam achados moleculares confirmando a hipótese clínica (14/16 – 87,5%) ou estabelecendo um diagnóstico definitivo não aventado previamente (2/16 – 12,5%). Do grupo dos síndrômicos foram 14 probandos com confirmação molecular (14/23 – 60,8%), nos quais, a maioria (11) pela técnica de NGS. Do grupo dos não síndrômicos, o diagnóstico pode ser realizado em 2 dos 12 probandos (16,7%) (Tabela 5). A comparação da positividade dos testes genéticos aplicados entre os dois grupos, síndrômicos e não-síndrômicos, evidencia uma positividade bem maior no grupo dos síndrômicos, uma diferença que é estatisticamente significativa ($P=0.0352$), pelo teste exato de Fisher.

Além de NGS, a realização do sequenciamento tradicional de Sanger, focado em genes de interesse, permitiu a confirmação do diagnóstico clínico em três probandos (F11, F15.1 e F24), além de ter sido a técnica empregada para a segregação das variantes em casos familiares.

Este tipo de sequenciamento (tradicional de Sanger), juntamente com análise de deleções intragênicas pela técnica do MLPA, de um grupo de 12 genes, sete já reconhecidamente associados a DCM (*GLI3*, *HOXD13*, *ROR2*, *SALL1*, *SALL4*, região *ZRS* do gene *SHH* e *TBX5*) e cinco genes candidatos, responsáveis pelo desenvolvimento de membros e até aquela época não associados a fenótipos clínicos (*EN1*, *HAND2*, *SPRY4*, *TWIST1* e *WNT7A*), foi empregado em um estudo realizado na Inglaterra, em 2009, em uma casuística grande, com 202 indivíduos com DCM provenientes de um serviço de Ortopedia Pediátrica de mãos. Os diagnósticos mais comuns foram a polidactilia (56%) e a sindactilia isolada ou associada à polidactilia (21%). A positividade encontrada foi de 11% (23 indivíduos), sendo os genes mais prevalentes o *GLI3*, *HOXD13* e

a região *ZRS*, em concordância com as características fenotípicas da casuística. Nenhuma variante foi encontrada nos genes candidatos. Dentre os achados clínicos que puderam ser associados a esta positividade e, portanto, à identificação de uma causa genética, os autores destacaram o envolvimento bilateral dos membros, uma história familiar positiva e um maior número de membros afetados (Furniss et al., 2009). No presente estudo também foi possível observar uma maior positividade dos testes genéticos empregados naqueles pacientes com envolvimento bilateral dos membros e com um maior número de membros afetados, 22 probandos dos 35 apresentam dois ou mais membros afetados (62,8%).

Embora o NGS venha sendo utilizado cada vez com maior frequência no diagnóstico molecular de grupos de doenças monogênicas, há apenas uma descrição na literatura do emprego desta técnica em um grupo amplo, heterogêneo de DCM (Jourdain et al., 2020). Estes autores realizaram uma análise de 52 genes e regiões regulatórias por NGS em 352 indivíduos com DCM. Esses indivíduos foram avaliados por médicos geneticistas e divididos em sete grupos, incluindo defeitos radiais (o mais comum, correspondendo a quase 30% da casuística), defeitos de redução de membros, ectrodactilia, polidactilia, braquidactilia, anomalias de fusão e hipoplasia da patela.

Embora os critérios de inclusão do estudo de Jourdain et al. (2020) e o aqui presente sejam distintos, pode-se comparar alguns grupos. Naquele composto por 101 indivíduos com defeitos do eixo radial, incluindo as síndromes clássicas de Holt-Oram, TAR, Nager, Okihira, Townes-Brocks (OMIM #107480 e #617466) e doenças associadas a *RECQL4*, a positividade dos testes no estudo de Jourdain et al. (2020) foi de 32,7%, sendo maior entre os indivíduos com diagnóstico das síndromes de TAR (36,4%) e Nager (50%). No presente estudo, a positividade entre os indivíduos com defeitos de eixo radial como um todo foi maior, de 50% (13/26).

É interessante notar que no estudo de Jourdain et al. (2020), em dois pacientes com duplicação do polegar e outras malformações associadas, foram encontradas variantes no gene *PUF60*: p.(Ile136Thrfs*31) e p.(Met117Serfs*55). Nestes dois casos, o diagnóstico inicial foi das síndromes de Okihira e Townes-Brocks.

Em dois casos do presente estudo, o emprego de NGS, com a investigação de diversos genes, por um painel ou exoma, permitiu estabelecer um diagnóstico preciso, não aventado anteriormente: no caso F12, o diagnóstico do tipo de disostose acrofacial foi modificado, da síndrome de Richieri-Costa Pereira para AFD tipo Cincinnati e, no caso F13, o estudo molecular permitiu estabelecer o diagnóstico da síndrome de Coats plus.

Por outro lado, no grupo dos defeitos de redução de membros não-sindrômicos, entre os 42 indivíduos avaliados por Jourdain et al. (2020), excluindo aqueles com defeitos radiais e mãos e pés fendidos, a positividade do NGS foi de apenas 9,5%. Nos pacientes com defeitos longitudinais e transversais e naqueles com focomelia/amelia, nenhuma variante rara ou CNVs, avaliadas por *array* genômico, foi encontrada que pudesse explicar esses DCM. Os autores relatam que alguns destes fenótipos, como a síndrome facial-femoral, não apresentam etiologia conhecida. De forma semelhante, a positividade no presente estudo entre os indivíduos com DCM não-sindrômicos foi 2/12 (16,6%).

Variante de ponto novas, não reportadas previamente, foram encontradas em quatro probandos, três do grupo dos sindrômicos, nos genes *NSDHL*, *CTC1* e *PUF60*, e uma no grupo dos não sindrômicos no gene *WNT7A*, ampliando assim o espectro de variantes associadas a estes genes. Em *TBX5* foi encontrada uma duplicação intragênica nova, não reportada na literatura, em um caso familiar do grupo dos sindrômicos.

A avaliação de CNVs neste estudo foi realizada em algumas ocasiões por *array* genômico e, em outras, por NGS, através de *softwares* específicos para este fim. O *array* genômico foi empregado no caso familiar de ectrodactilia com deficiência do osso longo (F35), tendo sido identificada a duplicação do gene *BHLHA9* em seis indivíduos, sendo que apenas três apresentavam o fenótipo, demonstrando uma penetrância de apenas 50% nesta família (Figura 4). No estudo de Jourdain e colaboradores (2020), entre os quatro indivíduos com ectrodactilia com deficiência de osso longo, dois (50%) apresentavam alterações em *BHLHA9*. Este gene também estava associado a quadros isolados de ectrodactilia, mostrando sua importância neste tipo de DCM.

Na síndrome TAR, a microdeleção em 1q21.1 foi avaliada por ambas as técnicas, *array* genômico e NGS, em quase todos os indivíduos (F4, F5.1 e F6.3), com exceção de F6.1, avaliado apenas por NGS (Figura 12-16; Tabela 5). Da

mesma forma, em um paciente com a síndrome de Holt-Oram, a duplicação intragênica foi avaliada por *array* genômico e pelo painel. A detecção de CNVs por ambas as ferramentas demonstra os avanços técnicos obtidos nos últimos anos no desenvolvimento de testes genômicos mais amplos, que permitem analisar tanto variantes de ponto e pequenas deleções e inserções, como também deleções e inserções maiores em um mesmo experimento, aumentando o poder de detecção (Ellingford et al., 2017; Ji & Chen, 2016; Kerkhof et al., 2017).

Na comparação das características inerentes aos defeitos ósseos entre os grupos constituídos por formas sindrômicas (30) e aqueles com DCM de forma isolada (14), diferenças estatisticamente significantes foram observadas no acometimento dos membros inferiores, presentes em todos os indivíduos nas formas isoladas e apenas em cinco dos indivíduos com formas sindrômicas ($P=0,0028$) e no tipo da classificação anatômica, sendo o acometimento pré-axial exclusivo presente em 15 indivíduos do grupo sindrômico e em nenhum do grupo de DCM isolado ($P=0,0125$).

5.3. Formas sindrômicas clássicas associadas a DCM

Dentre os diagnósticos das formas sindrômicas associadas a DCM, duas síndromes se destacam por serem reconhecidas como aquelas recorrentes associadas a DCM, a síndrome de Holt-Oram e a síndrome TAR, ambas com envolvimento do eixo pré-axial.

5.3.1. Síndrome de Holt-oram e diferentes variantes intragênicas

A síndrome de Holt-Oram apresenta como sinais clínicos cardinais o acometimento do membro superior (eixo radial) e anomalias cardíacas estruturais. A expressividade deste quadro clínico na síndrome é muito variável, desde achados esqueléticos subclínicos até uma focomelia, e desde distúrbios

de condução até graves defeitos cardíacos estruturais. Esta expressividade variável pode ser observada tanto inter como intrafamiliar. Os achados mais típicos incluem a presença de um polegar trifalangeano e defeito cardíaco septal (comunicação interatrial). O envolvimento esquelético mais comumente é bilateral e assimétrico, sendo o lado esquerdo mais acometido que o direito. Muitos pacientes podem apresentar anomalia da cintura escapular, com ombros estreitos, caídos (Patel et al., 2012).

Dentre os três probandos com hipótese diagnóstica da síndrome de Holt-Oram avaliados no presente estudo (F14, F15.1 e F16.1), em dois deles (F15.1 e F16.1) foi possível confirmar o diagnóstico, ambos casos familiares, com expressividade variável do fenótipo (Figura 1; Tabela 5).

A síndrome de Holt-Oram decorre de variantes em heterozigose no gene *TBX5*, compatível com um padrão de herança autossômico dominante. O encontro de variantes neste gene em indivíduos com critérios clínicos bem estabelecidos é de 74% (Mcdermott et al., 2005). No presente estudo, as variantes encontradas em *TBX5*, em heterozigose, incluía uma inserção de um único par de base, levando a um *frameshift* p.(Met83Asnfs*13) e uma duplicação intragênica do éxon sete e parte dos íntrons seis e sete, detectada pelo *array* genômico e pela pesquisa de CNVs em um painel NGS. Os estudos realizados no probando F16.1 foram dirigidos para esta alteração específica, uma vez que havia sido detectado em uma prima do paciente em um estudo no exterior. A maioria das variantes em *TBX5* reportadas na literatura associadas à síndrome de Holt-Oram são de perda de função (variantes do tipo *nonsense*, *frameshift* e no sítio de *splicing*), semelhante àquela encontrada em F15.1 no presente estudo. Estas variantes levam à formação de códons de parada prematuros, levando a proteínas truncadas que não conseguem desempenhar sua função. O mecanismo pelo qual essas variantes causam a síndrome de Holt-Oram é por haploinsuficiência (Al-Qattan & Abou Al-Shaar, 2015). Outros tipos de variantes, como as do tipo *missense*, *stop-loss* e duplicações intragênicas, como a presente em F16.1, são mais raras e podem levar a quadros mais leves, não-clássicos (Al-Qattan & Abou Al-Shaar, 2015). Essas variantes mais raras parecem exercer um mecanismo patogênico distinto da haploinsuficiência, de acordo com sua localização nos diferentes domínios da proteína e as interações que ocorrem nestes domínios, embora o mecanismo exato ainda não tenha sido esclarecido

(Al-Qattan & Abou Al-Shaar, 2015; Kimura et al., 2015). Duplicações intragênicas envolvendo diferentes éxons foram reportadas em raras ocasiões na literatura. Na família descrita por Patel et al (2012) havia uma duplicação intragênica em *TBX5* de 48 kb, incluindo os éxons dois a nove. Já na descrita por Kimura et al. (2015), a duplicação envolvia os éxons um a seis. Embora os achados clínicos esqueléticos tenham sido descritos como leves na primeira família Patel et al. (2012), na outra família descrita por Kimura et al. (2015), com mãe e filho afetados, os achados foram considerados típicos, com envolvimento bilateral assimétrico do eixo radial e defeitos cardíacos septais no probando e anomalias cardíacas e hipoplasia tenar bilateral em sua mãe (Kimura et al., 2015; Patel et al., 2012). No presente estudo, o probando da família F16.1 com alteração do éxon sete e parte dos íntrons flanqueadores, apresentava, diferente dos demais casos, um envolvimento simétrico dos membros superiores.

Na literatura, 1/4 dos indivíduos com diagnóstico clínico compatível com a síndrome de Holt-Oram não apresentam variantes detectadas em *TBX5*. De forma semelhante, na nossa casuística em um dos pacientes avaliados (1/3), variantes pontuais não foram encontradas pela técnica de NGS. É possível que variantes intrônicas profundas, localizadas em regiões regulatórias ou mesmo deleções ou duplicações intragênicas não detectadas, sejam responsáveis por esses casos negativos. As duplicações e deleções intragênicas, em particular, constituem uma classe de variantes que são mais difíceis de serem detectadas pelas técnicas mais utilizadas, como NGS e *arrays* genômicos, a depender da sua extensão. A técnica do MLPA é a mais adequada, mas nem sempre disponível. Kimura et al. (2015) enfatizaram a importância de se incluir a análise de duplicações na rotina da investigação molecular na síndrome de Holt-Oram. No presente, o emprego do sequenciamento do genoma é uma técnica que permite avaliar de forma global, tanto as variantes pontuais, como deleções/duplicações intragênicas.

5.3.2. Síndrome TAR e diferentes polimorfismos

A síndrome TAR apresenta um achado clínico bem específico, a preservação dos polegares com agenesia bilateral do rádio, associado a

plaquetopenia, que tende a ser transitória. Seu mecanismo patogênico também difere do padrão clássico de uma herança autossômica recessiva, por apresentar uma microdeleção de tamanho variável em 1q21.1, envolvendo o gene *RBM8A* (ou uma variante de ponto de perda de função), em *trans* com um polimorfismo, uma variante comum. Dois polimorfismos (c.-21G>A e c.67+32G>C) foram descritos por Albers et al. (2013), com frequências em bancos de dados populacionais de 3,05% e 0,41%, respectivamente, em um estudo de 55 indivíduos com TAR avaliados. Apenas em um caso dentre os 55, o qual não apresentava descendência europeia, esses dois polimorfismos não foram encontrados (Albers et al., 2013).

No presente estudo, três probandos foram avaliados, todos com microdeleções em 1q21.1, com extensões que variavam entre 195 kb e 445 kb, englobando o gene *RBM8A*. Na literatura, as microdeleções apresentam um tamanho médio de 200 kb (Klopocki et al., 2007). No entanto, apenas um indivíduo (F4) apresentava o polimorfismo mais comum (c.-21G>A) (Figura 12). No estudo de Jourdain et al. (2020), na França, seis dos 11 pacientes avaliados com diagnóstico clínico de TAR, embora todos apresentassem a microdeleção em 1q21.1 envolvendo o gene *RBM8A*, apenas metade (54,5%) possuía em *trans* o polimorfismo comum já descrito (c.-21G>A). Em quatro destes indivíduos, uma variante classificada como VUS foi encontrada na região não-codificadora do gene (Jourdain et al., 2020). De forma semelhante, o polimorfismo comum também não estava presente em 66,7% (2/3) dos nossos probandos. Nestes dois casos familiares, dois novos polimorfismos foram encontrados com o sequenciamento do painel, rs12079762, encontrado na região 3'UTR, e rs59285351, presente no íntron 2 do gene *RBM8A*. Boussion e colaboradores (2020), do mesmo grupo de Jourdain et al. (2020), descreveram uma coorte maior, com 26 indivíduos com TAR, dos quais 11 indivíduos não apresentavam nenhum dos polimorfismos comuns. No entanto, eles observaram a presença de um polimorfismo localizado na região 3'UTR (rs12079762) nestes indivíduos, cujos estudos funcionais demonstraram um efeito hipomórfico (Boussion et al., 2020). Este mesmo polimorfismo estava presente em F5.1 e F6.1 no presente estudo. Esta variante comum apresenta uma frequência populacional no banco de dados do GnomAD de 4,17%, sendo bem mais prevalente na população africana (14,8%) e, no banco de dados da população brasileira (AbraOM), 3,84%.

Boussion e colaboradores (2020) observaram que sete dos 11 indivíduos com este polimorfismo eram de origem das regiões do norte ou oeste da África ou das Antilhas, demonstrando a importância da diferença nas frequências alélicas de variantes de acordo com as diversas populações. De forma semelhante, como a população brasileira é miscigenada, incluindo uma expressiva contribuição africana, é muito provável que este polimorfismo seja o responsável pelo efeito hipomórfico requerido para o desenvolvimento do fenótipo da síndrome de TAR em uma porcentagem considerável de indivíduos brasileiros com esta síndrome, como demonstrado por Boussion e colaboradores (2020) para indivíduos de descendência africana.

