
Renata Soares Thiele de Aguiar

Estudos moleculares em famílias com defeitos de membros

Dissertação apresentada
ao Instituto de
Biociências da
Universidade de São
Paulo, para obtenção de
Título de Mestre em

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo

2011

Resumo

No presente trabalho foram desenvolvidos estudos genético-moleculares em três famílias com síndromes distintas de defeitos dos membros.

A ectrodactilia ou SHFM (split-hand/split-foot malformation) é uma malformação congênita da extremidade dos membros caracterizada por fenda mediana profunda das mãos e/ou pés devido à ausência dos raios centrais. A hemimelia tibial é um defeito caracterizado por hipoplasia, aplasia ou agenesia de tíbia, em que a fíbula permanece intacta. A síndrome da **hemimelia tibial associada à ectrodactilia** é uma condição rara de herança dominante. Em uma publicação do nosso grupo foi mapeado um novo loco (SHFLD3 – OMIM #612576) de hemimelia tibial associada à ectrodactilia (Lezirovitz e col., 2008) na região 17q13.1-17p13.3 em uma família com nove indivíduos afetados por essa síndrome. Nesse estudo foram sequenciados seis genes localizados na região candidata, mas nenhuma mutação patogênica foi encontrada. Em pesquisa colaborativa com grupo no exterior identificou-se uma duplicação de cerca de 114 Kb nessa região cromossômica. Ela estava presente em todos os indivíduos afetados e por meio de PCR de longo alcance foi possível identificar os pontos de quebra da duplicação.

A agenesia/hipoplasia fibular é um defeito que ocorre ao longo do desenvolvimento e extensão da fíbula. Ela é encontrada isolada ou associada com outros sinais clínicos como malformações em membros superiores, como a ectrodactilia, e defeitos na ulna e fêmur. Em uma família em que segrega uma nova síndrome, uma forma de **agenesia ou hipoplasia fibular associada à ectrodactilia** de aparente herança autossômica dominante (Santos e col., 2008) foram realizados estudos de mapeamento por meio de marcadores de microssatélites e sequenciamento dos genes nas regiões candidatas. Após a exclusão de ligação com algumas regiões já conhecidas associadas a

defeitos de membros, foram sequenciados alguns genes candidatos selecionados a partir da literatura sobre defeitos de membros (*SHH*, *ZRS*, *WNT7a*, *WNT10b*, *GREM1*). Dado que mutações não foram identificadas nesses genes, foi realizada a varredura genômica com o kit “Affymetrix GeneChip® Human Mapping 50K Array”. Foi observado que em quatro cromossomos (5, 6, 10 e 11) não foi possível a exclusão completa de ligação. Nesses cromossomos foram utilizados marcadores de microssatélites próximo às regiões que apresentaram um *lod score* sugestivo de ligação. As análises nos cromossomos 6 e 10 não confirmaram evidências de ligação. No cromossomo 5 e no cromossomo 11 não foi possível a exclusão completa de ligação. Nesses dois cromossomos ainda não existem regiões candidatas já mapeadas, na literatura. Para aprimorar nossos resultados, seriam necessários mais marcadores do tipo microssatélites para tentar refinar o mapeamento.

A terceira família é composta por três indivíduos afetados por um quadro variável de defeitos de membros, entre eles, polissindactilia, sindactilia, camptodactilia e defeitos ungueais. O heredograma sugere um padrão de herança do defeito compatível com herança autossômica dominante e penetrância completa. Realizaram-se estudos preliminares de ligação com microssatélites próximos as regiões cromossômicas já conhecidas associadas a malformações de membros. Na região candidata 17p13.1-17p13.3 não foi possível a exclusão completa de ligação, já que os *lod scores* chegaram a mostrar valores positivos e sugestivos.

Também foram sequenciados alguns genes candidatos (*SHH*, *ZRS*, *WNT7a*, *WNT10b*, *Grem1*). Dado que mutações não foram identificadas, foi realizada a varredura genômica com o kit “Affymetrix GeneChip® Human Mapping 50K Array”. A análise dos SNPs dos cromossomos 19, 20 e 21 permitiu a exclusão completa de ligação com esses cromossomos. Já em relação aos demais cromossomos não se pode

excluir completamente a ligação, já que vários deles apresentaram *lod scores* muito próximos do *lod* máximo possível calculado para a família. A dificuldade decorre do fato da família ser pequena e possuir somente duas gerações com indivíduos afetados. Supomos ser necessário utilizar mais microssatélites nas regiões que apresentaram *lod scores* próximos ao *lod* máximo potencial da família a fim de aprofundar o estudo. As regiões mais interessantes para aprofundar a investigação seriam as do cromossomo 17, pois houve sugestão de ligação também na análise de microssatélites. O gene *YWHAE* foi sequenciado por se mostrar um bom candidato, entretanto nenhuma mutação foi encontrada.

1.Introdução

1.1. Embriogênese e desenvolvimento dos membros

Ao redor do 33º após a fecundação, os embriões de mamíferos iniciam o desenvolvimento de membros por meio do crescimento de pequenos núcleos indiferenciados de células mesenquimais recobertas pela ectoderme. Esses pequenos brotos de células aparecem em locais específicos ao longo do eixo cabeça-cauda, paralelamente ao plano mediano (Duijf e col.,2003). Durante esse desenvolvimento, ocorre o achatamento das células mesenquimais, induzindo o espessamento da ectoderme que as recobre, e formando a crista ectodérmica apical (AER). Durante essa etapa, a sinalização posicional adequada entre as células mesenquimais e a AER dentro da estrutura tridimensional do membro é crucial para a diferenciação celular. Diversos genes que participam dessas vias de sinalização já foram identificados, como por exemplo, *FGF4*, *FGF8*, *SHH*, *WNT7a*, *BMP2*, *BMP4*, entre outros (Niswander, 2003).

Por volta do 38º dia os raios digitais já são visíveis sob a forma de espirais, com as pontas dos futuros dígitos projetando-se em direção à extremidade dos pequenos brotos. No 41º dia os raios digitais são estabilizados e ocorre a inervação do futuro membro pelos nervos radiais, mediano e ulnar. É também durante esse período que as regiões interdigitais são formadas como resultado da apoptose de células pré-definidas anteriormente. No final na 8ª semana de gestação, interações entre produtos de diversos genes e demais moléculas de sinalização dão origem à completa diferenciação dos membros, que terão uma aparência e função bem definidas e um número específico de dígitos (Niswander, 2003).

Malformações congênitas de membros ocorrem como defeitos isolados de mãos e pés ou como parte de síndromes. Uma das causas mais comuns desses defeitos são

perturbações nas principais vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento de membros (Niswander, 2003).

1.2. Ectrodactilia

A forma clássica de ectrodactilia, também conhecida como SHFM (split-hand/split-foot malformation), é uma malformação congênita de membros caracterizada por fendas medianas profundas nas mãos e/ou pés com ausência de dígitos, devido a um defeito no desenvolvimento dos raios centrais (Crackower e col., 1996). A prevalência do defeito foi estimada entre 1/10000 e 1/90000 nascimentos na população em geral (Tentamy & McKusick, 1978 e Nelson e Holmes, 1980 apud Nunes e col., 1995)

A expressividade da SHFM é muito variável entre indivíduos afetados de famílias diferentes ou da mesma família e entre os membros homólogos de um mesmo indivíduo, podendo exteriorizar-se como sindactilia (fusão de dois ou mais dígitos), aplasia e/ou hipoplasia de falanges, metacarpos e metatarso em casos mais leves ou apresentar-se com uma aparência característica de garras de lagosta, monodactilia ou até mesmo ocorrer ausência completa do autópode (Evermam e col., 2006).

A SHFM é clinicamente muito heterogênea e pode se apresentar de forma isolada ou sindrômica. A forma isolada (não-sindrômica) pode ocorrer ou associada ou não a outras deficiências de ossos longos (Mollerat e col., 2003). Já a ectrodactilia sindrômica está associada a defeitos em outros sistemas incluindo malformações craniofaciais, genitais e urinárias e de estruturas ectodérmicas (Crackower e col., 1996). Dentre as várias síndromes com SHFM, a mais comum é conhecida como ECC (ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura lábio-palatal- OMIM #129900).