O caso familiar F6 apresenta uma transmissão vertical, com pai e filhas afetadas, o que não seria comum em um padrão requerendo variantes bialélicas em um determinado gene. No entanto, por se tratar de um mecanismo particular (herança composta), o que ocorreu foi a transmissão da microdeleção (evento mais raro) para a descendência pelo pai afetado e o polimorfismo (evento mais comum) foi herdado do outro genitor. Outro caso com transmissão vertical foi reportado na literatura (Klopocki et al., 2007).

5.3.3. Genodermatoses e anomalias de membros: a síndrome de Rothmund-Thomson e CHILD

As genodermatoses constituem um grupo amplo de doenças hereditárias com envolvimento ectodérmico. No presente estudo foram incluídos indivíduos com lesões cutâneas e anomalias de membros, com diagnósticos clínicos da síndrome de Rothmund-Thomson (F7-F10) e CHILD (F2).

A síndrome de Rothmund-Thomson, uma doença autossômica recessiva, caracteriza-se pela presença de lesões poiquilomatosas, baixa estatura, cabelos, sobrancelhas e cílios esparsos. Esta síndrome foi classificada em dois tipos, sendo o tipo I aquele associado a catarata juvenil e o tipo II, sem catarata, mas com risco aumentado para câncer. Dentre os achados esqueléticos, presentes no tipo II, defeitos do eixo pré-axial dos membros superiores são os mais prevalentes. Este tipo está associado a variantes bialélicas em *RECQL4*. Dois outros fenótipos, com sobreposição clínica à síndrome de Rothmund-

Thomson tipo II também decorrem de variantes bialélicas em *RECQL4*, a síndrome de Baller-Gerold e RAPADILINO (Larizza et al., 2010).

Dos quatro probandos avaliados com hipótese da síndrome de Rothmund-Thomson (F7, F8, F9 e F10), todos com defeitos do eixo pré-axial, em apenas um não foram encontradas variantes raras em *RECQL4* (F10). Na evolução desta paciente, a presença do eritema facial inicial não progrediu para uma lesão poiquilomatosa, o que torna mais provável que o defeito radial seja um achado isolado.

A positividade neste diagnóstico específico foi maior (3/4 – 75%), quando comparado com o estudo de Jourdain et al. (2020), no qual dos três indivíduos incluídos com diagnósticos associados a doenças do *RECQL4*, apenas um foi confirmado (Jourdain et al., 2020). Dentre as variantes encontradas no presente estudo, todas de perda de função, dois probandos não aparentados apresentaram a mesma deleção de 11 pares de bases no íntron oito. Esta deleção é recorrente, já tendo sido reportadas em indivíduos provenientes de diferentes populações, como África/afro-americanas e europeia (não finlandesa) (Wang et al., 2002).

Na síndrome CHILD, o envolvimento ectodérmico caracteriza-se por uma eritrodermia ictiosiforme com uma demarcação na linha média do corpo, com o defeito de membro sendo ipsilateral, que pode variar desde um encurtamento de falanges e metacarpos até uma amelia de membro superior. É uma doença monogênica ligada ao X, geralmente letal no sexo masculino, decorrente de variantes de perda de função em *NSDHL* (Morimoto et al., 2012). O indivíduo aqui incluído (F2) era do sexo feminino, com quadro clínico compatível com esta síndrome, mas com envolvimento do membro inferior, e apresentava uma variante *nonsense*, não reportada previamente, em *NSDHL* (Mi et al., 2015).

5.3.4. Genes da via de sinalização WNT/ β catenina e DCM grave

A via de sinalização WNT/ β catenina desempenha um papel importante e amplo em vários processos celulares, tanto durante o desenvolvimento embrionário, como na vida adulta. A partir da avaliação de fenótipos com

anormalidades ósseas, uma nova função, na homeostasia óssea, foi incluída entre todas as atividades desempenhadas por esta via de sinalização. Entre os diversos genes que fazem parte desta via, os genes da família WNT são glicoproteínas que funcionam como ligantes, seja da via canônica, como *WNT3* e *WNT7A*, seja das vias não-canônicas, como *WNT5A*. Esta via sofre ação de genes modulares extra-celulares, seja inibidores ou ativadores, contribuindo para a sua regulação. Variantes em alguns destes genes, como *WNT7A*, *WNT3* e *RSPO2*, levam a quadros graves de DCM, que no seu extremo caracteriza a tetra-amelia (Huybrechts et al., 2020).

Em nossa casuística, apenas um indivíduo (F24) apresentou variantes novas, bialélicas em *WNT7A*, uma variante na primeira metionina (c.1A>G), e outra variante *missense* (c.931C>A, p.(Arg311Ser)).

O gene *WNT7A* forma um complexo com LRP6 e FZD5 levando a ativação da via de sinalização WNT. Seu produto está envolvido no desenvolvimento do eixo dorsoventral do membro e na manutenção da expressão do SHH, contribuindo também no eixo anteroposterior. Dois fenótipos mendelianos muito raros, com um padrão de herança autossômico recessivo, com DCM grave e quadro clínico sobreponível, foram reportados associados a variantes em *WNT7A*: AARRS e FS (Al-Qattan et al., 2013). Na síndrome AARRS, decorrente de variantes de perda de função em ambos os alelos, o fenótipo é mais grave, com anomalias dos membros superiores (úmero em geral preservado, com presença de um único osso em antebraço e oligodactilia) e um acometimento maior em membros inferiores, com um gradiente proximal-distal, hipoplasia da pelve, unhas hipoplásicas ou ausentes, ausência de útero e genitália localizada mais anteriormente. Na FS, com uma função residual da proteína, o fenótipo é mais leve, caracterizado por uma deficiência da ulna e oligodactilia (Garavelli et al., 2011; Huybrechts et al., 2020). Há diversos artigos que discutem a distinção entre a AARRS e FS, sendo que em 2013, Al-Qattan e colaboradores propuseram uma classificação baseada nos achados moleculares, sendo que a FS seria decorrente de variantes com uma perda leve ou moderada na função do produto e a síndrome AARR, uma perda completa. Nos aspectos clínico-radiológicos observa-se uma expressividade variável no grau de acometimento do membro superior. Embora o eixo ulnar esteja sempre envolvido, a variabilidade pode ser observada no número de dígitos acometidos e na

gravidade do acometimento dos cotovelos e antebraços (Al-Qattan, 2013). Utilizando-se esta classificação, a paciente do presente estudo seria incluída na classificação da deficiência do eixo radial dos membros superiores como grau II (leve), sendo o quadro clínico-radiológico mais compatível com FS.

As variantes reportadas na literatura descritas em *WNT7A* associadas com os diferentes fenótipos estão dispostas na tabela abaixo (Tabela 7). Diferente das variantes reportadas até o presente, todas em homozigose em 13 famílias com consanguinidade, a paciente deste estudo apresenta duas variantes distintas, em heterozigose composta, cada uma herdada de um dos genitores. A variante c.1A>G prediz alteração da primeira metionina que iniciaria a tradução deste gene. O potencial efeito seria a ativação da próxima metionina na sequência do gene, o que ocorreria 17 aminoácidos à frente do sítio de iniciação.

Tabela 6. Variantes reportadas na literatura descritas em *WNT7A*

Família	Variante (alelo 1)	Variante (alelo 2)	Diagnóstico	Referência
F1	c.1179C>T, p.Arg279Cys	1179C>T, p.Arg279Cys	AARRS	(Woods et al., 2006)
F2	c.630G>A, p.Ala109Thr	c.630G>A, p.Ala109Thr	FS	(Woods et al., 2006)
F3	c.915G>A, p.Gly240Ser	c.915G>A, p.Gly240Ser	AARRS	(Al-Qattan et al., 2013)
F4	c.664C > T, p.Arg222Trp	c.664C > T, p.Arg222Trp	AARRS	(Piranit N. Kantaputra et al., 2010)
F5	c.214G>A, p.Glu72Lys	c.214G>A, p.Glu72Lys	AARRS	(Garavelli et al., 2011)
F6/F7	c.610G>A, p.Gly204Ser	c.610G>A, p.Gly204Ser	AARRS	(Eyaid et al., 2011)
F8	c.610G>A, p.Gly204Ser	c.610G>A, p.Gly204Ser	FS	(Al-Qattan et al., 2013)
F9	c.874C>T, p.Arg292Cys	c.874C>T, p.Arg292Cys	AARRS	(Al-Qattan et al., 2013)
F10	c.814G>T, p.Glu272*	c.814G>T, p.Glu272*	AARRS	(Al-Qattan et al., 2013)
F11	c.304C>T, p.Arg102Trp	c.304C>T, p.Arg102Trp	AARRS	(Mutlu et al., 2016)
F12	c.934G>A, p.Gly312Ser	c.934G>A, p.Gly312Ser	Santos syndrome	(Alves et al., 2017)
F13	c.550A>C, p.Asn194Asp	c.550A>C, p.Asn194Asp	AARRS	(Kantaputra et al., 2017)

AARRS: síndrome de Al-Awadi-Raas-Rothschild; FS: síndrome de Fuhrmann

A tetra-amelia constitui uma anomalia óssea extremamente rara, com ausência dos quatro membros. Frequentemente há outras malformações associadas, particularmente hipoplasia/agenesia pulmonar e fenda lábio-palatal. Variantes bialélicas em *WNT3* e *RSPO2* já foram associadas a este fenótipo em poucos casos estudados. O gene *WNT3* é essencial para a formação do eixo longitudinal e crescimento ósseo nos vertebrados.

Uma única variante *nonsense* em homozigose em *WNT3*: c.366C>T, p.(Glu83*) foi encontrada em um caso familiar de um casal consanguíneo com quatro fetos apresentando tetra-amelia e uma combinação de diversas outras malformações: fissura lábio-palatal, microftalmia, gastrosquise, agenesia renal, de baço, persistência da cloaca, atresia anal, entre outras anomalias (Niemann et al., 2004). Pela presença dessas malformações não usuais associadas nesta família, o diagnóstico de tetra-amelia foi questionado por outros pesquisadores, sendo mais compatível com o diagnóstico da focomelia tipo Zimmer (Sousa et al., 2008).

O gene *RSPO2* desempenha uma atividade agonista na via canônica do WNT, com alta expressão na AER dos brotos dos membros, mas também no esqueleto, pulmões e cérebro em tecidos pós-natais (Huybrechts et al., 2020). Neste caso, variantes bialélicas de perda de função neste gene foram encontradas em quatro casos de tetra-amelia com agenesia/hipoplasia pulmonar. Uma variante em homozigose *missense*: c.205G>C, p.(Arg69Cys) foi também encontrada em uma família com os afetados apresentando deficiência do eixo radial, com envolvimento do úmero, ausência da tíbia com ou sem deficiência femoral e ausência de dedos no eixo pré-axial. Os autores propuseram o nome de hipoplasia úmero-femoral com deficiência dos raios radial-tibial para este fenótipo (Szenker-Ravi et al., 2018).

Dois indivíduos no presente estudo apresentavam tetra-amelia, um (F31), apenas com as anomalias de membros, sem outras malformações associadas, e outro com fenda lábio-palatal (F3). Este último faleceu com poucas horas de vida, sem exames adicionais ou necropsia realizada, não sendo possível averiguar com precisão a presença de outras anomalias associadas.

O sequenciamento do exoma em ambos não evidenciou variantes raras nas regiões codificadoras dos genes *WNT3* e *RSPO2*. Além disso, nenhuma

outra variante rara em outro gene da via WNT foi encontrada. É possível que variantes em regiões regulatórias de um desses dois genes estejam presentes e não tenham sido observadas por limitações da técnica empregada. Estudos mais amplos, incluindo o sequenciamento do genoma, podem auxiliar para avaliar tanto as regiões não-codificadoras, como a presença de alguma CNV que possa explicar o fenótipo da tetra-amelia nesses indivíduos.

No probando com tetra-amelia e fenda oral, sem alterações nos genes já associados à tetra-amelia (*WNT3* e *RSPO2*), vale ressaltar que sua mãe fez uso de Ondansetrona, por hiperemese gravídica. A possibilidade desta medicação predispor a anomalias congênitas, particularmente fendas orais foi recentemente descrita (Huybrechts et al., 2018). Até o presente, o possível efeito teratogênico de Ondansetrona não está totalmente comprovado, sendo que a fenda oral é reportada com frequência em casos com tetra-amelia, podendo fazer parte do quadro clínico (Bermejo-Sánchez et al., 2011). Desta forma, embora não seja possível descartar um possível efeito teratogênico da Ondansetrona, o mais provável é que a fissura lábio-palatal seja parte do quadro clínico da tetra-amelia.

Entre os diagnósticos diferenciais da tetra-amelia, destaca-se a síndrome de Roberts, pelo envolvimento acentuado dos membros.

A síndrome de Roberts é uma síndrome genética rara com herança autossômica recessiva. O envolvimento dos membros é simétrico, uma tetrafocomelia, na quase totalidade dos casos. Em 1969 chegou a ser chamada de “pseudo talidomida” por apresentar fenótipo semelhante ao ocasionado por exposição à talidomida durante a gravidez. Apresenta ainda microcefalia, fenda labiopalatal, anomalias oculares, cardíacas e renais, além de déficit de crescimento e deficiência intelectual. Há uma associação entre a gravidade das malformações e a sobrevivência, sendo que a maioria dos indivíduos com um quadro grave não sobrevive mais que alguns meses de vida (Van den Berg & Francke, 1993).

Nesta síndrome, apesar de ser monogênica, uma alteração citogenética foi observada no final da década de 70, envolvendo os centrômeros (Van den Berg & Francke, 1993). No presente estudo, o estudo inicial realizado em F1, com hipótese clínica da síndrome de Roberts, foi o estudo cromossômico com bandamento C, mostrando as separações prematuras dos centrômeros, confirmando assim esse diagnóstico (Figura 5). O estudo molecular do gene

ESCO2 evidenciou uma variante de perda de função em homozigose: p.(Asp292Glufs*48). A mesma variante foi encontrada em um neonato brasileiro do Sul do país com quadro típico e grave da síndrome de Roberts, que evoluiu para o óbito com 20 dias de vida (da Costa Almeida et al., 2020). Embora a paciente aqui reportada apresente a mesma alteração molecular, com um quadro grave, aos cinco anos de idade ela vem evoluindo com bom desenvolvimento cognitivo, apenas com dificuldade na fala por apresentar uma insuficiência velofaringeana (Vega et al., 2010).

5.4. Síndromes recentemente descritas, ainda em delineamento: síndrome de Richieri-Costa-Pereira, AFD tipo Cincinnati, síndrome de Verheij e síndrome Coats plus

5.4.1. Disostoses acrofaciais

As AFDs constituem um grupo amplo de fenótipos que apresentam características craniofaciais que se sobrepõem, como inclinação ínfero-lateral das fendas palpebrais, coloboma da pálpebra inferior, hipoplasia da região malar, micrognatia, anomalias auriculares e déficit auditivo, além das anomalias dos membros. As alterações nos membros permitiram classificar as AFD em pré-axiais, pós-axiais e outros tipos. Os fenótipos mais conhecidos incluem a síndrome de Nager, com defeito pré-axial e a síndrome de Miller, com defeito pós-axial. A síndrome de Richieri-Costa-Pereira, uma AFD mais rara, é classificada em outros tipos de AFD (Wieczorek, 2013). Diversos tipos de AFD não apresentam etiologia genética conhecida e recentemente, uma delas, a AFD tipo Rodriguez, foi associada a variantes no mesmo gene (*SF3B4*) responsável pela síndrome de Nager, sendo que atualmente, a AFD tipo Rodriguez é considerada uma forma grave dentro do espectro de síndrome de Nager (Drivas et al., 2019).

A síndrome de Richieri-Costa-Pereira é uma doença autossômica recessiva, com a quase totalidade dos casos descritos no Brasil, caracterizada

pela presença de anomalias craniofaciais, onde se destaca a presença de uma fissura mediana na mandíbula, a sequência de Pierre-Robin, anomalias de laringe e defeitos pré e pós axiais em membros, algumas vezes de forma grave. As bases moleculares desta síndrome foram identificadas em 2014, evidenciando uma expansão complexa de repetições de um conjunto de 18 ou 20 nucleotídeos na região 5'UTR no gene *EIF4A3*. Enquanto na população controle essas repetições podem variar em número entre três e 12, nos indivíduos com a síndrome de Richieri-Costa-Pereira, todos apresentavam repetições entre 14 e 16, mais frequentemente 16 repetições em homozigose (Favaro et al., 2014). O indivíduo incluído neste estudo, com 16 repetições em homozigose na região 5'UTR de *EIF4A3*, apresentava um quadro grave, tanto do acometimento craniofacial, como dos membros. Neste último, observou-se anomalias pré e pós-axiais, com hipoplasia dos ossos longos dos membros superiores e inferiores.

A AFD tipo Cincinnati foi recentemente descrita em apenas três indivíduos não aparentados, com um fenótipo muito variável entre eles. O envolvimento dos membros foi observado em dois deles, com um encurvamento do fêmur, alargamento metafisário e atraso na ossificação da epífise proximal femoral em um indivíduo e dedos curtos e largos em outro indivíduo. Variantes em heterozigose no gene *POLR1A*, duas *missense* e um *frameshift* foram encontrados nos três indivíduos. Esta última variante p.(Gln1217Arg*fs10) estava presente em uma paciente de origem brasileira, apenas com comprometimento craniofacial e havia sido herdada de seu pai com um fenótipo leve (Weaver et al., 2015). Estudos funcionais, através de emprego de *zebrafish* mostraram a presença de anomalias cranianas e esqueléticas semelhantes aos apresentados pelos pacientes avaliados. O mecanismo etiológico proposto foi de perda de função deste gene, com prejuízo na biogênese dos ribossomos, com consequente deficiência de células precursoras ósseas derivadas da crista neural (Watt et al., 2018). A variante encontrada na paciente F12 do presente estudo é a mesma que a variante descrita na paciente brasileira no artigo de Weaver e colaboradores (2015). No presente estudo, a probanda apresentava alterações predominantemente do eixo pré-axial nos membros superiores e também em pés, com hipoplasia radial, polidactilia pré-axial e háluces trifanlangeanos (Figura 3), o que contrasta com a ausência de anomalias de

membros na paciente reportada previamente. No caso reportado por Weaver e colaboradores (2015), a variante foi herdada de um genitor com quadro leve e, no presente estudo, a variante estava presente no pai da criança, sem alterações craniofaciais ou de membros. Além disso, essa variante está presente em um indivíduo controle no banco de dados da população brasileira (ABraOM). Estes achados demonstram que não apenas a expressividade nesta AFD é variável, mas também a penetrância é incompleta, justificando a procura de outros fatores genéticos e/ou ambientais que possam contribuir para a expressão do fenótipo.

5.4.2. Síndrome de Verheij

O gene *PUF60* foi recentemente associado a uma síndrome com microcefalia, baixa estatura, coloboma ocular, deficiência intelectual e múltiplas malformações. Inicialmente, uma microdeleção em 8q24.3, envolvendo entre outros genes, o *PUF60*, foi descrito em dois pacientes por Verheij e colaboradores em 2009. Deleções menores e variantes de ponto em *PUF60* em novos casos permitiram estabelecer este gene como o responsável pelo fenótipo. Na análise de 12 novos pacientes com variantes de ponto em *PUF60*, associados aos demais pacientes já reportados, Low e colaboradores (2017) avaliaram as características clínicas e observaram que o fenótipo é variável e de difícil reconhecimento, sendo os mais frequentes a baixa estatura, microcefalia relativa, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor/deficiência intelectual. Os achados musculoesqueléticos envolvem anomalias de segmentação vertebral, hiperextensibilidade articular com luxações, incluindo luxação congênita do quadril, e anomalias digitais, como polidactilia pré-axial, encurtamento do 5º dedo, com clinodactilia (Low et al., 2017). No presente estudo, a paciente (F18) com variante *missense* em *PUF60*, apresentava deficiência intelectual, anomalias craniofaciais, fusão vertebral cervical, luxação congênita de quadril, além de hipoplasia do polegar. Embora anomalias do eixo radial tenham sido descritas em alguns casos, este achado não foi enfatizado como um achado cardinal. No entanto, neste estudo, assim como no estudo de Jourdain e colaboradores (2020), no qual dois pacientes apresentavam defeito do eixo radial e variantes em *PUF60*, ambas coortes cujo critério de inclusão principal foi

a DCM, reforçam a presença de anomalias do eixo pré-axial nesta síndrome e ampliam o espectro de fenótipos sindrômicos associados a defeitos do eixo pré-axial (Jourdain et al., 2020).

As variantes descritas em *PUF60* incluem, principalmente, aquelas de perda de função, como *frameshift* e de sítio de *splicing*, compatível com o mecanismo de haploinsuficiência. Já as variantes *missense* reportadas localizam-se nos domínios de reconhecimento do RNA (Low et al., 2017). A variante encontrada em F18 no presente estudo é do tipo *missense*: p.(Tyr115Cys), mas encontra-se fora de um desses domínios, tendo sido classificada como VUS. O fato de não haver DNA dos pais para avaliar se a variante era *de novo* ou herdada, impediram mudanças na classificação desta variante. No entanto, o quadro clínico apresentado por F18 é compatível com este novo fenótipo ainda em delineamento.

5.4.3. Síndrome Coats plus

A síndrome de Coats plus, também denominada de microangiopatia cerebroretiniana com calcificações e cistos (CRMCC), é uma síndrome de herança autossômica recessiva causada por variantes bialélicas no gene *CTC1*. Este gene codifica uma proteína que desempenha um papel importante na integridade dos telômeros. Os sinais cardinais abrangem anomalias retinianas, como exsudatos e telangiectasias; anomalias no sistema nervoso central, como um padrão característico de calcificações intracranianas, leucoencefalopatia e cistos; anomalias ósseas, como osteopenia, com risco de fraturas ósseas; anomalias gastrintestinais, como ectasias de vasos, que podem levar a sangramentos e hipertensão portal. Alguns indivíduos podem ainda apresentar déficit de crescimento de origem pré-natal, anomalias ectodérmicas, com cabelos esparsos e aparecimento de cabelos brancos precoces, unhas distróficas e sinais clínicos compatíveis com o diagnóstico de disqueratose congênita (Anderson et al., 2012; Walne et al., 2013).

Embora a identificação do gene *CTC1* como responsável pela síndrome Coats plus tenha sido feita a partir de uma coorte de indivíduos com sinais neurológicos (Anderson et al., 2012), outros estudos mostraram que variantes

bialélicas estavam presentes em indivíduos com disqueratose congênita, sendo que nem todos apresentavam anomalias retinianas ou em sistema nervoso central (Walne et al., 2013), demonstrando que esta síndrome apresenta um espectro fenotípico amplo.

Em algumas ocasiões, os achados em sistema nervoso central só são identificados após a realização do estudo molecular, uma vez que esses achados nem sempre levam a sinais e/ou sintomas. Keller e colaboradores (2012) descreveram uma paciente avaliada por um quadro clínico compatível com disqueratose congênita, cujo estudo molecular revelou a presença de variantes bialélicas em *CTC1*. Apenas após o encontro destas variantes, foi realizada uma tomografia de crânio que evidenciou uma calcificação grande no tálamo (Keller et al., 2012). De forma semelhante, no presente estudo os sinais que levaram ao estudo molecular nestes irmãos, o déficit de crescimento pré e pós-natal associado com defeito do eixo radial, não são sinais cardinais da síndrome de Coats plus, sendo que as calcificações em sistema nervoso central foram investigadas e observadas posteriormente no irmão mais velho (F13.2).

Quanto aos achados ósseos na síndrome Coats plus, o mais característico é a diminuição da densidade óssea, com tendência a fraturas de difícil consolidação (Anderson et al., 2012; Polvi et al., 2012). Anomalias do eixo radial foram reportadas em duas ocasiões em indivíduos com uma ou duas variantes em *CTC1*: em uma mulher adulta com agenesia dos polegares e luxação da cabeça do rádio (Anderson et al., 2012; Briggs et al., 2011) e em um lactente de 8 meses com hipoplasia de polegar (Mansukhani et al., 2017). No presente estudo, na família F13, o probando (F13.1) tem um acometimento pré e pós-axial, como desvio radial bilateral e hipoplasia severa bilateral. Em seu irmão (F13.2), o acometimento esquelético é mais discreto, apenas do eixo pré-axial.

As variantes em *CTC1* responsáveis pela síndrome de Coats plus foram reportadas pela primeira vez por Anderson et al. (2012), o qual descreveu a presença de uma heterozigose composta, com uma variante *missense* em um alelo e uma variante de perda de função no outro alelo, na maioria dos casos (9/10). Na família restante, duas variantes *missense* foram encontradas. O fato de nenhum indivíduo apresentar duas variantes de perda de função sugere que esta combinação de variantes exerça um efeito deletério no desenvolvimento

embrionário, incompatível com a vida. No presente estudo, as variantes encontradas, uma *missense* p.(Val871Met) e outra de *splicing* (c.1946-1G>C) também estavam em heterozigose composta nos irmãos. É interessante notar que a mesma variante *missense* encontrada nos irmãos, p.(Val871Met), foi identificada na paciente com anomalia do eixo radial reportada na literatura (Anderson et al., 2012; Briggs et al., 2011).

Até o momento, dentre os achados esqueléticos, as anomalias congênitas do eixo radial parecem ser achados pouco comuns na síndrome coats plus. Casuísticas maiores, avaliadas a partir de anomalias ósseas, podem definir melhor se realmente são achados raros ou se são sinais pouco explorados em decorrência da presença de sinais e sintomas de maior gravidade, como as anomalias oculares, neurológicas e hematológicas. Neste cenário, a síndrome de coats plus pode ser semelhante à síndrome da pancitopenia de Fanconi, uma doença monogênica de instabilidade genômica, que além do comprometimento da medula óssea, como na disqueratose congênita, e risco aumentado para o desenvolvimento de câncer, também pode apresentar anomalias congênitas, incluindo anomalias do eixo pré-axial (Fiesco-Roa et al., 2019).

5.5. Formas não-sindrômicas associadas às DCMs

5.5.1. Síndrome SHFLD

As malformações de mãos e pés fendidos (SHFMs) abrangem um grupo heterogêneo de malformações, as quais podem ser isoladas ou estarem associadas a outras anomalias. Entre as formas sindrômicas, variantes em heterozigose no gene *TP63* são as mais conhecidas, particularmente levando aos achados de ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura labiopalatal (síndrome EEC). Neste grupo de anomalia de membros, anomalias cromossômicas são mais prevalentes, particularmente envolvendo as regiões cromossômicas 7q21 e 10q24. Uma das formas de SHFM está associada com a deficiência de ossos longos, particularmente a agenesia da tíbia (SHFLD). Esta síndrome apresenta um padrão de herança autossômica dominante, com expressividade variável e penetrância incompleta. No estudo de três famílias

com SHFLD, Armour e colaboradores (2011) encontraram microduplicações de tamanhos diferentes que envolviam a região cromossômica 17p13.3, empregando a técnica do *SNP-array*. A região crítica era de 173 kb englobando os éxons um a três de *ABR* e todo gene *BHLHA9*, este último de função pouco conhecida (Armour et al., 2011). Este intervalo crítico foi reduzido em um novo estudo, envolvendo apenas a duplicação do gene *BHLHA9*, demonstrando que a alteração unicamente deste gene era a responsável por SHFLD (Klopocki et al., 2012). Estudos posteriores em modelos animais mostraram que camundongos *knockout* de *BHLHA9* apresentavam malformações de membros, como sindactilia, sendo que este gene desempenhava um papel na formação dos membros, na formação de AER, através do gene *TP63* (Kataoka et al., 2018). Nos estudos de Armour e colaboradores (2011) e Klopocki e colaboradores (2012), alguns indivíduos nas famílias estudadas, sem nenhuma anomalia de membros, apresentavam a microduplicação do gene *BHLHA9*, demonstrando um alto grau de penetrância incompleta, entre 30% e 50%. No presente estudo, a família F35 apresenta um quadro clínico-radiológico compatível com SHFLD, estando classificada no grupo das formas não-sindrômicas. O *array* genômico também evidenciou uma microduplicação de 62 kb na posição 17p13.3 englobando o gene *BHLHA9*. Dos indivíduos avaliados nesta família e com a duplicação em 17p13,3, apenas 50% (3/6) expressavam o fenótipo, semelhante aos dados da literatura.

Na avaliação de fatores genéticos etiológicos responsáveis por um grupo de 68 indivíduos com SHFM, 11 deles com SHFLD e dois com o complexo de Gollop-Wofgang, no qual o fêmur distal é bífido, Nagata e colaboradores (2014) realizaram o sequenciamento dos genes *DLX5*, *TP63* e *WNT10B* e um *array*-CGH para análise de CNVs (Nagata et al., 2014). Duplicações e mesmo triplicações na região cromossômica 17p13.3 foram encontradas em 27/51 probandos (53%), não apenas em indivíduos com SHFLD, mas também em indivíduos com SHFM e com o complexo de Gollop-Wolfgang, demonstrando que esta CNV é o fator genético mais prevalente neste grupo de DCM, pelo menos no Japão, local de realização do estudo. Os autores apontaram para o fato de que, embora este aumento de cópias de *BHLHA9* seja mais prevalente nos indivíduos com anomalia de membros, ele também está presente em indivíduos sem fenótipo nas famílias e em populações controles, demonstrando

que esta CNV deve ser considerada um fator genético de susceptibilidade e não um fator determinante.

Em uma paciente da coorte com SHFM (F34), os estudos realizados através de *array*, painel e exoma, não demonstraram nenhuma variante patogênica associada a SHFM, mostrando que possivelmente deve haver outro fator genético ou ambiental relacionado a SHFM não identificado até o presente momento.

5.5.2. Formas não-sindrômicas sem etiologia genética conhecida

No presente estudo foram avaliados dez probandos com formas não-sindrômicas de DCM, cujo acometimento dos ossos longos era variável, mas em geral, envolvendo múltiplos ossos longos (Tabela 4). Entre eles, apenas um apresentava variantes bialélicas em *WNT7A*, compatível com a FS. Nos restantes, os diagnósticos clínico-radiológicos englobavam fenótipos sem etiologia genética conhecida, como a síndrome FFU e FATCO. As técnicas empregadas no presente estudo, incluindo exoma do trio, avaliando genes de vias de sinalização importantes para a formação de membros, além de fatores relacionados a trombofilias, e *array* genômico, não permitiram identificar variantes raras ou CNVs que pudessem contribuir para a etiopatogenia destes fenótipos.

Na literatura, esses fenótipos geralmente são casos esporádicos, sendo raros os relatos de recorrência nas famílias. Zlotogora e colaboradores (1983) descreveram dois irmãos com um quadro clínico compatível com o diagnóstico da síndrome FFU. A primeira criança apresentava defeitos de membros do lado esquerdo do corpo envolvendo os membros superiores e inferiores. Já a segunda gestação não foi completada decorrente de um aborto na 14ª semana de gravidez, na qual o feto apresentava malformações graves nos quatro membros, como membros muito curtos ou ausentes (Zlotogora et al., 1983). Em um estudo com uma grande casuística, com 491 indivíduos com DCM, Lenz e colaboradores (1993) observaram uma única recorrência em irmãos (Lenz et al., 1993).

Embora o NGS tenha permitido um grande e rápido progresso na identificação das bases moleculares de diversos fenótipos mendelianos na última década, esta técnica foi empregada visando a identificação de variantes, particularmente, nas regiões codificadoras dos genes, reconhecidas como os locais nos quais a grande maioria das variantes raras e associadas aos fenótipos estão presentes (Sikkema-Raddatz et al., 2013). Entretanto, mecanismos mais complexos, decorrentes de alterações estruturais, como inversões, deleções, duplicações, em regiões não-codificantes, alterando as unidades regulatórias da arquitetura genômica (TADs), estão sendo reportados em fenótipos associados a DCM. Para a avaliação destes achados, técnicas mais refinadas, incluindo sequenciamento do genoma e outras que permitem as avaliações da conformação em 3D do genoma e suas interações regulatórias, tem sido empregadas. Em um estudo realizado por Lupiáñez e colaboradores (2016), fenótipos com anomalias de membros, como a síndrome F e uma braquidactilia, foram associados a pequenos rearranjos que alteravam as TADs, levando a interações ectópicas entre *enhancers* e genes da região (Lupiáñez et al., 2016).

Este ano, Allou e colaboradores descreveram três pacientes apresentando um fenótipo raro, complexo, com um grave acometimento mesomélico dos membros inferiores (encurtamento acentuado da tíbia e fíbula com aspecto triangular), anomalia ou ausência dos ossos dos pés, sindactilia entre o 3º e 4º dedos das mãos e presença de unhas na parte palmar das mãos nos dedos 4 e 5 (unhas ventrais), cuja análise prévia pelo sequenciamento do exoma não revelou a presença de variantes raras que pudessem explicar o fenótipo dos indivíduos. No entanto, a análise por autozigosidade revelou uma área de 10 Mb de homozigose em 2q, compartilhada entre os pacientes. Estudos adicionais com *array* genômico e sequenciamento gênico mostraram haver deleções em homozigose que variavam em tamanho de 27 a 63 kb, localizadas 300 kb à montante do gene *EN1*, em 2q14.2. A região mínima deletada (MDR) entre os indivíduos era de 27 kb, na posição genômica chr2:118561492–118589320. O gene *EN1* está associado ao estabelecimento do padrão dorsal-ventral do membro. Um quarto indivíduo, com um fenótipo esquelético semelhante, mas com agenesia do cerebelo foi avaliado e apresentava uma variante de perda de função em homozigose em *EN1*: p.(Ile107HisfsTer39). Estudos adicionais, incluindo interações e

imunoprecipitação da cromatina, em camundongos gerados com deleção em homozigose da região homóloga mostraram que a MDR estava localizada dentro de uma TAD, mas não havia uma interação direta entre a MDR e a região promotora do gene *EN1*. No entanto, alteração em um *long non-coding RNA* (lncRNA) na região, denominado pelos autores *Maenli*, mostraram que ele atuava na ativação em cis de *EN1*, demonstrando seu papel na polaridade dorso-ventral no desenvolvimento de membros. A deleção envolvendo *Maenli*, portanto, causa o fenótipo esquelético nestes indivíduos. Já variantes intragênicas em *EN1* causam, além do fenótipo esquelético, também o fenótipo neurológico. Este estudo amplia os mecanismos que podem ser responsáveis por fenótipos mendelianos, mostrando que a ação direta de lncRNA em um determinado gene e não apenas alterações no gene em si ou em suas regiões regulatórias, pode causar uma doença genética monogênica (Allou et al., 2021).