A ectrodactilia não-sindrômica geralmente tem o padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta da ordem de 90% (Zlotogora, 1994). São descritos também casos raros de herança ligada ao cromossomo X ou herança

autossômica recessiva (Everman, 2006). Existem também casos de SHFM que são causados por deleções ou duplicações em regiões cromossômicas.

O mapeamento de genes responsáveis pela SHFM foi possível detalhando-se o estudo de defeitos cromossômicos em afetados por ectrodactilia e por meio de estudos de ligação com marcadores moleculares realizados em famílias com um grande número de indivíduos afetados. Foram identificados seis locos (ou regiões candidatas) a conter genes responsáveis por ectrodactilia, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Relação das regiões cromossômicas já associadas à ectrodactilia e respectivos genes candidatos (modificada de Duijf e col.,2003).

Regiões cromossômicas candidatas	Localização cromossômica	Genes Candidatos
SHFM1 (OMIM #183600)	7q21	<i>DLX5, DLX6 e DSS1</i>
SHFM2 (OMIM #313350)	Xq26	<i>FGF13 e TONDU</i>
SHFM3 (OMIM #600095)	10q24	<i>DACTYLIN, SUFU e BTRC</i>
SHFM4 (OMIM #605289)	3q27	<i>TP63</i>
SHFM5 (OMIM #606708)	2q31	<i>DLX1 e DLX2</i>
SHFM6 (OMIM #225300)	12q13	<i>WNT10b</i>

1.2.1.SHFM1

Um grande número de casos isolados de SHFM ou formas sindrômicas de ectrodactilia está associado a aberrações cromossômicas abrangendo a região 7q21.3-q22. Famílias com SHFM e deficiência auditiva sensorioneural sempre mostram ligação com esse loco. Extensivas análises comparativas de deleções nessa região permitiram selecionar uma região cromossômica crítica de 1.5 Mb. Três genes em comum foram localizados nesses intervalos de deleção: *DLX5, DLX6 e DSS1* (Duijf e col., 2003). Em

teoria, qualquer um desses três genes é candidato a explicar a ectrodactilia nesses casos de alteração cromossômica. No entanto, até o momento, não há descrição na literatura de famílias com muitos indivíduos afetados por ectrodactilia não-sindrômica, cujos estudos de ligação tenham apontado o loco SHFM1 em 7q21.3-q22 como candidato a conter o gene responsável pelo defeito.

1.2.2.SHFM2

Apenas uma única família paquistanesa com SHFM (ectrodactilia não-sindrômica) foi descrita na literatura por Ahmad e col, (1987) com um padrão de herança do defeito compatível com herança ligada ao cromossomo X. Os pacientes dessa família paquistanesa exibiam malformação típica com aspecto de garras de lagostas, monodactilia e pés fendidos. A família era composta de 36 indivíduos afetados no qual 33 eram homens e 3 mulheres. A hipótese de herança ligada ao cromossomo X levou a um extensivo detalhamento dos sinais clínicos das mulheres heterozigotas que apresentavam uma expressão mais leve e branda do fenótipo (Duijf e col., 2003).

Por meio de estudos de ligação foi possível mapear o loco SHFM2 na região cromossômica Xq26. Possíveis genes candidatos nessa região incluem *FGF13* e *TONDU*, mas ainda não foram encontradas mutações que confirmem essa hipótese (Duijf e col., 2003).

1.2.3.SHFM3

O terceiro loco associado a SHFM não-sindrômica foi definido como uma região de cerca de 2cM, localizada em 10q24-q25, que contém vários genes que podem estar relacionados ao início do desenvolvimento embrionário dos membros, um dos quais é o gene da dactilina (*DACTYLIN*).

Já foi identificada uma duplicação de aproximadamente 0,5 Mb que continha cópias dos genes *LBX1* e *βTRC* e uma cópia parcial do gene *DACTYLIN* em seis pacientes com ectrodactilia de seis diferentes famílias cujo fenótipo mostrou ligação ao SHFM3 (Mollerat e col., 2003). Duplicações genômicas semelhantes em tandem também já foram encontradas em duas famílias japonesas com SHFM não-sindrômica (Kano e col., 2005) e em oito de 44 casos de SHFM sindrômica e não sindrômica estudadas por Everman e col. (2006). Esses achados totalizam em 16 o número de rearranjos cromossômicos semelhantes que envolvem o gene *DACTYLIN* presente nessa região. Existe ainda um grande número de genes candidatos localizados na região cromossômica 10q24 como, por exemplo, *FGF8*, *SUFU* e *BTRC*, mas nenhuma mutação nesses genes que confirme essas hipóteses foi encontrada (Duijf e col., 2003).

Expansões ou contrações de repetições de trinucleotídeos CGG no gene *HOX11* localizado nessa região também poderiam explicar a antecipação visualizada em famílias com SHFM3, mas isso nunca foi confirmado.

1.2.4.SHFM4

A região cromossômica 3q27 foi o primeiro loco associado a SHFM que teve um gene e uma mutação precisamente identificados como responsáveis pela ectrodactilia. Mutações associadas a SHFM4 foram encontradas no gene *TP63*. O gene *TP63* codifica uma proteína homóloga a proteína supressora de tumor p53 e tem um papel importantíssimo no desenvolvimento embrionário.

Mutações no gene *TP63* foram primeiramente identificadas em pacientes com ECC (ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura lábio-palatal). Mais tarde, mutações nesse gene foram descritas em casos de ectrodactilia não-sindrômica e em um grande número de outras síndromes (como a síndrome membro-mamária). No total, foram

encontradas e descritas sete mutações no gene *TP63* em famílias afetadas por ectrodactilia não-sindrômica ou em pacientes isolados (Duijf e col., 2003).

1.2.5.SHFM5

Pacientes com deleções na região cromossômica 2q24-q31 exibem uma série de anormalidades incluindo microcefalia, retardo mental, micrognatía e malformações de membros. Apenas um número pequeno de pacientes apresentaram deleções nessa região associada com a ectrodactilia típica. Por meio de uma análise extensiva de deleções nessa região, foi possível determinar um intervalo crítico relacionado a SHFM5, situado entre os genes que constituem o agrupamento *HODX* localizado em 2q31.1, entre o gene *EVX2* e o microssatélite D2S294 (Duijf e col., 2003). Genes candidatos localizados na região crítica do intervalo de SHFM5 incluem o *DLX1* e *DLX2*, dois genes que possuem domínios *homeobox* e que são expressos na AER e na zona de progresso (agrupamento de células importantes no início do desenvolvimento embrionário dos membros). Nenhuma mutação nesses genes levando à ectrodactilia foi encontrada.

1.2.6.SHFM6

A região cromossômica 12q13.11-q13 foi o segundo loco associado a SHFM que teve um gene e uma mutação precisamente identificados como responsáveis pela ectrodactilia. A primeira mutação associada foi encontrada em uma família da Turquia Oriental constituída por 13 afetados por SHFM autossômica recessiva. Todos os indivíduos afetados nasceram de casamentos consanguíneos. Doze dos afetados apresentaram uma redução central nos ossos dos pés acompanhada ou não do comprometimento das mãos e um único afetado apresentou um quadro atípico à SHFM,

tendo apenas a mão com sindactilia unilateral, sem envolvimento dos pés. Em geral, as mulheres foram menos gravemente afetadas que os homens, sendo que as mãos foram muito menos afetadas do que os pés. A característica apresentou expressividade muito variável entre os indivíduos afetados (Ugur e Tolun .,2008).