Desta forma, é possível que nos próximos anos, novos experimentos, com ferramentas mais amplas, direcionadas para regiões regulatórias, consigam identificar fatores genéticos associados a estes fenótipos raros, na grande maioria dos casos, únicos nas famílias, contribuindo para a sua elucidação etiológica.

6. Conclusão

Os fenótipos observados na casuística apresentavam uma grande variabilidade no envolvimento ósseo, desde uma hipoplasia do polegar até ausência dos quatro membros (tetra-amelia). A grande heterogeneidade genética entre as síndromes das DCM, bem como a possibilidade de expressividade variável e penetrância incompleta, presentes em algumas síndromes, sinaliza a dificuldade de diagnóstico.

Variantes de ponto raras e CNVs foram encontradas em 45,7% dos probandos com DCM. Esta detecção foi maior (60,8%) no grupo de indivíduos associados a outros achados clínicos (formas sindrômicas), quando comparada com o grupo apenas com anomalias dos membros (16,7%), o que está de acordo com dados da literatura.

No grupo de oito indivíduos com diagnósticos de síndromes sem etiologia genética conhecida, como a síndrome FFU e FATCO, mesmo a realização de análises amplas, envolvendo o sequenciamento do exoma do trio e análise de CNVs, não permitiu identificar uma causa genética. Estudos futuros, direcionados a regiões regulatórias, podem auxiliar na procura de fatores genéticos associados a estes fenótipos, geralmente casos isolados nas famílias.

Variantes novas, não reportadas previamente na literatura foram encontradas nos genes *NSDHL*, *CTC1*, *PUF60*, *TBX5* e *WNT7A* ampliando o espectro de variantes associadas a estes genes.

Na síndrome TAR, dois dos três probandos (66,6%) analisados apresentavam um polimorfismo recentemente descrito na literatura em indivíduos com descendência africana. O presente estudo enfatiza as diferenças nas frequências alélicas de variantes comuns, neste caso, e a necessidade de estudos em populações menos representadas globalmente e com grande miscigenação, como a brasileira.

Na síndrome de Holt-Oram, uma das famílias apresentava uma duplicação intragênica, raramente descrita na literatura. A dificuldade técnica na análise destas alterações pode explicar a pouca representatividade deste grupo de variantes, enfatizando a necessidade de uma maior atenção a duplicações e deleções na investigação molecular da síndrome de Holt-Oram.

O estudo molecular amplo empregado, o sequenciamento do exoma, permitiu estabelecer um diagnóstico preciso em três probandos, dois deles sem uma hipótese clínica prévia, o que demonstra a efetividade de testes genéticos robustos, como o NGS. Os diagnósticos envolviam síndromes descritas recentemente, cujo espectro fenotípico ainda está em delineamento (síndrome coats plus, acrodisostose tipo Cincinnati e síndrome de Verheij).

Na síndrome coats plus e Verheij, os indivíduos apresentavam defeito do eixo pré-axial, característica não considerada cardinal nessas síndromes. A descrição destes indivíduos, incluídos neste estudo a partir da DCM, ampliam o espectro fenotípico sugerindo que possa ser um achado mais comum, a depender das coortes avaliadas.

Em duas famílias estudadas, as variantes encontradas nos probandos estavam presentes em outros familiares sem achados clínicos. Uma das famílias apresentava a síndrome SHFLD, reconhecida por apresentar penetrância incompleta, mas a outra síndrome foi diagnosticada com a disostose acrofacial tipo Cincinnati, uma condição ainda pouco estudada, com implicações para o aconselhamento genético da família.

O presente estudo ilustra a complexidade da análise genética em indivíduos com DCM, seja pela diversidade de fenótipos associados a esta anomalia congênita, particularmente entre as formas sindrômicas, seja pela ausência de um fator genético conhecido associado a alguns destes fenótipos até o momento.

7. Anexos

Anexo I: Lista de 485 genes do painel NGS 'P1'

Anexo II: Lista de 496 genes do painel NGS 'P2'

Anexo III: Lista de 281 genes das vias de sinalização Shh, Notch e Wnt, retirados do banco de dados KeggPathway

Anexo I: Lista de 485 genes do painel NGS ‘P1’

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
AARS	601065	BCKDHB	248611	COL2A1	120140	DUOX2	606759	FKRP	606596	HADHB	143450
ABCD1	300371	BIN1	601248	COL3A1	120180	DYM	607461	FKTN	607440	HBB	141900
ACADM	607008	BMP4	112262	COL5A1	120215	DYNC2H1	603297	FLNA	300017	HERC2	605837
ACADVL	609575	BMPR1A	601299	COL5A2	120190	DYRK1A	600855	FLNB	603381	HES7	608059
ACAT1	607809	BRAF	164757	COL6A1	120220	DYSF	603009	FLNC	102565	HLCS	609018
ACP5	171640	BRCA1	113705	COL6A2	120240	EDN1	131240	FMR1	309550	HMGCL	613898
ACTA1	102610	BRCA2	600185	COL6A3	120250	EFNB1	300035	FOLR1	136430	HNRNPDL	607137
ACTB	102630	BRIP1	605882	COL9A1	120210	EGR2	129010	FOXE1	602617	HRAS	190020
ACTG1	102560	BTD	609019	COL9A2	120260	EIF2AK3	604032	FOXG1	164874	HSPB1	602195
ADA	608958	CACNA1S	114208	COL9A3	120270	EIF4A3	608546	FOXP2	605317	HSPB8	608014
ADAMTS18	607512	CANT1	613165	COMP	600310	ELN	130160	FTCD	606806	IDUA	252800
ADAMTS2	612277	CAPN3	114240	COQ2	609825	EMD	300384	FUS	137070	IFT80	611177
ADCK3	.	CAV3	601253	COQ9	612837	EPCAM	185535	FXN	606829	IL11RA	600939
AFG3L2	604581	CBS	613381	CP	117700	EPHA3	179611	GADD45G	604949	IL2RG	308380
ALDH3A2	609523	CD3D	186790	CPS1	608307	ERF	611888	GALNS	612222	IL7R	146661
ALDH7A1	107323	CD3E	186830	CREBBP	600140	ERG	165080	GALNT1	602273	IRF6	607199
ALPL	171760	CDH1	192090	CRISPLD2	612434	ETHE1	608451	GALNT12	610290	ITGA7	600536
ALX1	601527	CDH2	114020	CRTAP	605497	EVC	604831	GALT	606999	IVD	607036
ALX3	606014	CDH23	605516	CRYAA	123580	EVC2	607261	GAMT	601240	JAG1	601920
ALX4	605420	CDH7	605806	CRYAB	123590	EXT1	608177	GARS	600287	JAK3	600173
AMN	605799	CDH8	603008	CTDP1	604927	FAF1	604460	GATM	602360	JAM2	606870
ANOS	608662	CDK4	123829	CTNNB1	116806	FAH	613871	GCDH	608801	KATNAL2	614697
APC	611731	CDKL5	300203	CTSK	601105	FANCA	607139	GCH1	600225	KBTBD13	613727
APTX	606350	CDKN2A	600160	CUBN	602997	FANCC	613899	GDAP1	606598	KCNE1	176261
ARG1	608313	CFL1	601442	CUL7	609577	FANCD2	613984	GDF5	601146	KIF22	603213
ARHGAP29	610496	CFTR	602421	CYP21A2	613815	FANCE	613976	GDF6	601147	KIF5A	602821
ARX	300382	CHEK2	604373	CYP27A1	606530	FANCF	613897	GIF	609342	KRAS	190070
ASL	608310	CHST14	608429	CYP7B1	603711	FANCG	602956	GJA1	121014	L1CAM	308840
ASPA	608034	CHST3	603799	DAG1	128239	FBLN5	604580	GJB1	304040	LAMA2	156225
ASS1	603470	CLCN1	118425	DBT	248610	FBN1	134797	GJB2	121011	LAMP2	309060
ATL1	606439	CLDN14	605608	DCLRE1C	605988	FECH	612386	GJB3	603324	LARGE1	603590
ATM	607585	CLPTM1L	612585	DDR2	191311	FGD4	611104	GJB6	604418	LEMD3	607844
ATP7A	300011	CLRN1	606397	DES	125660	FGF8	600483	GLB1	611458	LFNG	602576
ATP7B	606882	CNTNAP2	604569	DHCR24	606418	FGFR1	136350	GLI2	165230	LIFR	151443
ATR	601215	COL10A1	120110	DHCR7	602858	FGFR2	176943	GLI3	165240	LIP1	609252
AXIN2	604025	COL11A1	120280	DLAT	608770	FGFR3	134934	GNAI3	139370	LITAF	603795
B4GALT6	604017	COL11A2	120290	DLL3	602768	FHL1	300163	GNAS	139320	LMAN1	601567
BAP1	603089	COL18A1	120328	DMD	300377	FIG4	609390	GRHL3	608317	LMBRD1	612625
BARD1	601593	COL1A1	120150	DNAJB6	611332	FKBP10	607063	GRIK1	138245	LMNA	150330
BCKDHA	608348	COL1A2	120160	DNM2	602378	FKBP14	614505	HADHA	600890	LRP5	603506

Anexo I: Lista de 485 genes do painel NGS ‘P1’, continuação

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
<i>LRSAM1</i>	610933	<i>MTMR2</i>	603557	<i>PAX8</i>	167415	<i>QDPR</i>	612676	<i>SHANK3</i>	606230	<i>TGFBR1</i>	190181
<i>LZTR1</i>	600574	<i>MTR</i>	156570	<i>PCBD1</i>	126090	<i>RAB23</i>	606144	<i>SHH</i>	600725	<i>TGFBR2</i>	190182
<i>MAP2K1</i>	176872	<i>MTRR</i>	602568	<i>PCCA</i>	232000	<i>RAB7A</i>	602298	<i>SHOC2</i>	602775	<i>TGIF1</i>	602630
<i>MATN3</i>	602109	<i>MUT</i>	609058	<i>PCCB</i>	232050	<i>RABEP2</i>	611869	<i>SHOX</i>	312865	<i>TH</i>	191290
<i>MBD2</i>	603547	<i>MUTYH</i>	604933	<i>PCDH15</i>	605514	<i>RAD50</i>	604040	<i>SIX3</i>	603714	<i>TMC1</i>	606706
<i>MBD5</i>	611472	<i>MYC</i>	190080	<i>PDGFRA</i>	173490	<i>RAD51</i>	179617	<i>SLC17A6</i>	607563	<i>TMIE</i>	607237
<i>MC2R</i>	607397	<i>MYO6</i>	600970	<i>PDHA1</i>	300502	<i>RAD51C</i>	602774	<i>SLC19A3</i>	606152	<i>TMPRSS15</i>	606635
<i>MCCC1</i>	609010	<i>MYO7A</i>	276903	<i>PDHX</i>	608769	<i>RAD51D</i>	602954	<i>SLC22A5</i>	603377	<i>TMPRSS3</i>	605511
<i>MCCC2</i>	609014	<i>MYOT</i>	604103	<i>PDSS1</i>	607429	<i>RAF1</i>	164760	<i>SLC25A13</i>	603859	<i>TNFRSF11A</i>	603499
<i>MECP2</i>	300005	<i>NAGS</i>	608300	<i>PDSS2</i>	610564	<i>RAG1</i>	179615	<i>SLC25A15</i>	603861	<i>TP53</i>	191170
<i>MED25</i>	610197	<i>NBN</i>	602667	<i>PFKL</i>	171860	<i>RAG2</i>	179616	<i>SLC26A2</i>	606718	<i>TP63</i>	603273
<i>MEGF10</i>	612453	<i>NDN</i>	602117	<i>PHF8</i>	300560	<i>RAI1</i>	607642	<i>SLC26A4</i>	605646	<i>TPM2</i>	190990
<i>MEN1</i>	613733	<i>NDRG1</i>	605262	<i>PHGDH</i>	606879	<i>RARA</i>	180240	<i>SLC2A1</i>	138140	<i>TPM3</i>	191030
<i>MESP2</i>	605195	<i>NDUFV2</i>	600532	<i>PLCB4</i>	600810	<i>RBBP8</i>	604124	<i>SLC5A5</i>	601843	<i>TPO</i>	606765
<i>MFN2</i>	608507	<i>NECTIN1</i>	600644	<i>PLEC</i>	601282	<i>RECQL4</i>	603780	<i>SMAD4</i>	600993	<i>TRAPPC2</i>	300202
<i>MID1</i>	300552	<i>NEFL</i>	162280	<i>PLOD1</i>	153454	<i>REEP1</i>	609139	<i>SMARCA1</i>	606622	<i>TRIM32</i>	602290
<i>MIR1206</i>	.	<i>NF1</i>	613113	<i>PMP22</i>	601097	<i>RET</i>	164761	<i>SNAP29</i>	604202	<i>TRIP11</i>	604505
<i>MIR1207</i>	.	<i>NIPA1</i>	608145	<i>PMS2</i>	600259	<i>RGMA</i>	607362	<i>SNRPN</i>	182279	<i>TRPC6</i>	603652
<i>MIR1208</i>	.	<i>NIPBL</i>	608667	<i>POGZ</i>	614787	<i>RIT1</i>	609591	<i>SOD1</i>	147450	<i>TRPS1</i>	604386
<i>MIR140</i>	611894	<i>NKX3-2</i>	602183	<i>POLR1C</i>	610060	<i>RMRP</i>	157660	<i>SOS1</i>	182530	<i>TRPV4</i>	605427
<i>MIR200B</i>	612091	<i>NOG</i>	602991	<i>POLR1D</i>	613715	<i>ROR2</i>	602337	<i>SOS2</i>	601247	<i>TSC1</i>	605284
<i>MLH1</i>	120436	<i>NOL8</i>	611534	<i>POMGNT1</i>	606822	<i>RPS27L</i>	612055	<i>SOST</i>	605740	<i>TSC2</i>	191092
<i>MMAA</i>	607481	<i>NOTCH3</i>	600276	<i>POMT1</i>	607423	<i>RTTN</i>	610436	<i>SOX9</i>	608160	<i>TSHB</i>	188540
<i>MMAB</i>	607568	<i>NPC1</i>	607623	<i>POMT2</i>	607439	<i>RUNX1</i>	151385	<i>SP7</i>	606633	<i>TSHR</i>	603372
<i>MMACHC</i>	609831	<i>NPC2</i>	601015	<i>POR</i>	124015	<i>RUNX2</i>	600211	<i>SPAST</i>	604277	<i>TSHZ1</i>	614427
<i>MMADHC</i>	611935	<i>NPR2</i>	108961	<i>POTED</i>	607549	<i>RYR1</i>	180901	<i>SPG11</i>	610844	<i>TSPEAR</i>	612920
<i>MMP13</i>	600108	<i>NRAS</i>	164790	<i>PPIB</i>	123841	<i>SALL1</i>	602218	<i>SPG7</i>	602783	<i>TWIST1</i>	601622
<i>MMP9</i>	120361	<i>NSD1</i>	606681	<i>PQBP1</i>	300463	<i>SATB2</i>	608148	<i>SPR</i>	182125	<i>UBE3A</i>	601623
<i>MOCs1</i>	603707	<i>NT5C3A</i>	606224	<i>PRKAR1A</i>	188830	<i>SBDs</i>	607444	<i>SRY</i>	480000	<i>USH1C</i>	605242
<i>MOCs2</i>	603708	<i>NTNG1</i>	608818	<i>PRPS1</i>	311850	<i>SBF2</i>	607697	<i>STK11</i>	602216	<i>USH1G</i>	607696
<i>MPZ</i>	159440	<i>OFD1</i>	300170	<i>PRSS1</i>	276000	<i>SCN4A</i>	603967	<i>SUMO1</i>	601912	<i>USH2A</i>	608400
<i>MRAP</i>	609196	<i>OGN</i>	602383	<i>PRX</i>	605725	<i>SCO2</i>	604272	<i>TARDBP</i>	605078	<i>USHBP1</i>	611810
<i>MRE11</i>	600814	<i>OTC</i>	300461	<i>PSAT1</i>	610936	<i>SELENON</i>	606210	<i>TBX1</i>	602054	<i>USP25</i>	.
<i>MSH2</i>	609309	<i>OTOF</i>	603681	<i>PSPH</i>	172480	<i>SERPINH1</i>	600943	<i>TBX22</i>	300307	<i>VAPB</i>	605704
<i>MSH3</i>	600887	<i>OXCT1</i>	601424	<i>PTCH1</i>	601309	<i>SETBP1</i>	611060	<i>TCAP</i>	604488	<i>VHL</i>	608537
<i>MSH6</i>	600678	<i>P3H1</i>	610339	<i>PTEN</i>	601728	<i>SETX</i>	608465	<i>TCF12</i>	600480	<i>WHRN</i>	607928
<i>MSTN</i>	601788	<i>PABPN1</i>	602279	<i>PTH1R</i>	168468	<i>SGCA</i>	600119	<i>TCF4</i>	602272	<i>WNT3</i>	165330
<i>MSX1</i>	142983	<i>PAFAH1B1</i>	601545	<i>PTPN11</i>	176876	<i>SGCB</i>	600900	<i>TCOF1</i>	606847	<i>XRCC3</i>	600675
<i>MSX2</i>	123101	<i>PAH</i>	612349	<i>PTS</i>	612719	<i>SGCD</i>	601411	<i>TERT</i>	187270	<i>ZAP70</i>	176947
<i>MTHFR</i>	607093	<i>PALB2</i>	610355	<i>PVT1</i>	165140	<i>SGCG</i>	608896	<i>TFAP2A</i>	107580	<i>ZIC2</i>	603073
<i>MTM1</i>	300415	<i>PAPSS2</i>	603005	<i>PYGM</i>	608455	<i>SH3BP2</i>	602104	<i>TG</i>	188450		