Por meio de estudos de ligação com microssatélites foi identificada uma região candidata em 12q13.11-q13 com lod de múltiplos pontos atingindo 5,47. Nessa região foi sequenciado o gene *WNT10B*, importante gene relacionado à sinalização durante a formação de membros na embriogênese. Encontrou-se uma mutação de sentido errado em homozigose em todos os indivíduos afetados. Este é o primeiro estudo sobre o papel do gene *WNT10B* no desenvolvimento dos membros, sendo a primeira mutação encontrada. O gene *WNT10b* age como uma chave de sinalização, promovendo a osteoblastogênese e inibindo a formação de células adiposas (Ugur e Tolun .,2008).

Estudos recentes descreveram pacientes, casos esporádicos com SHFM, que possuíam uma mesma duplicação de 4bp no gene *WNT10b*. Essa mutação levava a um códon prematuro de parada e foi identificada como a possível responsável pelo fenótipo (Blattner e col., 2010).

1.3. Hemimelia Tibial

A hemimelia tibial é uma anomalia rara e geneticamente heterogênea. É caracterizada por deficiência da tibia ou ausência da tibia, com a fíbula permanecendo relativamente intacta. Ela pode ser classificada em quatro tipos de acordo com critérios radiológicos (Matsuyama e col., 2003).

O defeito da tibia é muito variável podendo ocorrer desde ausência completa até ausência distal ou proximal. Ela pode se apresentar como uma anomalia isolada ou estar associada com outras malformações esqueléticas ou extraesqueléticas.

Na maioria dos casos, a hemimelia tibial costuma ocorrer em casos isolados. Entretanto, famílias com vários indivíduos afetados já foram descritas na literatura. Em grande parte dos casos familiares a doença se apresenta com um padrão de herança autossômico dominante, demonstrando grande variabilidade clínica e penetrância reduzida.

Já foram sugeridos três genes como possíveis responsáveis pela doença, uma vez que suas funções estão relacionadas ao desenvolvimento de membros durante a embriogênese: *HOXD-11* (região cromossômica 2q31.1), *HOXD-12* (região cromossômica 2q31-q32) e o *SHH* (região cromossômica 7q35-7qter), mas até o momento nenhuma mutação foi encontrada para sustentar tal hipótese (Matsuyama e col., 2003).

1.4. Hemimelia Tibial associada à Ectrodactilia

Segundo Richieri-Costa e col. (1987a) a maioria das formas sindrômicas existentes de hemimelia tibial são de herança autossômica dominante: a síndrome de Werner, a síndrome de hemimelia tibial associada a diplopodia, a síndrome de hemimelia tibial-micromelia-trigonobraquicefalia e a síndrome da hemimelia tibial associada a mãos e pés fendidos (ectrodactilia), um dos objetos do nosso estudo.

A síndrome da hemimelia tibial associada à ectrodactilia é uma anomalia rara. Normalmente apresenta um padrão de herança autossômica dominante. Sua incidência foi estimada em 1 cada 1.000.000 nascidos vivos (Fernandez-Palazzi e col., 1998). Ela é caracterizada por múltiplas malformações congênitas que incluem ectrodactilia (deformidade de garras de lagosta ou mãos/pés fendidos) e uma grande variedade de fenótipos que incluem ausência de tibia ou deficiência de ossos longos.

Gurrieri e col. (1996) não detectaram ligação entre a síndrome da hemimelia tibial associada à ectrodactilia com os marcadores moleculares de locos já conhecidos

de ectrodactilia não-sindromica. Além disso, Matsuyama e col. (2003) realizaram pesquisas de mutações nos genes *HOXD11* e *HOXD12* em dois irmãos afetados, mas também não encontraram resultados que explicassem a síndrome. Mais recentemente, Naveed e col. (2007) realizaram uma varredura genômica com SNP's em uma família dos Emirados Árabes Unidos com elevado grau de endocruzamento e vários indivíduos afetados pela síndrome de hemimelia tibial e ectrodactilia. A análise de ligação permitiu que os autores mapeassem dois locos candidatos a conter genes responsáveis pela síndrome nessa família, nas regiões cromossômicas 1q42.2-q43 (SHFLD1- OMIM #119100) e 6q14.1 (SHFLD2 – OMIM #610685). No entanto, nenhum gene nessas regiões foi pesquisado à procura de mutações. Até pouco tempo atrás, apenas essas duas regiões cromossômicas candidatas eram relacionadas à síndrome da hemimelia tibial associada a ectrodactilia. Na publicação recente do nosso grupo foi mapeado um novo loco de hemimelia tibial associada à ectrodactilia na região 17q13.1-17p13.3 (Lezirovitz e col., 2008). A publicação desse estudo levou a criação de mais uma “entrada” no OMIM (SHFLD3 – OMIM #612576). Essa família foi objeto de estudos moleculares que foram conduzidos nesse projeto de mestrado.

1.5. Aplasia Fibular

A aplasia e/ou hipoplasia fibular é um defeito que ocorre ao longo do desenvolvimento e extensão da fíbula e costuma ser a malformação congênita mais comum relacionada a ossos longos (Courtens e col.,2005). O termo aplasia/hipoplasia fibular abrange uma enorme variabilidade de fenótipos, podendo ser muito diferente tanto entre indivíduos afetados quanto entre os membros de um mesmo indivíduo (Lewin e Opitz.,1986).

Casos de agenesia da fíbula podem ocorrer em famílias ou como casos isolados, podem ocorrer como malformação isolada ou como parte de algumas síndromes. Na maioria dos casos descritos na literatura ela é encontrada na forma unilateral, nos casos isolados, ou associada com demais sinais clínicos como braquidactilia (OMIM #276820), defeitos na ulna e fêmur, malformações em membros superiores (ectrodactilia e polidactilia) e outros. (Lewin e Opitz.,1986; Courtens e col.,2005).

Alguns estudos mostraram que a gravidade da hipoplasia fibular freqüentemente está associada com o número de raios metatársicos ausentes. Segundo Stanitski e Stanitski, (2003) 13% dos casos de ausência total da fíbula estão associados a pacientes com cinco raios, 40% associados a pacientes com quatro raios e 47% associados a pacientes com três raios, sugerindo uma relação inversa entre o número de raios ausentes no pé e a gravidade do encurtamento do membro. Alguns genes foram indicados como possíveis responsáveis pela agenesia de fíbula, tais como o *GDF5* (Douzgon e col., 2008) localizado na região 20q11 (fator 5 de diferenciação/crescimento) e o *TBX3* (Borozdin e col., 2006), localizado na região 12q24, nos quais foram encontradas mutações em indivíduos afetados pela síndromes de hipoplasia fibular e braquidactilia complexa (OMIM #228900) e em indivíduos com a síndrome Ulnar-mamária respectivamente (OMIM #181450).

Lewin e Opitz (1986) também descreveram alguns estudos realizados em animais que puderam comprovar que o desenvolvimento da fíbula é comprometido e interrompido por causa de exposição extensiva à radiação, com o uso de ácido retinóico ou de outras substâncias teratogênicas durante a gestação.

Em publicação do nosso grupo foi descrita uma família com uma síndrome aparentemente nova caracterizada por: aplasia/hipoplasia fibular, ectrodactilia, anoníquia/hipoplasia ungueal, entre outros defeitos (Família 2). Essa família é

constituída de seis indivíduos afetados com fenótipos de gravidade variável e também foi alvo dos estudos moleculares desenvolvidos no mestrado (Santos e col., 2008).

1.6.Outros defeitos de membros.

Alguns outros defeitos de membros como a polidactilia (existência de dígitos supranumerários), a braquidactilia (dígitos desproporcionalmente curtos), a sindactilia (união entre dois ou mais dígitos) e a camptodactilia (impossibilidade de extensão total de um ou mais dígitos) são exemplos de malformações em que já se conhecem alguns genes responsáveis pelas alterações fenotípicas (Tentamy & McKusick, 1978; Nelson e Holmes, 1980; Crackower e col., 1996; Gilbert.,2003). Esses genes normalmente estão relacionados com as vias de sinalização e regulação durante a embriogênese, mais precisamente durante o momento da formação da crista ectodérmica apical (AER) e do posicionamento das células mesodérmicas (Gilbert.,2003). Alguns desses genes aparecem relacionados na tabela 2.

Tabela 2. Relação de alguns genes importantes na formação dos membros durante a embriogênese e suas respectivas localizações.

Genes relacionados a defeitos de membros	Localização cromossômica
<i>ZRS</i>	7q36
<i>SHH</i>	7q36
<i>WNT7a</i>	3p25
<i>GREM1</i>	15q13

1.6.1. Sonic hedgehog homolog (*SHH*) e *ZRS*.

A manutenção do padrão antero-posterior dos dígitos durante a embriogênese é importante para a formação correta dos dígitos das mãos e pés. Em 1986, Gasseling e Saunders sugeriram que o eixo antero-posterior é formado por um pequeno broto de células mesodérmicas que ficam próximas da junção posterior do jovem membro formado (Figura 1). Esse centro foi identificado pelos dois pesquisadores como um centro de sinalização responsável pela produção gradual de uma molécula sinalizadora. Essa região recebeu o nome de zona de polarização (ZPA) e é ela a responsável pelo padrão de dígitos dos membros de todos os tetrápodes (Hill e col., 2003).

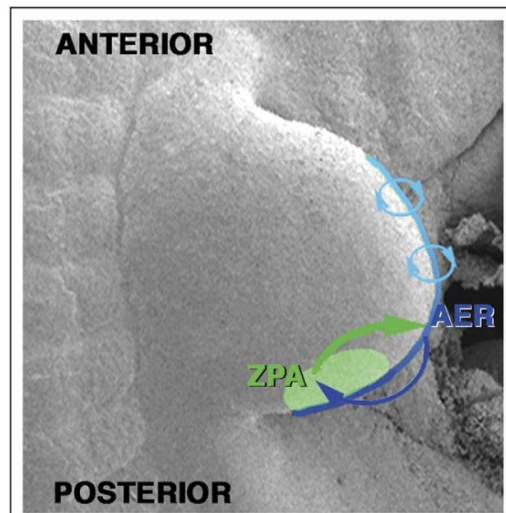


Figura 1. Zona de polarização (ZPA) localizada próximo a junção posterior do membro jovem formado e perpendicular a crista ectodérmica apical (AER) (modificada de Zeller e Zuniga., 2007).

A zona de polarização é um aglomerado de células biologicamente distintas que podem ser manipuladas e transplantadas para locais diferentes do local de origem. Quando transplanta-se a ZPA à borda anterior oposta do membro normal temos a formação de um dígito extra em camundongos (Galli e col., 2010). Um dado interessante observado com esses experimentos foi que o padrão e o número dos dígitos

são sempre diretamente dependentes do número de células transplantadas (Albuisson e col., 2010). Em 1993, Riddle e colaboradores observaram por meio de hibridação *in situ* que o gene *sonic hedgehog homolog (SHH)*, homólogo ao gene *hedgehog* da drosófila, estava expresso especificamente na ZPA. Atualmente já se sabe que é ele o responsável pela sinalização e formação dos dígitos (Lettice e col., 2003). Mutações nesse gene já foram identificadas e relacionadas com o desenvolvimento de dedos supranumerários. Mutações na sequência regulatória *ZRS*, “*enhancer*” ou acentuador do gene *SHH*, também já foram relacionadas com malformações de membros. Sato e col., 2007, Sun e col., 2008 e Wu e col., 2009 identificaram duplicações em *ZRS* em pacientes com sindactilia do tipo IV e em pacientes com hipoplasia tibial. Wieczorek e col., 2009 identificaram mutações específicas em *ZRS* causando síndrome de Werner e duplicações específicas causando polidactilia associada a sindactilia e polidactilia preaxial. A síndrome de Werner é uma doença autossômica dominante caracterizada por hemimelia tibial associada a polidactilia preaxial das mãos e/ou pés ou mãos com cinco dedos, com ausência do polegar. Nesse estudo foram encontradas mutações pontuais (404G>A e 404G>C) em um nucleotídeo específico de *ZRS* e estas foram identificadas como as possíveis causas do fenótipo.

Recentemente, mutações pontuais na sequência regulatória *ZRS* foram identificadas em pacientes portadores da polidactilia preaxial do tipo II (Gurnett e col., 2006; Lettice e col., 2008; Li e col., 2009; Albuisson e col., 2010) e em pacientes portadores de polegar trifalângico (Furniss e col., 2008; Farooq e col., 2010). A sequência regulatória *ZRS* está localizada no cromossomo 7 (7q36.3), no intron 5 do gene *LMBR1* e exerce um efeito regulatório temporal e espacial sobre o gene *SHH* que se encontra a 1 MB a 3’ (*downstream*) do *ZRS* (Semerci e col., 2009; Wieczorek e col., 2009).

Atualmente, o *SHH* e o *ZRS* são consideradas as principais sequências que quando mutadas são responsáveis por defeitos de membros. Furniss e col. (2010) realizaram um estudo de triagem com 202 pacientes que tinham malformações congênitas de membros, por meio de dHPLC e sequenciamento e observaram que dentre os 23 pacientes em que foi descoberta alguma causa genética para o defeito, 5 possuíam mutações em *SHH* ou em *ZRS*.

1.6.2. WNT7a.

Enquanto o eixo antero-posterior dos membros está sob o controle direto do *SHH* a partir do mesênquima posterior e da ZPA, o desenvolvimento do eixo dorso-ventral é controlado por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) a partir do ectoderma ventral, e pelo gene *wnt7a*, a partir do ectoderma dorsal (Woods e col., 2006). Em 1995, Parr e McMahon deletaram o *wnt7a* em embriões de camundongos e observaram a formação de um aglomerado de células indefinidas formando almofadas em ambas as regiões das patas dos animais, mostrando como o gene *Wnt7a* é necessário para a padronização dorsal dos membros. Foi observado também que se o ectoderma dorsal fosse retirado ou se a expressão do *wnt7a* fosse inibida, haveria uma redução drástica na expressão do gene *shh*, indicando que a manutenção da expressão de *SHH* depende da sinalização que vem da região dorsal (Furniss e col., 2009).

A síndrome congênita da palma das mãos é uma síndrome rara que envolve uma variedade de fenótipos como: palmas das mãos constituídas por uma pele grossa e anormal, sem cabelos ou unhas, deficiência ulnar bilateral de raios, hipoplasia dos membros superiores e graves distúrbios nos membros posteriores (Al-Qattan e col., 2009). Al-Qattan e col. (2009) relatam o caso de um paciente com a síndrome congênita da palma das mãos em que foi identificada uma mutação (substituição de uma

guanina por uma adenina) no exon 4 do gene *WNT7a*, mostrando como esse gene pode estar relacionado a malformações dos membros.

Outra síndrome também relacionada a mutações em *WNT7A* é a síndrome de Al-Awadi/Raas-Rothschild, uma doença autossômica recessiva caracterizada por malformações graves dos membros superiores e inferiores e hipoplasia da bacia. Woods e col, (2009) descreveram dois casos em que a mutação (substituição de uma timina por uma citosina na posição 1179) em *WNT7a* foi identificada resultando em troca de uma arginina por uma cisteína, levando à perda total da função de *WNT7a*.

Estudos com camundongos *knockout* em relação ao gene *Wnt7a* também já foram realizados e mostraram um fenótipo em que os camundongos mutantes apresentam diminuição e encurtamento dos dígitos das mãos e perda de falange do autópode, reforçando a sua importância no desenvolvimento de membros em camundongos (Adamska e col., 2005).

Além disso, o *WNT7a* também é importante, pois induz a ativação de um gene expresso no mesênquima dorsal, o *LMX1* (Gilbert.,2003).

1.6.3.GREMI.