Anexo II: Lista de 496 genes do painel NGS 'P2'

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
AARS	601065	BIN1	601248	COL1A2	120160	DNM2	602378	FKRP	606596	HBB	141900
ABCD1	300371	BMP1	112264	COL2A1	120140	DUOX2	606759	FKTN	607440	HES7	608059
ACADM	607008	BMP4	112262	COL3A1	120180	DYM	607461	FLNA	300017	HLCS	609018
ACADVL	609575	BMPR1A	601299	COL5A1	120215	DYNC2H1	603297	FLNB	603381	HMGCL	613898
ACAT1	607809	BRAF	164757	COL5A2	120190	DYRK1A	600855	FLNC	102565	HNRNPDL	607137
ACP5	171640	BRCA1	113705	COL6A1	120220	DYSF	603009	FMR1	309550	HRAS	190020
ACTA1	102610	BRCA2	600185	COL6A2	120240	EDN1	131240	FOLR1	136430	HSPB1	602195
ACTB	102630	BRIP1	605882	COL6A3	120250	EFNB1	300035	FOXE1	602617	HSPB8	608014
ACTG1	102560	BTBD	609019	COL9A1	120210	EGR2	129010	FOXG1	164874	IDUA	252800
ADA	608958	CACNA1S	114208	COL9A2	120260	EIF2AK3	604032	FOXP2	605317	IFITM5	614757
ADAMTS18	607512	CANT1	613165	COL9A3	120270	EIF4A3	608546	FTCD	606806	IFT80	611177
ADAMTS2	612277	CAPN3	114240	COMP	600310	ELN	130160	FUS	137070	IL11RA	600939
ADCK3	.	CAV3	601253	COQ2	609825	EMD	300384	FXN	606829	IL2RG	308380
AFG3L2	604581	CBL	165360	COQ9	612837	EPCAM	185535	GADD45G	604949	IL7R	146661
ALDH3A2	609523	CBS	613381	CP	117700	EPHA3	179611	GALNS	612222	IRF6	607199
ALDH7A1	107323	CD3D	186790	CPS1	608307	ERF	611888	GALNT1	602273	ITGA7	600536
ALPL	171760	CD3E	186830	CREB3L1	616215	ERG	165080	GALNT12	610290	IVD	607036
ALX1	601527	CDC45	603465	CREBBP	600140	ETHE1	608451	GALT	606999	JAG1	601920
ALX3	606014	CDH1	192090	CRISPLD2	612434	EVC	604831	GAMT	601240	JAK3	600173
ALX4	605420	CDH2	114020	CRTAP	605497	EVC2	607261	GARS	600287	JAM2	606870
AMN	605799	CDH23	605516	CRYAA	123580	EXT1	608177	GATM	602360	JMJD1C	604503
ANOS	608662	CDH7	605806	CRYAB	123590	FAF1	604460	GCDH	608801	KBTBD13	613727
APC	611731	CDH8	603008	CTDP1	604927	FAH	613871	GCH1	600225	KCNE1	176261
APT	606350	CDK4	123829	CTNNB1	116806	FANCA	607139	GDAP1	606598	KIF22	603213
ARG1	608313	CDKL5	300203	CTSK	601105	FANCC	613899	GDF5	601146	KIF5A	602821
ARHGAP29	610496	CDKN2A	600160	CUBN	602997	FANCD2	613984	GDF6	601147	KRAS	190070
ARX	300382	CFL1	601442	CUL7	609577	FANCE	613976	GIF	609342	L1CAM	308840
ASL	608310	CFTR	602421	CYP21A2	613815	FANCF	613897	GJA1	121014	LAMA2	156225
ASPA	608034	CHD8	610528	CYP27A1	606530	FANCG	602956	GJB1	304040	LAMP2	309060
ASS1	603470	CHEK2	604373	CYP7B1	603711	FBLN5	604580	GJB2	121011	LARGE1	603590
ATL1	606439	CHST14	608429	DAG1	128239	FBN1	134797	GJB3	603324	LEMD3	607844
ATM	607585	CHST3	603799	DBT	248610	FECH	612386	GJB6	604418	LFNG	602576
ATP7A	300011	CLCN1	118425	DCLRE1C	605988	FGD4	611104	GLB1	611458	LIFR	151443
ATP7B	606882	CLDN14	605608	DDR2	191311	FGF8	600483	GLI2	165230	LIPI	609252
ATR	601215	CLPTM1L	612585	DES	125660	FGFR1	136350	GLI3	165240	LITAF	603795
AXIN2	604025	CLRN1	606397	DHCR24	606418	FGFR2	176943	GNAI3	139370	LMAN1	601567
B4GALT6	604017	COL10A1	120110	DHCR7	602858	FGFR3	134934	GNAS	139320	LMBRD1	612625
BAP1	603089	COL11A1	120280	DLAT	608770	FHL1	300163	GRHL3	608317	LMNA	150330
BARD1	601593	COL11A2	120290	DLL3	602768	FIG4	609390	GRIK1	138245	LRP5	603506
BCKDHA	608348	COL18A1	120328	DMD	300377	FKBP10	607063	HADHA	600890	LRSAM1	610933
BCKDHB	248611	COL1A1	120150	DNAJB6	611332	FKBP14	614505	HADHB	143450	LZTR1	600574

Anexo II: Lista de 496 genes do painel NGS 'P2', continuação

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
<i>MAP2K1</i>	176872	<i>MTRR</i>	602568	<i>PCCA</i>	232000	<i>RABEP2</i>	611869	<i>SIX3</i>	603714		
<i>MAP2K2</i>	601263	<i>MUT</i>	609058	<i>PCCB</i>	232050	<i>RAD50</i>	604040	<i>SLC19A3</i>	606152	<i>TH</i>	191290
<i>MATN3</i>	602109	<i>MUTYH</i>	604933	<i>PCDH15</i>	605514	<i>RAD51</i>	179617	<i>SLC22A5</i>	603377	<i>TMC1</i>	606706
<i>MBD2</i>	603547	<i>MYC</i>	190080	<i>PDGFRA</i>	173490	<i>RAD51C</i>	602774	<i>SLC25A13</i>	603859	<i>TMEM38B</i>	611236
<i>MBD5</i>	611472	<i>MYO6</i>	600970	<i>PDHA1</i>	300502	<i>RAD51D</i>	602954	<i>SLC25A15</i>	603861	<i>TMIE</i>	607237
<i>MC2R</i>	607397	<i>MYO7A</i>	276903	<i>PDHX</i>	608769	<i>RAF1</i>	164760	<i>SLC26A2</i>	606718	<i>TMPRSS15</i>	606635
<i>MCCC1</i>	609010	<i>MYOT</i>	604103	<i>PDSS1</i>	607429	<i>RAG1</i>	179615	<i>SLC26A4</i>	605646	<i>TMPRSS3</i>	605511
<i>MCCC2</i>	609014	<i>NAGS</i>	608300	<i>PDSS2</i>	610564	<i>RAG2</i>	179616	<i>SLC2A1</i>	138140	<i>TNFRSF11A</i>	603499
<i>MECP2</i>	300005	<i>NBN</i>	602667	<i>PFKL</i>	171860	<i>RAI1</i>	607642	<i>SLC5A5</i>	601843	<i>TP53</i>	191170
<i>MED25</i>	610197	<i>NDN</i>	602117	<i>PHF8</i>	300560	<i>RARA</i>	180240	<i>SMAD4</i>	600993	<i>TP63</i>	603273
<i>MEGF10</i>	612453	<i>NDRG1</i>	605262	<i>PHGDH</i>	606879	<i>RBBP8</i>	604124	<i>SMARCA11</i>	606622	<i>TPM2</i>	190990
<i>MEN1</i>	613733	<i>NDUFV2</i>	600532	<i>PLCB4</i>	600810	<i>RECQL4</i>	603780	<i>SNAP29</i>	604202	<i>TPM3</i>	191030
<i>MESP2</i>	605195	<i>NECTIN1</i>	600644	<i>PLEC</i>	601282	<i>REEP1</i>	609139	<i>SNRPN</i>	182279	<i>TPO</i>	606765
<i>MFN2</i>	608507	<i>NEFL</i>	162280	<i>PLOD1</i>	153454	<i>RET</i>	164761	<i>SOD1</i>	147450	<i>TRAPPC2</i>	300202
<i>MID1</i>	300552	<i>NF1</i>	613113	<i>PLOD2</i>	601865	<i>RIT1</i>	609591	<i>SOS1</i>	182530	<i>TRIM32</i>	602290
<i>MIR1206</i>	.	<i>NF2</i>	607379	<i>PLS3</i>	300131	<i>RMRP</i>	157660	<i>SOS2</i>	601247	<i>TRIP11</i>	604505
<i>MIR1207</i>	.	<i>NIPA1</i>	608145	<i>PMP22</i>	601097	<i>ROR2</i>	602337	<i>SOST</i>	605740	<i>TRPC6</i>	603652
<i>MIR1208</i>	.	<i>NIPBL</i>	608667	<i>PMS2</i>	600259	<i>RPS27L</i>	612055	<i>SOX9</i>	608160	<i>TRPS1</i>	604386
<i>MIR140</i>	611894	<i>NKX3-2</i>	602183	<i>POLR1C</i>	610060	<i>RTTN</i>	610436	<i>SP7</i>	606633	<i>TRPV4</i>	605427
<i>MIR200B</i>	612091	<i>NOG</i>	602991	<i>POLR1D</i>	613715	<i>RUNX1</i>	151385	<i>SPARC</i>	182120	<i>TSC1</i>	605284
<i>MLH1</i>	120436	<i>NOL8</i>	611534	<i>POMGNT1</i>	606822	<i>RUNX2</i>	600211	<i>SPAST</i>	604277	<i>TSC2</i>	191092
<i>MMAA</i>	607481	<i>NOTCH3</i>	600276	<i>POMT1</i>	607423	<i>RYR1</i>	180901	<i>SPG11</i>	610844	<i>TSHB</i>	188540
<i>MMA8</i>	607568	<i>NPC1</i>	607623	<i>POMT2</i>	607439	<i>SALL1</i>	602218	<i>SPG7</i>	602783	<i>TSHR</i>	603372
<i>MMACHC</i>	609831	<i>NPC2</i>	601015	<i>POR</i>	124015	<i>SATB2</i>	608148	<i>SPR</i>	182125	<i>TSHZ1</i>	614427
<i>MMADHC</i>	611935	<i>NPR2</i>	108961	<i>PPIB</i>	123841	<i>SBD5</i>	607444	<i>SPRED1</i>	609291	<i>TSPEAR</i>	612920
<i>MMP13</i>	600108	<i>NRAS</i>	164790	<i>PQBP1</i>	300463	<i>SBF2</i>	607697	<i>SRY</i>	480000	<i>TWIST1</i>	601622
<i>MMP9</i>	120361	<i>NSD1</i>	606681	<i>PRKAR1A</i>	188830	<i>SCN4A</i>	603967	<i>STK11</i>	602216	<i>UBE3A</i>	601623
<i>MOC51</i>	603707	<i>NT5C3A</i>	606224	<i>PRPS1</i>	311850	<i>SCO2</i>	604272	<i>SUMO1</i>	601912	<i>USH1C</i>	605242
<i>MOC52</i>	603708	<i>NTNG1</i>	608818	<i>PRSS1</i>	276000	<i>SELENON</i>	606210	<i>TARDBP</i>	605078	<i>USH1G</i>	607696
<i>MPZ</i>	159440	<i>OFD1</i>	300170	<i>PRX</i>	605725	<i>SERPINF1</i>	172860	<i>TBX1</i>	602054	<i>USH2A</i>	608400
<i>MRAP</i>	609196	<i>OGN</i>	602383	<i>PSAT1</i>	610936	<i>SERPINH1</i>	600943	<i>TBX22</i>	300307	<i>USHBP1</i>	611810
<i>MRE11A</i>	.	<i>OTC</i>	300461	<i>PSPH</i>	172480	<i>SETBP1</i>	611060	<i>TBX6</i>	602427	<i>USP25</i>	.
<i>MSH2</i>	609309	<i>OTOF</i>	603681	<i>PTCH1</i>	601309	<i>SETX</i>	608465	<i>TCAP</i>	604488	<i>VAPB</i>	605704
<i>MSH3</i>	600887	<i>OXCT1</i>	601424	<i>PTEN</i>	601728	<i>SGCA</i>	600119	<i>TCF12</i>	600480	<i>VHL</i>	608537
<i>MSH6</i>	600678	<i>P3H1</i>	610339	<i>PTH1R</i>	168468	<i>SGCB</i>	600900	<i>TCF4</i>	602272	<i>WHRN</i>	607928
<i>MSTN</i>	601788	<i>PABPN1</i>	602279	<i>PTPN11</i>	176876	<i>SGCD</i>	601411	<i>TCOF1</i>	606847	<i>WNT1</i>	164820
<i>MSX1</i>	142983	<i>PAFAH1B1</i>	601545	<i>PTS</i>	612719	<i>SGCG</i>	608896	<i>TERT</i>	187270	<i>WNT3</i>	165330
<i>MSX2</i>	123101	<i>PAH</i>	612349	<i>PVT1</i>	165140	<i>SH3BP2</i>	602104	<i>TFAP2A</i>	107580	<i>XRCC3</i>	600675
<i>MTHFR</i>	607093	<i>PALB2</i>	610355	<i>PYGM</i>	608455	<i>SHANK3</i>	606230	<i>TG</i>	188450	<i>ZAP70</i>	176947
<i>MTM1</i>	300415	<i>PAPSS2</i>	603005	<i>QDPR</i>	612676	<i>SHH</i>	600725	<i>TGFBR1</i>	190181	<i>ZIC1</i>	600470
<i>MTMR2</i>	603557	<i>PAX8</i>	167415	<i>RAB23</i>	606144	<i>SHOC2</i>	602775	<i>TGFBR2</i>	190182	<i>ZIC2</i>	603073
<i>MTR</i>	156570	<i>PCBD1</i>	126090	<i>RAB7A</i>	602298	<i>SHOX</i>	312865	<i>TGIF1</i>	602630		

Anexo III: Lista de 281 genes das vias de sinalização Shh, Notch e Wnt, retirados do banco de dados KeggPathway

Shh signaling pathway

PTCH1	TPTEP2-CSNK1E	HHAT	SMURF1
PTCH2	GSK3B	HHATL	SMURF2
SMO	GLI1	SHH	GRK2
GPR161	GLI2	IHH	GRK3
PRKACA	GLI3	DHH	EVC
PRKACB	SUFU	DISP1	EVC2
PRKACG	KIF7	SCUBE2	EFCAB7
CSNK1A1L	HHIP	BOC	IQCE
CSNK1A1	CCND1	CDON	ARRB1
CSNK1G2	CCND2	GAS1	ARRB2
CSNK1G3	BCL2	LRP2	KIF3A
CSNK1G1	CUL1	MOSMO	CUL3
CSNK1D	BTRC	MEGF8	SPOP
CSNK1E	FBXW11	MGRN1	SPOPL