O gene *Sonic Hedgehog (SHH)*, como visto anteriormente, é amplamente expresso na região de polarização e seu produto instrui as células em relação ao seu posicionamento antero-posterior e especifica a identidade tetrápode dos dígitos. A expressão de *SHH* é regulada por *feedback* e pelas demais interações entre as células epiteliais mesenquimais que se localizam entre a AER (expressando *FGFs*) e as células epiteliais mesenquimais localizadas na região posterior e distal, que expressam o *GREMLIN1*, conhecido como *GREMI* (Gilbert., 2003). O gene

GREMI é ativado paralelamente à expressão de *SHH* e *BMP*, permitindo a sinalização por meio de *feedback* (Zeller e Zuniga., 2007).

Alguns estudos recentes mostram que a perda de função por mutações em *SHH* e *GREMI* podem perturbar o estabelecimento do eixo antero-posterior, ocasionando perturbações no desenvolvimento de membros (Zeller e Zuniga., 2007). Nesse trabalho, há a criação de um camundongo *knockout* para o gene *Grem1* que apresenta algumas malformações dos membros como perda de dígitos, sindactilia e até fusão da ulna com o rádio. Por outro lado, a sinalização ectópica de *SHH* é uma importante causa de formação extra de dígitos na região anterior (polidactilia preaxial). Portanto, conclui-se que a regulação dinâmica da expressão dos genes *SHH* e *GREMI* é um fator importante na formação normal dos membros em desenvolvimento (Zeller e Zuniga.,2007).

Zhou e col., 2009 também estudaram camundongos *knockout* para o gene *GREMI*, sequência regulatória de *FORMINI* e para o gene *FORMINI* e pode observar fenótipos onde os camundongos apresentavam uma redução do número de dígitos para quatro, um metatarso posterior deformado, fusão de tecidos moles das falanges e ausência da fíbula. Em 2009, Bénazet confirmaram o mesmo fenótipo observado por Zeller e Zuniga., 2007 em camundongos *knockout* em relação ao gene *GREMI*. Deformidades nos membros do camundongo como redução de dígitos, sindactilia, sinostose rádio-ulnar, defeitos renais variáveis e fíbula ausente são causadas pela perda de função de *GREMI* (Ivanov e col., 2010). Além disso, uma super expressão de *GREMI* no desenvolvimento de membros em galinhas reprime a morte celular programada do mesênquima interdigital, resultando em membranas interdigitais (Ivanov e col., 2010). Recentemente identificaram-se rearranjos cromossômicos abrangendo o *GREMI* em humanos, levando a defeitos de membros. Ivanov e col., (2010) localizaram

uma duplicação de 1,7Mb incluindo o gene *GREM1* em pacientes com oligosindactilia nas mãos.

1.7. Estratégias de mapeamento de doenças genéticas.

O mapeamento de genes responsáveis por doenças humanas tem sido realizado por meio de duas estratégias principais. A primeira delas é por meio do estabelecimento de correlações entre alterações cromossômicas e fenótipos anormais (doenças). A segunda delas compreende os estudos de ligação em grandes famílias com vários indivíduos afetados por uma doença, seguidos de sequenciamento de genes mapeados nas regiões candidatas.

As alterações cromossômicas associadas a fenótipos anormais sugere que os pontos de quebra nos cromossomos, a duplicação ou a deleção de certos segmentos do cromossomo possam estar relacionados ao fenótipo, interferindo na expressão de um ou mais genes. Essas alterações podem interferir na expressão de alguns genes por interromper suas regiões codificadoras, por mudar as posições dos genes, por separá-los de seus promotores ou de outros elementos regulatórios ou por colocá-los em regiões onde sua expressão seria inibida ou diminuída. Normalmente as anomalias cromossômicas estão relacionadas a várias alterações fenotípicas, caracterizando uma síndrome, já que costumam influenciar a expressão de vários genes simultaneamente. Como foi mostrado anteriormente, as alterações cromossômicas foram uma das estratégias que permitiram a identificação de genes associados à ectrodactilia síndrômica, ectrodactilia não-sindrômica e outros genes de defeitos de membros.

Os estudos de ligação baseiam-se no conceito de ligação genética, que consiste na tendência de alelos de dois locos distintos, mas localizados muito próximos numa mesma região cromossômica, serem transmitidos em conjunto como uma só unidade na

meiose. Dessa forma, os estudos de ligação realizados em grandes famílias com indivíduos afetados visam analisar a co-segregação de dois locos nas genealogias. Esses locos podem ser tanto os genes responsáveis por determinadas características fenotípicas quanto marcadores genéticos.

Marcadores genéticos são considerados quaisquer sequências proteicas ou de DNA polimórficas, em uma localização cromossômica conhecida. Em geral, são utilizados para se estudar a transmissão de um segmento cromossômico de uma geração para a outra em uma genealogia e compará-la com o padrão de transmissão de uma doença. Desse modo, pode-se definir uma região cromossômica candidata a conter o gene responsável pela doença (Evans e Cardon., 2004). Um marcador genético para ser informativo precisa se apresentar em alta frequência de heterozigose na população, ou seja, deve haver uma grande probabilidade de que uma pessoa selecionada aleatoriamente na população seja heterozigótica em relação a ele. Os microssatélites são um dos tipos de marcadores mais utilizados nos estudos de ligação devido ao fato de apresentarem muitos alelos diferentes e, em geral, apresentarem-se na população em alta taxa de heterozigose (Evans e Cardon., 2004). Os microssatélites são sequências de DNA repetitivas constituídas por unidades de repetição em tandem e essa unidade de repetição não apresenta, em geral, mais que 10pb (Kruglyak e Lander 1995). O número de unidades de repetição em cada loco de microssatélite varia de indivíduo para indivíduo, caracterizando polimorfismos na população.

Outro tipo de marcador muito utilizado atualmente em estudos de mapeamento são os polimorfismos de nucleotídeo único. Os polimorfismos de base única (SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms) são a forma mais frequente de variação na sequência de DNA encontrada no genoma humano e podem ser definidos como regiões pontuais do DNA, onde o nucleotídeo seja variável na população. Como os SNPs possuem, mais

frequentemente, apenas dois alelos, sua genotipagem pode ser facilmente automatizada (Kruglyak., 1997). Atualmente existem métodos fáceis e rápidos para se genotipar cerca de até 1.800.0000 SNPs de uma única vez por meio de *arrays* de oligonucleotídeos de alta densidade. Kruglyak (1997) realizou uma análise comparando o uso de microssatélites e SNPs em estudos de ligação e concluiu que os SNPs, mesmo sendo menos polimórficos, são muito mais informativos devido a grande quantidade existente no genoma (mais de 3 milhões segundo <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Apesar dos SNPs possuírem uma capacidade de extração de informações inferior a dos microssatélites considerando-se cada SNP individualmente, por estarem presentes no genoma em enorme quantidade (mais de 1 a cada 1000 pares de bases) oferecem uma ferramenta mais eficiente para varreduras de genômicas iniciais (Kruglyak e col.,1997).

Os estudos de ligação, seja por meio do uso de microssatélites, ou de marcadores bialélicos, são considerados uma estratégia muito eficiente quando são disponíveis grandes famílias com vários indivíduos afetados pela mesma doença. Esses fatos, aliados à disponibilidade de três famílias com vários indivíduos afetados por diferentes tipos de defeitos de membros, motivaram o estudo molecular e o mapeamento dos genes responsáveis por tais condições.

2. Conclusão

Estudamos três famílias com indivíduos afetados por diferentes malformações de membros com o objetivo de mapear novos locos e identificar novas mutações relacionadas a defeitos de membros em famílias brasileiras. Apresentamos as principais conclusões em cada família.

2.1. Família 1

A família 1 apresenta nove indivíduos afetados pela síndrome da hemimelia tibial associada à ectrodactilia de herança autossômica dominante (e penetrância reduzida) e seis portadores certos do gene mutado.