Notch signaling pathway

DLL3	HES1	DTX3	KAT2B	HDAC2
DLL1	HES5	DTX4	KAT2A	ATXN1L
DLL4	HEYL	ADAM17	SNW1	ATXN1
JAG1	HEY1	PSEN1	CTBP1	
JAG2	HEY2	PSEN2	CTBP2	
MFNG	PTCRA	PSENEN	TLE7	
LFNG	DVL3	NCSTN	TLE1	
RFNG	DVL2	APH1A	TLE2	
NOTCH1	DVL1	APH1B	TLE3	
NOTCH2	NUMB	MAML3	TLE4	
NOTCH3	NUMBL	MAML2	TLE6	
NOTCH4	DTX2	MAML1	NCOR2	
RBPJL	DTX3L	CREBBP	CIR1	
RBPJ	DTX1	EP300	HDAC1	

Anexo III: Lista de 281 genes das vias de sinalização Shh, Notch e Wnt, retirados do banco de dados KeggPathway, continuação

Wnt signaling pathway								
PORCN	CER1	ZNRF3	FRAT2	LEF1	NLK	TBL1XR1	RAC1	PRKCB
WNT1	NOTUM	FZD1	CSNK2A1	CTNNBIP1	MYC	BTRC	RAC2	PRKCG
WNT2	WIF1	FZD7	CSNK2A2	CBY1	JUN	FBXW11	RAC3	NFATC1
WNT2B	SERPINF1	FZD2	CSNK2A3	CHD8	FOSL1	CUL1	MAPK8	NFATC2
WNT3	SOST	FZD3	CSNK2B	SOX17	CCND1	RBX1	MAPK10	NFATC3
WNT3A	DKK1	FZD4	NKD1	CTBP1	CCND2	GPC4	MAPK9	NFATC4
WNT4	DKK2	FZD5	NKD2	CTBP2	CCND3	ROR1	PLCB1	
WNT5A	DKK4	FZD8	CXXC4	TLE7	CCN4	ROR2	PLCB2	
WNT5B	SFRP1	FZD6	SENP2	TLE1	PPARD	RYK	PLCB3	
WNT6	SFRP2	FZD10	GSK3B	TLE2	MMP7	VANGL2	PLCB4	
WNT7A	SFRP4	FZD9	CTNNB1	TLE3	PSEN1	VANGL1	CAMK2A	
WNT7B	SFRP5	LRP5	AXIN1	TLE4	PRKACA	PRICKLE1	CAMK2D	
WNT8A	RSPO1	LRP6	AXIN2	TLE6	PRKACB	PRICKLE2	CAMK2B	
WNT8B	RSPO2	BAMBI	APC	CTNND2	PRKACG	PRICKLE4	CAMK2G	
WNT9A	RSPO3	CSNK1E	APC2	CREBBP	TP53	PRICKLE3	PPP3CA	
WNT9B	RSPO4	TPTEP2-CSNK1E	CSNK1A1L	EP300	SIAH1	INVS	PPP3CB	
WNT10B	LGR4	DVL3	CSNK1A1	RUVEL1	CACYBP	DAAM1	PPP3CC	
WNT10A	LGR5	DVL2	TCF7	SMAD4	SKP1	DAAM2	PPP3R1	
WNT11	LGR6	DVL1	TCF7L1	SMAD3	TBL1X	RHOA	PPP3R2	
WNT16	RNF43	FRAT1	TCF7L2	MAP3K7	TBL1Y	ROCK2	PRKCA	

8. Referências

- Abdalla, E., & El-Beheiry, A. (2017). Overlap between Fibular Aplasia, Tibial Campomelia, and Oligosyndactyly and Fuhrmann's Syndromes in an Egyptian Female Infant. *Journal of Pediatric Genetics*, 06(02), 118–121. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597931>
- Adamska, M., MacDonald, B. T., Sarmast, Z. H., Oliver, E. R., & Meisler, M. H. (2004). En1 and Wnt7a interact with Dkk1 during limb development in the mouse. *Developmental Biology*, 272(1), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.026>
- Adrien, N., Petersen, J. M., Parker, S. E., & Werler, M. M. (2020). Vasoactive exposures and risk of amniotic band syndrome and terminal transverse limb deficiencies. *Birth Defects Research*, 112(14), 1074–1084. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1740>
- Al-Qattan, M. M. (2011). Wnt pathways and upper limb anomalies. *Journal of Hand Surgery: European Volume*, 36(1), 9–22. <https://doi.org/10.1177/1753193410380502>
- Al-Qattan, M. M. (2013). Molecular basis of the clinical features of Al-Awadi-Raas-Rothschild (limb/pelvis/uterus-hypoplasia/aplasia) syndrome (AARRS) and Fuhrmann syndrome. In *American Journal of Medical Genetics, Part A* (Vol. 161, Issue 9, pp. 2274–2280). Am J Med Genet A. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35437>
- Al-Qattan, M. M., & Abou Al-Shaar, H. (2015). Molecular basis of the clinical features of Holt-Oram syndrome resulting from missense and extended protein mutations of the TBX5 gene as well as TBX5 intragenic duplications. In *Gene* (Vol. 560, Issue 2, pp. 129–136). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.017>
- Al-Qattan, M. M., Al-Sahabi, A., & Al-Arfaj, N. (2010). Ulnar ray deficiency: A review of the classification systems, the clinical features in 72 cases, and related developmental biology. *Journal of Hand Surgery: European Volume*, 35(9), 699–707. <https://doi.org/10.1177/1753193409358240>
- Al-Qattan, M. M., & Al-Thunyan, A. (2015). Ulnar deficiencies. In *The Pediatric Upper Extremity* (pp. 265–275). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8515-5_12
- Al-Qattan, M. M., Shamseldin, H. E., & Alkuraya, F. S. (2013). The WNT7A G204S mutation is associated with both Al-Awadi-Raas Rothschild syndrome and Fuhrmann syndrome phenotypes. *Gene*, 516(1), 168–170. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.020>
- Albers, C. A., Newbury-Ecob, R., Ouwehand, W. H., & Ghevaert, C. (2013). New insights into the genetic basis of TAR (thrombocytopenia-absent radii) syndrome. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 23, Issue 3, pp. 316–323). Curr Opin Genet Dev. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.02.015>

- Albers, C. A., Paul, D. S., Schulze, H., Freson, K., Stephens, J. C., Smethurst, P. A., Jolley, J. D., Cvejic, A., Kostadima, M., Bertone, P., Breuning, M. H., Debili, N., Deloukas, P., Favier, R., Fiedler, J., Hobbs, C. M., Huang, N., Hurles, M. E., Kiddle, G., ... Ghevaert, C. (2012). Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nature Genetics*, *44*(4), 435–439. <https://doi.org/10.1038/ng.1083>
- Allou, L., Balzano, S., Magg, A., Quinodoz, M., Royer-Bertrand, B., Schöpflin, R., Chan, W. L., Speck-Martins, C. E., Carvalho, D. R., Farage, L., Lourenço, C. M., Albuquerque, R., Rajagopal, S., Nampoothiri, S., Campos-Xavier, B., Chiesa, C., Niel-Bütschi, F., Wittler, L., Timmermann, B., ... Superti-Furga, A. (2021). Non-coding deletions identify Maenli lncRNA as a limb-specific En1 regulator. *Nature*, *592*(7852), 93–98. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03208-9>
- Alves, L. U., Santos, S., Musso, C. M., Ezquina, S. A., Opitz, J. M., Kok, F., Otto, P. A., & Mingroni-Netto, R. C. (2017). Santos syndrome is caused by mutation in the WNT7A gene. *Journal of Human Genetics*, *62*(12), 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/jhg.2017.86>
- Anderson, B. H., Kasher, P. R., Mayer, J., Szyrkiewicz, M., Jenkinson, E. M., Bhaskar, S. S., Urquhart, J. E., Daly, S. B., Dickerson, J. E., O'Sullivan, J., Leibundgut, E. O., Muter, J., Abdel-Salem, G. M. H., Babul-Hirji, R., Baxter, P., Berger, A., Bonafé, L., Brunstom-Hernandez, J. E., Buckard, J. A., ... Yanick, J. (2012). Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus. *Nature Genetics*, *44*(3), 338–342. <https://doi.org/10.1038/ng.1084>
- Armour, C. M., Bulman, D. E., Jarinova, O., Rogers, R. C., Clarkson, K. B., Dupont, B. R., Dwivedi, A., Bartel, F. O., McDonell, L., Schwartz, C. E., Boycott, K. M., Everman, D. B., & Graham, G. E. (2011). 17p13.3 microduplications are associated with split-hand/foot malformation and long-bone deficiency (SHFLD). *European Journal of Human Genetics*, *19*(11), 1144–1151. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.97>
- Balraj, P., Concannon, P., Jamal, R., Beghini, A., Hoe, T. S., Khoo, A. S., & Volpi, L. (2002). An unusual mutation in RECQ4 gene leading to Rothmund-Thomson syndrome. In *Mutation Research* (Vol. 508).
- Barrow, J. R., Thomas, K. R., Boussadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M. R., & McMahon, A. P. (2003). Ectodermal Wnt3 β -catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes and Development*, *17*(3), 394–409. <https://doi.org/10.1101/gad.1044903>
- Basson, C. T., Bachinsky, D. R., Lin, R. C., Levi, T., Elkins, J. A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T. A., Leblanc-Straceski, J., Renault, B., Kucherlapati, R., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (1997). Mutations in human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. In *Nature Genetics* (Vol. 15, Issue 1, pp. 30–35). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ng0197-30>
- Beck, T. F., Mullikin, J. C., & Biesecker, L. G. (2016). Systematic evaluation of

- sanger validation of next-generation sequencing variants. *Clinical Chemistry*, 62(4), 647–654. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249623>
- Bedard, T., Lowry, R. B., Sibbald, B., Crawford, S., & Kiefer, G. N. (2018). Congenital limb deficiencies and major associated anomalies in Alberta for the years 1980–2012. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 176(1), 19–28. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38513>
- Bedard, T., Lowry, R. B., Sibbald, B., Kiefer, G. N., & Metcalfe, A. (2015). Congenital limb deficiencies in Alberta-A review of 33 years (1980-2012) from the Alberta Congenital Anomalies Surveillance System (ACASS). *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 167(11), 2599–2609. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37240>
- Bergman, J. E. H., Löhner, K., Sluis, C. K., Rump, P., & Walle, H. E. K. (2020). Etiological diagnosis in limb reduction defects and the number of affected limbs: A population-based study in the Northern Netherlands. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 182(12), 2909–2918. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61875>
- Bermejo-Sánchez, E., Cuevas, L., Amar, E., Bakker, M. K., Bianca, S., Bianchi, F., Canfield, M. A., Castilla, E. E., Clementi, M., Cocchi, G., Feldkamp, M. L., Landau, D., Leoncini, E., Li, Z., Lowry, R. B., Mastroiacovo, P., Mutchinick, O. M., Rissmann, A., Ritvanen, A., ... Martínez-Frías, M. L. (2011). Amelia: A multi-center descriptive epidemiologic study in a large dataset from the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research, and overview of the literature. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, 157(4), 288–304. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30319>
- Bermejo-Sánchez, E., & Posada de la Paz, M. (2017). Congenital anomalies: Cluster detection and investigation. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1031, pp. 535–557). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67144-4_29
- Bieganski, T., Jamsheer, A., Sowinska, A., Baranska, D., Niedzielski, K., Kozlowski, K., & Czarny-Ratajczak, M. (2012). Three new patients with FATCO: Fibular agenesis with ectrodactyly. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158A(7), 1542–1550. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35369>
- Bjørsum-Meyer, T., Herlin, M., Qvist, N., & Petersen, M. B. (2016). Vertebral defect, anal atresia, cardiac defect, tracheoesophageal fistula/esophageal atresia, renal defect, and limb defect association with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome in co-occurrence: two case reports and a review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13256-016-1127-9>
- Bongers, E. M. H. F., Duijf, P. H. G., Van Beersum, S. E. M., Schoots, J., Van Kampen, A., Burckhardt, A., Hamel, B. C. J., Lošan, F., Hoefsloot, L. H., Yntema, H. G., Knoers, N. V. A. M., & Van Bokhoven, H. (2004). Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 74(6), 1239–1248. <https://doi.org/10.1086/421331>

- Boussion, S., Escande, F., Jourdain, A. S., Smol, T., Brunelle, P., Duhamel, C., Alembik, Y., Attié-Bitach, T., Baujat, G., Bazin, A., Bonnière, M., Carassou, P., Carles, D., Devisme, L., Goizet, C., Goldenberg, A., Grotto, S., Guichet, A., Jouk, P. S., ... Petit, F. (2020). TAR syndrome: Clinical and molecular characterization of a cohort of 26 patients and description of novel noncoding variants of RBM8A. *Human Mutation*, 41(7), 1220–1225. <https://doi.org/10.1002/humu.24021>
- Briggs, T. A., Hubbard, M., Hawkins, C., Cole, T., Livingston, J. H., Crow, Y. J., & Pigott, A. (2011). Treatment of gastrointestinal bleeding in a probable case of cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts. *Molecular Syndromology*, 1(4), 159–162. <https://doi.org/10.1159/000321559>
- Browne, M. L., Carter, T. C., Kay, D. M., Kuehn, D., Brody, L. C., Romitti, P. A., Liu, A., Caggana, M., Druschel, C. M., & Mills, J. L. (2012). Evaluation of genes involved in limb development, angiogenesis, and coagulation as risk factors for congenital limb deficiencies. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 158 A(10), 2463–2472. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35565>
- Chinnaiya, K., Tickle, C., & Towers, M. (2014). Sonic hedgehog-expressing cells in the developing limb measure time by an intrinsic cell cycle clock. *Nature Communications*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms5230>
- Chong, J. X., Buckingham, K. J., Jhangiani, S. N., Boehm, C., Sobreira, N., Smith, J. D., Harrell, T. M., McMillin, M. J., Wiszniewski, W., Gambin, T., Coban Akdemir, Z. H., Doheny, K., Scott, A. F., Avramopoulos, D., Chakravarti, A., Hoover-Fong, J., Mathews, D., Witmer, P. D., Ling, H., ... Bamshad, M. J. (2015). The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. In *American Journal of Human Genetics* (Vol. 97, Issue 2, pp. 199–215). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.009>
- Chrysostomidis, G., Kanakis, M., Fotiadou, V., Laskari, C., Kousi, T., Apostolidis, C., Azariadis, P., & Chatzis, A. (2014). Diversity of congenital cardiac defects and skeletal deformities associated with the Holt-Oram syndrome. *International Journal of Surgery Case Reports*, 5(7), 389–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2014.04.034>
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A., & Martin, G. R. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*, 84(1), 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80999-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80999-X)
- da Costa Almeida, C. B., Welter, A. T., Abech, G. D., Brandão, G. R., Flores, J. A. M., Schüle, B., Francke, U., Fiegenbaum, M., Zen, P. R. G., & Rosa, R. F. M. (2020). Report of the Phenotype of a Patient with Roberts Syndrome and a Rare ESCO2 Variant. *Journal of Pediatric Genetics*, 09(01), 058–062. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696636>
- Delgado, I., & Torres, M. (2017). Coordination of limb development by crosstalk among axial patterning pathways. In *Developmental Biology* (Vol. 429, Issue 2, pp. 382–386). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.006>

- Drivas, T. G., Taylor, J. A., & Zackai, E. H. (2019). The final demise of Rodriguez lethal acrofacial dysostosis: A case report and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 179(6), 1063–1068. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61121>
- Ellingford, J. M., Campbell, C., Barton, S., Bhaskar, S., Gupta, S., Taylor, R. L., Sergouniotis, P. I., Horn, B., Lamb, J. A., Michaelides, M., Webster, A. R., Newman, W. G., Panda, B., Ramsden, S. C., & Black, G. C. M. (2017). Validation of copy number variation analysis for next-generation sequencing diagnostics. *European Journal of Human Genetics*, 25(6), 719–724. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.42>
- Elliott, A. M., Reed, M. H., Roscioli, T., & Evans, J. A. (2005). Discrepancies in upper and lower limb patterning in split hand foot malformation. *Clinical Genetics*, 68(5), 408–423. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00511.x>
- Elmakky, A., Stanghellini, I., Landi, A., & Percesepe, A. (2015). Role of Genetic Factors in the Pathogenesis of Radial Deficiencies in Humans. *Current Genomics*, 16(4), 264–278. <https://doi.org/10.2174/1389202916666150528000412>
- Eyaid, W., Al-Qattan, M. M., Al Abdulkareem, I., Fetaini, N., & Al Balwi, M. (2011). A novel homozygous missense mutation (c.610G>A, p.Gly204Ser) in the WNT7A gene causes tetra-amelia in two Saudi families. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(3), 599–604. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33717>
- Favaro, F. P., Alvizi, L., Zechi-Ceide, R. M., Bertola, D., Felix, T. M., de Souza, J., Raskin, S., Twigg, S. R. F., Weiner, A. M. J., Armas, P., Margarit, E., Calcaterra, N. B., Andersen, G. R., McGowan, S. J., Wilkie, A. O. M., Richieri-Costa, A., de Almeida, M. L. G., & Passos-Bueno, M. R. (2014). A noncoding expansion in EIF4A3 causes Richieri-Costa-Pereira syndrome, a craniofacial disorder associated with limb defects. *American Journal of Human Genetics*, 94(1), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.11.020>
- Fernandez-Teran, M., & Ros, M. A. (2008). The Apical Ectodermal Ridge: Morphological aspects and signaling pathways. In *International Journal of Developmental Biology* (Vol. 52, Issue 7, pp. 857–871). Int J Dev Biol. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072416mf>
- Fiesco-Roa, M. O., Giri, N., McReynolds, L. J., Best, A. F., & Alter, B. P. (2019). Genotype-phenotype associations in Fanconi anemia: A literature review. In *Blood Reviews* (Vol. 37). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100589>
- Francis, J. C., Radtke, F., & Logan, M. P. O. (2005). Notch1 signals through Jagged2 to regulate apoptosis in the apical ectodermal ridge of the developing limb bud. *Developmental Dynamics*, 234(4), 1006–1015. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20590>

- Froster-Iskenius, U. G., & Baird, P. A. (1989). Limb reduction defects in over one million consecutive livebirths. *Teratology*, 39(2), 127–135. <https://doi.org/10.1002/tera.1420390205>
- Furniss, D., Kan, S. H., Taylor, I. B., Johnson, D., Critchley, P. S., Giele, H. P., & Wilkie, A. O. M. (2009). Genetic screening of 202 individuals with congenital limb malformations and requiring reconstructive surgery. *Journal of Medical Genetics*, 46(11), 730–735. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.066027>
- Furniss, D., Lettice, L. A., Taylor, I. B., Critchley, P. S., Giele, H., Hill, R. E., & Wilkie, A. O. M. (2008). A variant in the sonic hedgehog regulatory sequence (ZRS) is associated with triphalangeal thumb and deregulates expression in the developing limb. *Human Molecular Genetics*, 17(16), 2417–2423. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn141>
- 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. (2011). Al-Awadi-Raas-Rothschild (limb/pelvis/uterus-hypoplasia/aplasia) syndrome and WNT7A mutations: Genetic homogeneity and nosological delineation. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(2), 332–336. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33793>
- Ghosh, S., Roy, S., Séguin, C., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2008). Analysis of the expression and function of Wnt-5a and Wnt-5b in developing and regenerating axolotl (*Ambystoma mexicanum*) limbs. *Development Growth and Differentiation*, 50(4), 289–297. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01000.x>
- Glinianaia, S. V., Morris, J. K., Best, K. E., Santoro, M., Coi, A., Armaroli, A., & Rankin, J. (2020). Long-term survival of children born with congenital anomalies: A systematic review and meta-analysis of population-based studies. *PLoS Medicine*, 17(9), e1003356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003356>
- Gold, N. B., Westgate, M. N., & Holmes, L. B. (2011). Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(6), 1225–1235. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33999>
- Gonzalez, C. H., Marques-Dias, M. J., Kim, C. A., Sugayama, S. M. M., Da Paz, J. A., Huson, S. M., & Holmes, L. B. (1998). Congenital abnormalities in Brazilian children associated with misoprostol misuse in first trimester of pregnancy. *Lancet*, 351(9116), 1624–1627. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12363-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12363-7)
- Gordillo, M., Vega, H., Trainer, A. H., Hou, F., Sakai, N., Luque, R., Iya Kayserili, H., Basaran, S., Skovby, F., M Hennekam, R. C., Giovannucci Uzielli, M. L., Schnur, R. E., Manouvrier, S., Chang, S., Blair, E., Hurst, J. A., Forzano, F., Meins, M., Simola, K. O., ... Wang Jabs, E. (2008). The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity. *Human Molecular Genetics*, 17(14), 2172–2180. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn116>
- Hara, K., Kimura, J., & Ide, H. (1998). Effects of FGFs on the morphogenic

- potency and AER-maintenance activity of cultured progress zone cells of chick limb bud. *The International Journal of Developmental Biology*, 42(4), 591–599. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694630>
- Hennekam, R. C., Biesecker, L. G., Allanson, J. E., Hall, J. G., Opitz, J. M., Temple, I. K., & Carey, J. C. (2013). Elements of morphology: General terms for congenital anomalies. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 161(11), 2726–2733. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36249>
- Hixson, L., Goel, S., Schuber, P., Faltas, V., Lee, J., Narayakkadan, A., Leung, H., & Osborne, J. (2015). An Overview on Prenatal Screening for Chromosomal Aberrations. *Journal of Laboratory Automation*, 20(5), 562–573. <https://doi.org/10.1177/2211068214564595>
- Hofstetter, G., Concin, N., Marth, C., Rinne, T., Erdel, M., & Janecke, A. (2008). Genetic analyses in a variant of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (MURCS association). *Wiener Klinische Wochenschrift*, 120(13–14), 435–439. <https://doi.org/10.1007/s00508-008-0995-4>
- Holmes, L. B. (2002). Teratogen-induced limb defects. *American Journal of Medical Genetics*, 112(3), 297–303. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10781>
- Holmes, L. B., Harvey, E. A., Coull, B. A., Huntington, K. B., Khoshbin, S., Hayes, A. M., & Ryan, L. M. (2001). The Teratogenicity of Anticonvulsant Drugs. *New England Journal of Medicine*, 344(15), 1132–1138. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104123441504>
- Hoyme, H. E., Kenneth, J., Jones, L., Dixon, S. D., Jewett, T., Hanson, J. W., Robinson, L. K., Msall, J. M. E., & Allanson, J. E. (1990). Prenatal Cocaine Exposure and Fetal Vascular Disruption. In *PEDIATRICS* (Vol. 85, Issue 5). www.aappublications.org/news
- Huettl, R. E., Luxenhofer, G., Bianchi, E., Haupt, C., Joshi, R., Prochiantz, A., & Huber, A. B. (2015). Engrailed 1 mediates correct formation of limb innervation through two distinct mechanisms. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118505>
- Huybrechts, K. F., Hernández-Díaz, S., Straub, L., Gray, K. J., Zhu, Y., Paterno, E., Desai, R. J., Mogun, H., & Bateman, B. T. (2018). Association of Maternal First-Trimester Ondansetron Use with Cardiac Malformations and Oral Clefts in Offspring. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 320(23), 2429–2437. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.18307>
- Huybrechts, Y., Mortier, G., Boudin, E., & Van Hul, W. (2020). WNT Signaling and Bone: Lessons From Skeletal Dysplasias and Disorders. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00165>
- James, M. A., Green, H. D., McCarroll, H. R., & Manske, P. R. (2004). The association of radial deficiency with thumb hypoplasia. In *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* (Vol. 86, Issue 10, pp. 2196–2205). Journal of Bone and Joint Surgery Inc. <https://doi.org/10.2106/00004623-200410000-00010>
- Ji, T., & Chen, J. (2016). Statistical models for DNA copy number variation

- detection using read-depth data from next generation sequencing experiments. *Australian & New Zealand Journal of Statistics*, 58(4), 473–491. <https://doi.org/10.1111/anzs.12175>
- Jin, L., Wu, J., Bellusci, S., & Zhang, J. S. (2019). Fibroblast growth factor 10 and vertebrate limb development. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 10, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00705>
- Johansen, H., Østlie, K., Andersen, L. Ø., & Rand-Hendriksen, S. (2015). Adults with congenital limb deficiency in Norway: Demographic and clinical features, pain and the use of health care and welfare services. A cross-sectional study. *Disability and Rehabilitation*, 37(22), 2076–2082. <https://doi.org/10.3109/09638288.2014.998781>
- Jourdain, A. S., Petit, F., Odou, M. F., Balduyck, M., Brunelle, P., Dufour, W., BouSSION, S., Brischoux-Boucher, E., Colson, C., Dieux, A., Gérard, M., Ghomid, J., Giuliano, F., Goldenberg, A., Khau Van Kien, P., Lehalle, D., Morin, G., Moutton, S., Smol, T., ... Escande, F. (2020). Multiplex targeted high-throughput sequencing in a series of 352 patients with congenital limb malformations. *Human Mutation*, 41(1), 222–239. <https://doi.org/10.1002/humu.23912>
- Kalaycioglu, A., & Aynaci, O. (2001). Proximal Focal Femoral Deficiency, Contralateral Hip Dysplasia in Association with Contralateral Ulnar Hypoplasia and Clefthand: A Case Report and Review of Literatures of PFFD and/or FFU. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 78(2–3), 83–90. https://doi.org/10.2535/ofaj1936.78.2-3_83
- Kantaputra, P. N., Kapoor, S., Verma, P., Kaewgahya, M., Kawasaki, K., Ohazama, A., & Ketudat Cairns, J. R. (2017). Al-Awadi-Raas-Rothschild syndrome with dental anomalies and a novel WNT7A mutation. *European Journal of Medical Genetics*, 60(12), 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.09.005>
- Kantaputra, Piranit N., Mundlos, S., & Sripathomsawat, W. (2010). A novel homozygous Arg222Trp missense mutation in WNT7A in two sisters with severe Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 152(11), 2832–2837. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33673>
- Kataoka, K., Matsushima, T., Ito, Y., Sato, T., Yokoyama, S., & Asahara, H. (2018). Bhlha9 regulates apical ectodermal ridge formation during limb development. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 36(1), 64–72. <https://doi.org/10.1007/s00774-017-0820-0>
- Keller, R. B., Gagne, K. E., Usmani, G. N., Asdourian, G. K., Williams, D. A., Hofmann, I., & Agarwal, S. (2012). CTC1 Mutations in a patient with dyskeratosis congenita. *Pediatric Blood and Cancer*, 59(2), 311–314. <https://doi.org/10.1002/pbc.24193>
- Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., De La Peña, J., Johnson, R. L., Belmonte, J. C. I., & Tabin, C. J. (1998). Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*, 280(5367), 1274–1277.

<https://doi.org/10.1126/science.280.5367.1274>

- Kerkhof, J., Schenkel, L. C., Reilly, J., McRobbie, S., Aref-Eshghi, E., Stuart, A., Rupar, C. A., Adams, P., Hegele, R. A., Lin, H., Rodenhiser, D., Knoll, J., Ainsworth, P. J., & Sadikovic, B. (2017). Clinical Validation of Copy Number Variant Detection from Targeted Next-Generation Sequencing Panels. *Journal of Molecular Diagnostics*, 19(6), 905–920. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.07.004>
- Kim, S., Lee, Y. S., Kim, D. H., Yang, A., Lee, T., Hwang, S. D., Kwon, D. G., & Lee, J. E. (2019). Long-term follow-up on MURCS (müllerian duct, renal, cervical somite dysplasia) association and a review of the literature. *Annals of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 24(3), 207–211. <https://doi.org/10.6065/apem.2019.24.3.207>
- Kimura, M., Kikuchi, A., Ichinoi, N., & Kure, S. (2015). Novel TBX5 Duplication in a Japanese Family with Holt–Oram Syndrome. *Pediatric Cardiology*, 36(1), 244–247. <https://doi.org/10.1007/s00246-014-1028-x>
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M., & Furuichi, Y. (1999). Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nature Genetics*, 22(1), 82–84. <https://doi.org/10.1038/8788>
- Klopocki, E., Lohan, S., Doelken, S. C., Stricker, S., Ockeloen, C. W., de Aguiar, R. S. T., Lezirovitz, K., Netto, R. C. M., Jamsheer, A., Shah, H., Kurth, I., Habenicht, R., Warman, M., Devriendt, K., Kordaß, U., Hempel, M., Rajab, A., Mäkitie, O., Naveed, M., ... Mundlos, S. (2012). Duplications of BHLHA9 are associated with ectrodactyly and tibia hemimelia inherited in non-Mendelian fashion. *Journal of Medical Genetics*, 49(2), 119–125. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100409>
- Klopocki, E., Schulze, H., Strauß, G., Ott, C. E., Hall, J., Trotier, F., Fleischhauer, S., Greenhalgh, L., Newbury-Ecob, R. A., Neumann, L. M., Habenicht, R., König, R., Seemanova, E., Megarbane, A., Ropers, H. H., Ullmann, R., Horn, D., & Mundlos, S. (2007). Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 80(2), 232–240. <https://doi.org/10.1086/510919>
- Klungsøyr, K., Nordtveit, T. I., Kaastad, T. S., Solberg, S., Sletten, I. N., & Vik, A. K. (2019). Epidemiology of limb reduction defects as registered in the Medical Birth Registry of Norway, 1970-2016: Population based study. *PLoS ONE*, 14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219930>
- Larizza, L., Roversi, G., & Volpi, L. (2010). Rothmund-thomson syndrome. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 5, Issue 1). Orphanet J Rare Dis. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-2>
- Le, J. T., & Scott-Wyand, P. R. (2015). Pediatric Limb Differences and Amputations. In *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* (Vol. 26, Issue 1, pp. 95–108). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2014.09.006>

- Lenz, W., Zygulska, M., & Horst, J. (1993). FFU complex: an analysis of 491 cases. *Human Genetics*, 91(4), 347–356. <https://doi.org/10.1007/BF00217355>
- Lettice, L. A., Heaney, S. J. H., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E., & de Graaff, E. (2003). A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Human Molecular Genetics*, 12(14), 1725–1735. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg180>
- Lezirovitz, K., Maestrelli, S. R. P., Cotrim, N. H., Otto, P. A., Pearson, P. L., & Mingroni-Netto, R. C. (2008). A novel locus for split-hand/foot malformation associated with tibial hemimelia (SHFLD syndrome) maps to chromosome region 17p13.1-17p13.3. *Human Genetics*, 123(6), 625–631. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0515-7>
- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M., & Joyner, A. L. (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature*, 382(6589), 360–363. <https://doi.org/10.1038/382360a0>
- Low, K. J., Ansari, M., Abou Jamra, R., Clarke, A., El Chehadeh, S., Fitzpatrick, D. R., Greenslade, M., Henderson, A., Hurst, J., Keller, K., Kuentz, P., Prescott, T., Roessler, F., Selmer, K. K., Schneider, M. C., Stewart, F., Tatton-Brown, K., Thevenon, J., Vigeland, M. D., ... Smithson, S. F. (2017). PUF60 variants cause a syndrome of ID, short stature, microcephaly, coloboma, craniofacial, cardiac, renal and spinal features. *European Journal of Human Genetics*, 25(5), 552–559. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.27>
- Lowry, R. B., & Bedard, T. (2016). Congenital limb deficiency classification and nomenclature: The need for a consensus. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 170(6), 1400–1404. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37608>
- Ludwig, K., Tenconi, R., & Salmaso, R. (2010). A case of femur-fibular-ulna complex with peculiar metaphyseal changes. *Fetal and Pediatric Pathology*, 29(4), 255–260. <https://doi.org/10.3109/15513811003789651>
- Lupiáñez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J. M., Laxova, R., Santos-Simarro, F., Gilbert-Dussardier, B., Wittler, L., Borschiwer, M., Haas, S. A., Osterwalder, M., Franke, M., Timmermann, B., Hecht, J., ... Mundlos, S. (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, 161(5), 1012–1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.004>
- Lupiáñez, D. G., Spielmann, M., & Mundlos, S. (2016). Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. In *Trends in Genetics* (Vol. 32, Issue 4, pp. 225–237). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.01.003>
- Mano, H., Fujiwara, S., Takamura, K., Kitoh, H., Takayama, S., Ogata, T., Hashimoto, S., & Haga, N. (2018). Congenital limb deficiency in Japan: A cross-sectional nationwide survey on its epidemiology. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12891-018->

2195-3

- Mansukhani, S., Ho, M. L., Gavrilova, R. H., Mohney, B. G., Quiram, P. A., & Brodsky, M. C. (2017). Cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts (CRMCC) or “Coats Plus”: when peripheral retinal vasculature signals neurologic disease. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 21(5), 420–422. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2017.04.015>
- Marles, S. L., Reed, M., & Evans, J. A. (2003). Humeroradial synostosis, ulnar aplasia and oligodactyly, with contralateral amelia, in a child with prenatal cocaine exposure. *American Journal of Medical Genetics*, 116(1), 85–89. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.10731>
- Martinez-Frias, M. L. (1994). Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in diabetic mothers: Identification of the most characteristic and most frequent congenital anomalies. *American Journal of Medical Genetics*, 51(2), 108–113. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320510206>
- Mcdermott, D. A., Bressan, M. C., He, J., Lee, J. S., Aftimos, S., Brueckner, M., Gilbert, F., Graham, G. E., Hannibal, M. C., Innis, J. W., Pierpont, M. E., Raas-Rothschild, A., Shanske, A. L., Smith, W. E., Spencer, R. H., St. John-Sutton, M. G., Van Maldergem, L., Waggoner, D. J., Weber, M., & Basson, C. T. (2005). TBX5 genetic testing validates strict clinical criteria for Holt-Oram syndrome. *Pediatric Research*, 58(5), 981–986. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000182593.95441.64>
- Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M. E., Martinez-A., C., Ros, M. A., & Torres, M. (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development*, 127(18), 3961–3970. <https://doi.org/10.7892/boris.79628>
- Mi, X. Bin, Luo, M. X., Guo, L. L., Zhang, T. De, & Qiu, X. W. (2015). CHILD Syndrome: Case Report of a Chinese Patient and Literature Review of the NAD[P]H Steroid Dehydrogenase-Like Protein Gene Mutation. In *Pediatric Dermatology* (Vol. 32, Issue 6, pp. e277–e282). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/pde.12701>
- Moraes, F., & Góes, A. (2016). A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 44(3), 215–223. <https://doi.org/10.1002/bmb.20952>
- Morimoto, M., Souich, C. Du, Trinh, J., McLarren, K. W., Boerkoel, C. F., & Henderson, G. (2012). Expression profile of NSDHL in human peripheral tissues. *Journal of Molecular Histology*, 43(1), 95–106. <https://doi.org/10.1007/s10735-011-9375-x>
- Mortier, G. R., Cohn, D. H., Cormier-Daire, V., Hall, C., Krakow, D., Mundlos, S., Nishimura, G., Robertson, S., Sangiorgi, L., Savarirayan, R., Sillence, D., Superti-Furga, A., Unger, S., & Warman, M. L. (2019). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 179(12), 2393–2419. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61366>