A estratégia inicial foi o sequenciamento dos exons de genes localizados na região cromossômica candidata 17p13.1-p13.3. Foram sequenciados todos os exons de seis genes contidos na região (*RPA1*, *YWHAE*, *CRK*, *SERPINF1*, *RTN4RL1* e *TUSC5*) e nenhuma mutação patogênica foi encontrada. Participamos de uma pesquisa em colaboração com o grupo do Dr. Mundlos (Berlin-Alemanha) que possuía mais três famílias com o mesmo fenótipo e com ligação com a mesma região do cromossomo 17. Esse grupo detectou duplicações nessa região cromossômica. A fim de procurar mutações semelhantes às encontradas pelo grupo alemão, executou-se o PCR quantitativo com alguns *primers* da região 17p13.3. Desse modo, foi possível identificar uma duplicação de 114Kb em todos os indivíduos afetados e portadores certos da doença em questão. A duplicação encontra-se em tandem, inserida diretamente e na mesma orientação da sequência original. Essa duplicação interrompe o intron 4-5 do gene *YWHAE* que, portanto, está parcialmente duplicado. O gene *YWHAE* é responsável

pela codificação de uma proteína que interage e regula negativamente a expressão do gene *SHH*, previamente associado a malformações de membros e pode estar relacionado ao fenótipo da doença em questão. A duplicação também inclui outros dois genes: *BHLHA9* e *TUSC5*. O gene *BHLHA9* e o gene *TUSC5* estão presentes em três cópias. O gene *TUSC5* já foi associado a microdeleções e microduplicações envolvendo outros genes do cromossomo 17, como o *YWHAE* e o *CRK*, mas nunca foi associado a fenótipos de malformações de membros. Já o *BHLHA9* é o melhor gene candidato como possível responsável pelos defeitos de membros, já que é expresso durante a formação dos membros na crista ectodérmica apical (AER).

2.2.Família 2

A família 2 é constituída de seis indivíduos afetados por uma síndrome aparentemente nova caracterizada por: aplasia/hipoplasia fibular, ectrodactilia, anoníquia/hipoplasia ungueal, entre outros defeitos.

Nessa família realizaram-se estudos preliminares de ligação com microssatélites que permitiriam excluir a ligação com algumas regiões cromossômicas já conhecidas associadas a malformações de membros. O estudo de mapeamento teve início com marcadores próximos a locos já mapeados de ectrodactilia, hemimelia tibial, agenesia de fíbula e outros defeitos de membros e, como essas regiões foram excluídas, a varredura genômica foi executada.

O cálculo de *lod score* de múltiplos pontos mostrou alguns resultados sugestivos de ligação com as regiões cromossômicas 5p15.33, 6p25.3, 10p15.3 e 11p15.5 e 13q12.11. Utilizando microssatélites mapeados nessas regiões realizaram-se estudos de ligação com microssatélites que permitiriam excluir ou confirmar a ligação. Por fim,

apenas as regiões 5p15.33 e 11p15.5 mostraram lods scores positivos e com valores próximos ao *lod score* máximo calculado para essa família, indicando possível ligação.

Por fim, sequenciaram-se também alguns genes que já foram descritos e estão relacionados a malformações de membros a fim de identificar possíveis mutações (*SHH*, *ZRS*, *WNT7a*, *WNT10b* e *GREM1*). Todos os exons foram sequenciados e não foi encontrada nenhuma mutação. Refinamentos dos estudos de ligação nos cromossomos 5 e 11 seriam indicados para prosseguir com o estudo da família.

2.3.Família 3

A família é composta por três indivíduos afetados por um quadro variável de defeitos de membros entre eles polissindactilia, sindactilia, camptodactilia e defeitos ungueais.

Nessa família também realizaram-se estudos preliminares de ligação com microssatélites que permitiriam excluir a ligação com algumas regiões cromossômicas já conhecidas associadas a malformações de membros. O estudo de mapeamento teve início com marcadores próximos a locos já mapeados de ectrodactilia, hemimelia tibial, agenesia de fíbula e outros defeitos de membros e como essas regiões foram excluídas, a varredura genômica foi executada.

O cálculo de *lod score* de múltiplos pontos atingiu valores positivos nos estudos de ligação com os cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18. Nesses casos, não se pode excluir completamente a ligação, já que os *lod scores* positivos se mostraram muito próximos ao *lod* máximo calculado para a família. Como a família é pequena, há somente duas gerações com indivíduos afetados, é esperado que mãe e filhos compartilhem várias regiões cromossômicas e que se encontre *lod scores* alto em vários cromossomos. Com base nessa conclusão, seria necessário utilizar

microsatélites nas regiões que apresentaram *lod scores* próximos ao lod máximo a fim de eliminar ou confirmar essas possíveis ligações em vários dos cromossomos estudados.

Foi realizado nessa família também o sequenciamento dos oito exons do gene *YWHAE*, encontrado alterado na família 1 e considerado como uma possível causa do fenótipo. Entretanto, nenhuma mutação foi encontrada. Por fim, também sequenciaram-se os genes que já foram descritos e estão relacionados a malformações de membros a fim de identificar possíveis mutações (*SHH*, *ZRS*, *WNT7a*, *WNT10b* e *GREM 1*). Todos os exons foram sequenciados e não foi encontrada nenhuma mutação.

3. Referências Bibliográficas

Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002). Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30:97-101.

Albuisson J, Isidor B, Giraud M, Pichon O, Marsaud T, David A, Le Caignec C, Bezieau S (2010). Identification of two novel mutations in *Shh* long-range regulator associated with familial pre-axial polydactyly. *Clinical Genetics in press*.

Adamska M, Billi AC, Cheek S, Meisler MH (2010). Genetic Interaction Between *Wnt7a* and *Lrp6* During Patterning of Dorsal and Posterior Structures of the Mouse Limb. *Developmental Biology* 342 (2010) 169–179.

Al-Qattan MM, Al-Balwi M, Eyaid W, Al-Abdulkarim I, Al-Turki S (2009). Congenital duplication of the palm syndrome: gene analysis and the molecular basis of its clinical features. *J Hand Surg Eur Vol.* 34(2):247-51.

Blattner A, Huber AR, Röthlisberger B (2010). Homozygous nonsense mutation in *WNT10B* and sporadic split-hand/foot malformation (SHFM) with autosomal recessive inheritance. *Am J Med Genet A.* 152A(8):2053-6.

Bénazet JD, Bischofberger M, Tiecke, Gonçalves A, Martin JF, Zuniga A, Naef F, Zeller R (2009). A Self-Regulatory System of Interlinked Signaling Feedback Loops Controls Mouse Limb Patterning. *Science.* 323.

Borozdin, W., Bravo-Ferrer Acosta, A. M., Seemanova, E., Leipoldt, M., Bamshad, M. J., Unger, S., Kohlhase, J (2006). Contiguous hemizygous deletion of *TBX5*, *TBX3*, and *RBM19* resulting in a combined phenotype of Holt-Oram and ulnar-mammary syndromes. *Am. J. Med. Genet.* 140A: 1880-1886.

Bouldin CM, Gritli-Linde A, Ahn S, Harfe BD (2010) *Shh* pathway activation is present and required within the vertebrate limb bud apical ectodermal ridge for normal autopod patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(12):5489-94.

Bruno DL, Anderlid BM, Lindstrand A, van Ravenswaaij-Arts C, Ganesamoorthy D, Lundin J, Martin CL, Douglas J, Nowak C, Adam MP, Kooy RF, Van der Aa N, Reyniers E, Vandeweyer G, Stolte-Dijkstra I, Dijkhuizen T, Yeung A, Delatycki M, Borgström B, Thelin L, Cardoso C, van Bon B, Pfundt R, de Vries BB, Wallin A, Amor DJ, James PA, Slater HR, Schoumans J (2010). Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet.* 47(5):299-311.

Cottingham RW Jr, Idury RM, Schaffer AA (1993). Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet* 53(1): 252-63.

Courtens W, Jespers A, Harrewijn I, Puylaert D, Vanhoenacker F (2005) Fibular aplasia, tibial campomelia, and oligosyndactyly in a male newborn infant: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet* 134(3): 321-5.