- Mutlu, M. B., Cetinkaya, A., Koc, N., Ceylaner, G., Erguner, B., Aydın, H., Karaman, S., Demirci, O., Goksu, K., & Karaman, A. (2016). A novel missense mutation, p.(R102W) in WNT7A causes Al-Awadi Raas-Rothschild syndrome in a fetus. In *European Journal of Medical Genetics* (Vol. 59, Issue 11, pp. 604–606). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.09.009>
- Nagata, E., Kano, H., Kato, F., Yamaguchi, R., Nakashima, S., Takayama, S., Kosaki, R., Tonoki, H., Mizuno, S., Watanabe, S., Yoshiura, K. I., Kosho, T., Hasegawa, T., Kimizuka, M., Suzuki, A., Shimizu, K., Ohashi, H., Haga, N., Numabe, H., ... Ogata, T. (2014). Japanese founder duplications/triplications involving BHLHA9 are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gollop-Wolfgang complex. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 125. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0125-5>
- Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J. L., & Müller, U. (2004). Homozygous WNT3 Mutation Causes Tetra-Amelia in a Large Consanguineous Family. *American Journal of Human Genetics*, 74(3), 558–563. <https://doi.org/10.1086/382196>
- Ordal, L., Keunen, J., Martin, N., Shehata, N., Borschel, G. H., Clarke, H. M., Toi, A., Shuman, C., & Chitayat, D. (2016). Congenital limb deficiencies with vascular etiology: Possible association with maternal thrombophilia. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 170(12), 3083–3089. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37890>
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. In *Genes and Development* (Vol. 29, Issue 14, pp. 1463–1486). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.266551.115>
- Parr, B. A., & Mc Mahon, A. P. (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D–V and A–P axes of mouse limb. *Nature*, 374(6520), 350–353. <https://doi.org/10.1038/374350a0>
- Patel, C., Silcock, L., McMullan, D., Brueton, L., & Cox, H. (2012). TBX5 intragenic duplication: A family with an atypical Holt-Oram syndrome phenotype. *European Journal of Human Genetics*, 20(8), 863–869. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.16>
- Paththinige, C. S., Sirisena, N. D., Escande, F., Manouvrier, S., Petit, F., & Dissanayake, V. H. W. (2019). Split hand/foot malformation with long bone deficiency associated with BHLHA9 gene duplication: A case report and review of literature. In *BMC Medical Genetics* (Vol. 20, Issue 1, p. 108). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0839-2>
- Petit, F., Sears, K. E., & Ahituv, N. (2017). Limb development: A paradigm of gene regulation. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 18, Issue 4, pp. 245–258). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.167>
- Pirooznia, M., Goes, F. S., & Zandi, P. P. (2015). Whole-genome CNV analysis: advances in computational approaches. *Frontiers in Genetics*, 06(MAR), 138. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00138>

- Pizette, S., Abate-Shen, C., & Niswander, L. (2001). BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*, 128(22), 4463–4474. <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/128/22/4463>
- Polvi, A., Linnankivi, T., Kivelä, T., Herva, R., Keating, J. P., Mäkitie, O., Pareyson, D., Vainionpää, L., Lahtinen, J., Hovatta, I., Pihko, H., & Lehesjoki, A. E. (2012). Mutations in CTC1, encoding the CTS telomere maintenance complex component 1, cause cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts. *American Journal of Human Genetics*, 90(3), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.02.002>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Riddle, R. D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T. M., & Tabin, C. (1995). Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT6a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*, 83(4), 631–640. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90103-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90103-5)
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75(7), 1401–1416. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90626-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90626-2)
- Rodríguez-Pinilla, E., Arroyo, I., Fondevilla, J., García, M. J., & Martínez-Frías, M. L. (2000). Prenatal exposure to valproic acid during pregnancy and limb deficiencies: A case-control study. *American Journal of Medical Genetics*, 90(5), 376–381. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(20000228\)90:5<376::AID-AJMG6>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(20000228)90:5<376::AID-AJMG6>3.0.CO;2-V)
- Rosano, A., Botto, L. D., Olney, R. S., Khoury, M. J., Ritvanen, A., Goujard, J., Stoll, C., Cocchi, G., Merlob, P., Mutchinick, O., Cornel, M. C., Castilla, E. E., Martínez-Frías, M. L., Zampino, G., Erickson, J. D., & Mastroiacovo, P. (2000). Limb defects associated with major congenital anomalies: Clinical and epidemiological study from the international clearinghouse for birth defects monitoring systems. *American Journal of Medical Genetics*, 93(2), 110–116. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(20000717\)93:2<110::AID-AJMG6>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1096-8628(20000717)93:2<110::AID-AJMG6>3.0.CO;2-9)
- Saunders, J. W., & Gasseling, M. T. (1968). Ectodermal-mesodermal interactions in the origin of limb symmetry. *Williams & Wilkins, Baltimore*, 78–97.
- Schneeberger, P. E., Nayak, S. S., Fuchs, S., Kutsche, K., & Girisha, K. M. (2020). Roberts syndrome in an Indian patient with humeroradial synostosis, congenital elbow contractures and a novel homozygous splice variant in *ESCO2*. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 182(11), 2793–2796. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61826>

- Sevilla-Montoya, R., Aguinaga, M., Martínez, A., Razo, G., Molina, B., Frías, S., & Grether, P. (2017). Heterogeneous Diagnoses Underlying Radial Ray Anomalies. *Indian Journal of Pediatrics*, 84(3), 200–205. <https://doi.org/10.1007/s12098-016-2270-4>
- Sikkema-Raddatz, B., Johansson, L. F., de Boer, E. N., Almomani, R., Boven, L. G., van den Berg, M. P., van Spaendonck-Zwarts, K. Y., van Tintelen, J. P., Sijmons, R. H., Jongbloed, J. D. H., & Sinke, R. J. (2013). Targeted Next-Generation Sequencing can Replace Sanger Sequencing in Clinical Diagnostics. *Human Mutation*, 34(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1002/humu.22332>
- Solomon, B. D. (2018). The etiology of VACTERL association: Current knowledge and hypotheses. In *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics* (Vol. 178, Issue 4, pp. 440–446). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31664>
- Sousa, S. B., Pina, R., Ramos, L., Pereira, N., Krahn, M., Borozdin, W., Kohlhase, J., Amorim, M., Gonnet, K., Lévy, N., Carreira, I. M., Couceiro, A. B., & Saraiva, J. M. (2008). Tetra-amelia and lung hypo/aplasia syndrome: New case report and review. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146A(21), 2799–2803. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32489>
- Stoll, C., Alembik, Y., Dott, B., & Roth, M. P. (2010). Associated malformations in patients with limb reduction deficiencies. *European Journal of Medical Genetics*, 53(5), 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.07.012>
- Stoll, C., Rosano, A., Botto, L. D., Erickson, D., Khoury, M. J., Olney, R. S., Castilla, E. E., Cocchi, G., Cornel, M. C., Goujard, J., Bermejo, E., Merlob, P., Mutchinick, O., Ritvanen, A., Zampino, G., & Mastroiacovo, P. (2001). On the symmetry of limb deficiencies among children with multiple congenital anomalies. *Annales de Génétique*, 44(1), 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0003-3995\(01\)01036-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3995(01)01036-X)
- Syvänen, J., Helenius, I., Koskimies-Virta, E., Ritvanen, A., Hurme, S., & Nietosvaara, Y. (2019). Hospital admissions and surgical treatment of children with lower-limb deficiency in Finland. *Scandinavian Journal of Surgery*, 108(4), 352–360. <https://doi.org/10.1177/1457496918812233>
- Syvänen, J., Nietosvaara, Y., Ritvanen, A., Koskimies, E., Kauko, T., & Helenius, I. (2014). High risk for major nonlimb anomalies associated with lower-limb deficiency: A population-based study. *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume*, 96(22), 1898–1904. <https://doi.org/10.2106/JBJS.N.00155>
- Szenker-Ravi, E., Altunoglu, U., Leushacke, M., Bosso-Lefèvre, C., Khatoor, M., Thi Tran, H., Naert, T., Noelanders, R., Hajamohideen, A., Beneteau, C., De Sousa, S. B., Karaman, B., Latypova, X., Başaran, S., Yücel, E. B., Tan, T. T., Vlamincx, L., Nayak, S. S., Shukla, A., ... Reversade, B. (2018). RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6. *Nature*, 557(7706), 564–569. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0118-y>

- Tayel, S. M., Fawzia, M. M., Niran, A. A. N., Said, G., Al Awadi, S. A., & Naguib, K. K. (2005). A morpho-etiological description of congenital limb anomalies. *Annals of Saudi Medicine*, 25(3), 219–227. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2005.219>
- Tickle, C. (2000). Limb development: An international model for vertebrate pattern formation. *International Journal of Developmental Biology*, 44(1), 101–108. <https://doi.org/10.1387/ijdb.10761854>
- Tickle, C. (2015). How the embryo makes a limb: Determination, polarity and identity. In *Journal of Anatomy* (Vol. 227, Issue 4, pp. 418–430). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/joa.12361>
- Van den Berg, D. J., & Francke, U. (1993). Roberts syndrome: A review of 100 cases and a new rating system for severity. *American Journal of Medical Genetics*, 47(7), 1104–1123. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320470735>
- Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. In *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* (Vol. 105, Issue 2, pp. 140–156). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21096>
- Vasluian, E., Van Der Sluis, C. K., Van Essen, A. J., Bergman, J. E. H., Dijkstra, P. U., Reinders-Messelink, H. A., & De Walle, H. E. K. (2013). Birth prevalence for congenital limb defects in the northern Netherlands: A 30-year population-based study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-323>
- Vega, H., Trainer, A. H., Gordillo, M., Crosier, M., Kayserili, H., Skovby, F., Uzielli, M. L. G., Schnur, R. E., Manouvrier, S., Blair, E., Hurst, J. A., Forzano, F., Meins, M., Simola, K. O. J., Raas-Rothschild, A., Hennekam, R. C. M., & Jabs, E. W. (2010). Phenotypic variability in 49 cases of ESCO2 mutations, including novel missense and codon deletion in the acetyltransferase domain, correlates with ESCO2 expression and establishes the clinical criteria for Roberts syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 47(1), 30–37. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.068395>
- Verheyden, J. M., & Sun, X. (2017). Embryology meets molecular biology: Deciphering the apical ectodermal ridge. In *Developmental Biology* (Vol. 429, Issue 2, pp. 387–390). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.01.017>
- Vianna, F. S. L., Lopez-Camelo, J. S., Leite, J. C. L., Sanseverino, M. T. V., Dutra, M. da G., Castilla, E. E., & Schüller-Faccini, L. (2011). Epidemiological Surveillance of Birth Defects Compatible with Thalidomide Embryopathy in Brazil. *PLoS ONE*, 6(7), e21735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021735>
- Walne, A. J., Bhagat, T., Kirwan, M., Gitiaux, C., Desguerre, I., Leonard, N., Nogales, E., Vulliamy, T., & Dokal, I. S. (2013). Mutations in the telomere capping complex in bone marrow failure and related syndromes. *Haematologica*, 98(3), 334–338. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.071068>

- Wang, L. L., Gannavarapu, A., Kozinetz, C. A., Levy, M. L., Lewis, R. A., Chintagumpala, M. M., Ruiz-Maldonado, R., Contreras-Ruiz, J., Cuniff, C., Erickson, R. P., Lev, D., Rogers, M., Zackai, E. H., & Plon, S. E. (2003). Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene Rothmund-Thomson syndrome. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(9), 669–674. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.9.669>
- Wang, L. L., Worley, K., Gannavarapu, A., Chintagumpala, M. M., Levy, M. L., & Plon, S. E. (2002). Intron-size constraint as a mutational mechanism in Rothmund-Thomson Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 71(1), 165–167. <https://doi.org/10.1086/341234>
- Watt, K. E. N., Neben, C. L., Hall, S., Merrill, A. E., & Trainor, P. A. (2018). Tp53-dependent and independent signaling underlies the pathogenesis and possible prevention of Acrofacial Dysostosis-Cincinnati type. *Human Molecular Genetics*, 27(15), 2628–2643. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy172>
- Weaver, K. N., Watt, K. E. N., Hufnagel, R. B., Navajas Acedo, J., Linscott, L. L., Sund, K. L., Bender, P. L., König, R., Lourenco, C. M., Hehr, U., Hopkin, R. J., Lohmann, D. R., Trainor, P. A., Wieczorek, D., & Saal, H. M. (2015). Acrofacial dysostosis, cincinnati type, a mandibulofacial dysostosis syndrome with limb anomalies, is caused by POLR1A dysfunction. *American Journal of Human Genetics*, 96(5), 765–774. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.03.011>
- Wieczorek, D. (2013). Human facial dysostoses. In *Clinical Genetics* (Vol. 83, Issue 6, pp. 499–510). Clin Genet. <https://doi.org/10.1111/cge.12123>
- Wilcox, W. R., Coulter, C. P., & Schmitz, M. L. (2015). Congenital Limb Deficiency Disorders. In *Clinics in Perinatology* (Vol. 42, Issue 2, pp. 281–300). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2015.02.004>
- Woods, C. G., Stricker, S., Seemann, P., Stern, R., Cox, J., Sherridan, E., Roberts, E., Springell, K., Scott, S., Karbani, G., Sharif, S. M., Toomes, C., Bond, J., Kumar, D., Al-Gazali, L., & Mundlos, S. (2006). Mutations in WNT7A cause a range of limb malformations, including fuhrmann syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 79(2), 402–408. <https://doi.org/10.1086/506332>
- Wu, N., Ming, X., Xiao, J., Wu, Z., Chen, X., Shinawi, M., Shen, Y., Yu, G., Liu, J., Xie, H., Gucev, Z. S., Liu, S., Yang, N., Al-Kateb, H., Chen, J., Zhang, J., Hauser, N., Zhang, T., Tasic, V., ... Zhang, F. (2015). TBX6 Null Variants and a Common Hypomorphic Allele in Congenital Scoliosis . *New England Journal of Medicine*, 372(4), 341–350. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1406829>
- Xiang, Y., Jiang, L., Wang, B., Xu, Y., Cai, H., & Fu, Q. (2017). Mutational screening of GLI3, SHH, preZRS, and ZRS in 102 Chinese children with nonsyndromic polydactyly. *Developmental Dynamics*, 246(5), 392–402. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24488>
- Xu, B., Hrycaj, S. M., McIntyre, D. C., Baker, N. C., Takeuchi, J. K., Jeannotte,

- L., Gaber, Z. B., Novitch, B. G., & Wellik, D. M. (2013). Hox5 interacts with Plzf to restrict Shh expression in the developing forelimb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19438–19443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315075110>
- Xu, B., & Wellik, D. M. (2011). Axial Hox9 activity establishes the posterior field in the developing forelimb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 4888–4891. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018161108>
- Yamamoto, G. L., Baratela, W. A. R., Almeida, T. F., Lazar, M., Afonso, C. L., Oyamada, M. K., Suzuki, L., Oliveira, L. A. N., Ramos, E. S., Kim, C. A., Passos-Bueno, M. R., & Bertola, D. R. (2014). Mutations in PCYT1A cause spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 94(1), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.11.022>
- Young, J. J., & Tabin, C. J. (2017). Saunders's framework for understanding limb development as a platform for investigating limb evolution. In *Developmental Biology* (Vol. 429, Issue 2, pp. 401–408). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.11.005>
- Zieba, J. T., Chen, Y. T., Lee, B. H., & Bae, Y. (2020). Notch signaling in skeletal development, homeostasis and pathogenesis. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10020332>
- Zlotogora, J., Rosenmann, E., Menashe, M., Robin, G. C., & Cohen, T. (1983). The femur, fibula, ulna (FFU) complex in siblings. *Clinical Genetics*, 24(6), 449–452. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1983.tb00102.x>