Crackower MA, Scherer SW, Rommens JM, Hui CC, Poorkaj P, Soder S, Cobben JM, Hudgins L, Evans JP, Tsui LC. (1996). Fine mapping of the autosomal dominant split hand/split foot locus on chromosome 7, band q21.3-q22.1. *Am J Hum Genet* 55: 12-20.

de Mollerat XJ, Gurrieri F, Morgan CT, Sangiorgi E, Everman DB, Gaspari P, Amiel J, Bamshad MJ, Lyle R, Blouin JL, Allanson JE, Le Marec B, Wilson M, Braverman NE, Radhakrishna U, Delozier-Blanchet C, Abbott A, Elghouzzi V, Antonarakis S, Stevenson RE, Munnich A, Neri G, Schwartz CE (2003). A genomic rearrangement resulting in a tandem duplication is associated with split hand-split foot malformation 3 (SHFM3) at 10q24. *Hum Mol Genet.* 12(16):1959-71.

Douzgou, S., Lehmann, K., Mingarelli, R., Mundlos, S., Dallapiccola, B (2008). Compound heterozygosity for GDF5 in Du Pan type chondrodysplasia. *Am. J. Med. Genet.* 146A: 2116-2121,

Duijf PH, Van Bokhoven H, Brunner HG (2003). Pathogenesis of split-hand/split-foot malformation. *Hum Mol Genet* 12(Suppl 1):R51-60.

Evans DM, Cardon LR (2004). Guidelines for genotyping in genomewide linkage studies: single-nucleotide-polymorphism maps versus microsatellite maps. *Am J Hum Genet.* 75(4):687-92.

Everman DB, Morgan CT, Lyle R, Laughridge ME, Bamshad MJ, Clarkson KB, Colby R, Gurrieri F, Innes AM, Roberson J, Schrandt-Stumpel C, van Bokhoven H, Antonarakis SE, Schwartz CE (2006). Frequency of genomic rearrangements involving the SHFM3 locus at chromosome 10q24 in syndromic and non-syndromic split-hand/foot malformation. *Am J Med Genet A.* 140(13):1375-83.

Ensembl- URL: <http://www.ensembl.org/>. Acesso em 03 de Agosto de 2010.

Farooq M, Troelsen JT, Boyd M, Eiberg H, Hansen L, Hussain MS, Rehman S, Azhar A, Ali A, Bakhtiar SM, Tommerup N, Baig SM, Kjaer KW (2010). Preaxial polydactyly/triphalangeal thumb is associated with changed transcription factor-binding affinity in a family with a novel point mutation in the long-range cis-regulatory element ZRS. *Eur J Hum Genet.* 18(6):733-6.

Fernandez-Palazzi F, Bendahan J, Rivas S (1998). Congenital deficiency of the tibia: a report on 22 cases. *J Pediatr Orthop B* 7(4):298-302. Review.

Furniss D, Kan SH, Taylor IB, Johnson D, Critchley PS, Giele HP, Wilkie AO (2009). Genetic screening of 202 individuals with congenital limb malformations and requiring reconstructive surgery. *Journal of Medical Genetics* 46(11):730-5.

Galli A, Robay D, Osterwalder M, Bao X, Bénazet JD, Tariq M, Paro R, Mackem S, Zeller R (2010). Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genet.* 6(4):e1000901.

GenBank/NCBI – URL: [http:// www.ncbi.nih.gov/](http://www.ncbi.nih.gov/) Acesso em 03 de Agosto de 2010.

GeneAtlas – URL: [http:// www.geneatlas.org](http://www.geneatlas.org) .Acesso em 03 de Agosto de 2010.

Genome Browser (UCSC) – URL: [http:// www.genome.ucsc.edu/](http://www.genome.ucsc.edu/). Acesso em 03 de Agosto de 2010.

Gilbert SF (2003). *Developmental Biology*. 17ª edição - Editora Sinauer., USA.

Gurnett CA, Bowcock AM, Dietz FR, Morcuende JA, Murray JC, Dobbs MB (2007). Two novel point mutations in the long-range SHH enhancer in three families with triphalangeal thumb and preaxial polydactyly. *Am J Med Genet A*. 143(1):27-32.

Gurrieri F, Prinos P, Tackels D, Kilpatrick MW, Allanson J, Genuardi M, Vuckov A, Nanni L, Sangiorgi E, Garofalo G, Nunes ME, Neri G, Schwartz C, Tsipouras P. (1996) A split hand-split foot (SHFM3) gene is located at 10q24q25. *Am J Med Genet* 62:427-436.

HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC-08/2003), Department of Biology, University College London, Wolfson House, 4 Stephenson Way, London NW1 2HE, UK (URL:<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>).

Hill RE, Heaney SJH, Lettice LA (2003). Sonic hedgehog: restricted expression and limb dysmorphologies. *Journal of Anatomy* 202:13-20.

Ivanov BD, Voet T, Smet LD, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns JP, Debeer P (2010). Genomic rearrangements of the GREM1-FMN1 locus cause oligosyndactyly, radio-ulnar synostosis, hearing loss, renal defects syndrome and CenanieLenz-like non-syndromic oligosyndactyly. *J Med Genet* 47: 569-574.

Kano H, Kurosawa K, Horii E, Ikegawa S, Yoshikawa H, Kurahashi H, Toda T. (2005) Genomic rearrangement at 10q24 in non-syndromic split-hand/split-foot malformation. *Hum Genet* 118(3-4):477-83.

Kimura, L. (2010) Fatores genéticos associados à hipertensão em populações afro-brasileira. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Doutor em Ciências na área de Biologia/Genética. São Paulo, SP.

Koide H, Shibata T, Yamada N, Asaki T, Nagao T, Yoshida T, Noguchi Y, Tanaka T, Saito Y, Tatsuno I (2007). Tumor suppressor candidate 5 (TUSC5) is expressed in brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 17;360(1):139-45.

Kruglyak L (1997). The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature Genetics* 17:21-24.

Kruglyak L, Lander ES (1995) Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 57:439-454

Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1985) Multilocus linkage analysis in humans. Detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet* 37: 482-498.

Lettice LA, Heaney SJH, Purdie LA, Li L, Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, 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).

Lewin SO, Opitz JM.(1986) Fibular a/hypoplasia: review and documentation of the fibular developmental field. *Am J Med Genet Suppl* 2: 215-38. Review.

Lezirovitz K (2007) Mapeamento de genes em doenças geneticamente heterogêneas: Surdez e Hemimelia Tibial associada à Ectrodactilia. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Doutor em Ciências na área de Biologia/Genética. São Paulo, SP.

Lezirovitz K., Maestrelli S. R.P., Cotrim N.H., Horimoto A.R.V.R., Otto P.A, Pearson P.L., Mingroni-Netto R.C (2008) A novel locus for ectrodactyly associated

with tibial hemimelia (SHFLD) maps to chromosome region 17p13.1-17p13.3. *Am J Hum Genet* 123:625-31.

Li H, Wang CY, Wang JX, Wu GS, Yu P, Yan XY, Chen YG, Zhao LH, Zhang YP (2009). Mutation analysis of a large Chinese pedigree with congenital preaxial polydactyly. *Eur J Hum Genet.* 17(5):604-10.

Lin JM, Wan L, Tsai YY, Lin HJ, Tsai Y, Lee CC, Tsai CH, Tseng SH, Tsai FJ.(2007) Pigment epithelium-derived factor gene Met72Thr polymorphism is associated with increased risk of wet age-related macular degeneration. *America Journal of Ophthalmology* 145:716-721.

Lindblad-Toh K, Tanenbaum DM, Daly MJ, Winchester E, Lui WO, Villapakkam A, Stanton SE, Larsson C, Hudson TJ, Johnson BE, Lander ES, Meyerson M (2000). Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol.* 18(9):1001-5.

Marshfield comprehensive human genetics maps (2003). World Wide Web URL: <http://research.marshfieldclinic.org/genetics>. Acesso em 03 de Agosto de 2010.

Masashi I, Takao H, Shinichiro T, Junko Uruguchi-Asaki, Kazuhito T, Anthony Wynshaw-Boris, Hiroshi U, Toshiya I, Keizo T, Tsuyoshi M, Norio O, Kozo K, Nakao I (2008). Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, 17(20).

Matsuyama J, Mabuchi A, Zhang J, Iida A, Ikeda T, Kimizuka M, Ikegawa S (2003). A pair of sibs with tibial hemimelia born to phenotypically normal parents. *J Hum Genet.* 48(4):173-6.

MGI. Mouse Genome Informatics. URL : <http://www.informatics.jax.org/>. Acesso em 01 de Julho de 2009.

Mignon-Ravix C, Cacciagli P, El-Waly B, Moncla A, Milh M, Girard N, Chabrol B, Philip N, Villard L (2010). Deletion of YWHAE in a patient with

periventricular heterotopias and pronounced corpus callosum hypoplasia. *J Med Genet.*47(2):132-6.

Nagamani SC, Zhang F, Shchelochkov OA, Bi W, Ou Z, Scaglia F, Probst FJ, Shinawi M, Eng C, Hunter JV, Sparagana S, Lagoe E, Fong CT, Pearson M, Docofenzy M, Landais E, Mozelle M, Chinault AC, Patel A, Bacino CA, Sahoo T, Kang SH, Cheung SW, Lupski JR, Stankiewicz P (2010). Microdeletions including YWHAЕ in the Miller-Dieker syndrome region on chromosome 17p13.3 result in facial dysmorphisms, growth restriction, and cognitive impairment. *J Med Genet.* 46(12):825-33.

Naveed M, Nath SK, Gaines M, Al-Ali MT, Al-Khaja N, Hutchings D, Golla J, Deutsch S, Bottani A, Antonarakis SE, Ratnamala U, Radhakrishna U (2007). Genomewide linkage scan for split-hand/foot malformation with long-bone deficiency in a large Arab family identifies two novel susceptibility loci on chromosomes 1q42.2-q43 and 6q14.1. *Am J Hum Genet* 80(1):105-11.

NCBI-National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine – U.S. Government. World Wide Web URL: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Acesso em 03 de Agosto de 2010.

Nelson e Holmes, 1980 *apud* Nunes ME, Schutt G, Kapur RP, Luthardt F, Kukolich M, Byers P, Evans JP (1995). A second autosomal split hand/split foot locus maps to chromosome 10q24-q25. *Hum Mol Genet.* 4(11):2165-70.

Niswander L (2003). Pattern Formation: Old Models Out on a Limb. *Nat Rev Genet* 4(2): 133-143.

Nunes ME, Schutt G, Kapur RP, Luthardt F, Kukolich M, Byers P, Evans JP (1995). A second autosomal split hand/split foot locus maps to chromosome 10q24-q25. *Hum Mol Genet.* 4(11):2165-70.

OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Acesso em 01 de Julho de 2009.

Oort PJ, Knotts TA, Grino M, Naour N, Bastard JP, Clément K, Ninkina N, Buchman VL, Permana PA, Luo X, Pan G, Dunn TN, Adams SH (2009). Gamma-synuclein is an adipocyte-neuron gene coordinately expressed with leptin and increased in human obesity. *PPAR Res.* Mar 1. PMID: 20204174

Oort PJ, Warden CH, Baumann TK, Knotts TA, Adams SH (2008). Characterization of Tusc5, an adipocyte gene co-expressed in peripheral neurons. *J Nutr.* May;138(5):841-8.

Parr BA, McMahon AP (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374(6520):350-353.

PosMed™ – URL: <http://omicspace.riken.jp/PosMed/search#result>. Acesso em 03 de Agosto de 2010.

Richieri-Costa A, Ferrareto I, Masiero D, da Silva CRM (1987A). Tibial Hemimelia: Report on 37 New Cases, Clinical and Genetics Considerations. *Am J Med Genet* 27(4): 867-884.

Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365–386.

Santos SC, Pardono E, Ferreira da Costa MI, de Melo AN, Graciani Z, de Albuquerque e Souza AC, Lezirovitz K, Thiele-Aguiar RS, Mingroni-Netto RC, Opitz JM, Kok F, Otto PA. (2008). A previously undescribed syndrome combining fibular agenesis/hypoplasia, oligodactylous clubfeet, anonychia/ungual hypoplasia, and other defects. *Am J Med Genet A.* 146A(24):3126-31.

Sato D, Liang D, Wu L, Pan Q, Xia K, Dai H, Wang H, Nishimura G, Yoshiura K, Xia J, Niikawa N (2007). A syndactyly type IV locus maps to 7q36. *J Hum Genet.* 52(6):561-4.

Semerci CN, Demirkan F, Ozdemir M, Biskin E, Akin B, Bagci H, Akarsu NA (2009). Homozygous feature of isolated triphalangeal thumb-preaxial polydactyly

linked to 7q36: no phenotypic difference between homozygotes and heterozygotes. *Clin Genet.* 76(1):85-90.

Shibata T, Koide H, Hayashi R, Nagata K, Takeo C, Yoshida T, Noguchi Y, Tanaka T, Saito Y, Tatsuno I (2007). Molecular cloning and characterization of rat brain endothelial cell derived gene-1 (tumor suppressor candidate 5) expressing abundantly in adipose tissues. *Mol Cell Endocrinol.* Jan 15;263(1-2):38-45.

Stanitski DF, Stanitski CL (2003) Fibular hemimelia: a new classification system. *J Pediatr Orthop* 23(1): 30-4.

Stevens JD, Roalson EH, Skinner MK (2008). Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation.* Nov;76(9):1006-22

Sun M, Ma F, Zeng X, Liu Q, Zhao XL, Wu FX, Wu GP, Zhang ZF, Gu B, Zhao YF, Tian SH, Lin B, Kong XY, Zhang XL, Yang W, Lo WH, Zhang X (2008). Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome and syndactyly type IV are caused by genomic duplications involving the long range, limb-specific SHH enhancer. *J Med Genet.* 45(9):589-95.

Tentamy e McKusick, 1978 *apud* Nunes ME, Schutt G, Kapur RP, Luthardt F, Kukulich M, Byers P, Evans JP (1995). A second autosomal split hand/split foot locus maps to chromosome 10q24-q25. *Hum Mol Genet.* 4(11):2165-70.

Ugur SA, Tolun A (2008). Homozygous WNT10b mutation and complex inheritance in Split-Hand/Foot Malformation. *Hum Mol Genet.* 17(17):2644-53.

Uniscience - Affymetrix GeneChip Mapping 100K Assay Manual URL: <http://www.uniscience.com.br/.../1035-human-mapping-10k-20-array>.

Wieczorek D, Pawlik B, Li Y, Akarsu NA, Caliebe A, May KJ, Schweiger B, Vargas FR, Balci S, Gillessen-Kaesbach G, Wollnik B (2010). A specific mutation in

the distant sonic hedgehog (SHH) cis-regulator (ZRS) causes Werner mesomelic syndrome (WMS) while complete ZRS duplications underlie Haas type polysyndactyly and preaxial polydactyly (PPD) with or without triphalangeal thumb. *Hum Mutat.* 31(1):81-9.

Witte F, Dokas J, Neuendorf F, Mundlos S, Stricker S (2009). Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr Patterns.* 9(4):215-23.

Woods C G, Stricker S, Seemann P, Stern R, Cox J, Sherridan E, Roberts E, Springell K, Scott S, Karbani G, Sharif SM, Toomes C, Bond J, Kumar D, Al-Gazali L, Mundlos S (2006). Mutations in WNT7A cause a range of limb malformations, including Fuhrmann syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 79: 402-408.

Wu L, Liang D, Niikawa N, Ma F, Sun M, Pan Q, Long Z, Zhou Z, Yoshiura K, Wang H, Sato D, Nishimura G, Dai H, Zhang X, Xia J (2009). A ZRS duplication causes syndactyly type IV with tibial hypoplasia. *Am J Med Genet A.* 149A(4):816-8.

Yoshinari A, Fumihiko K, Tohru I, Keisuke T, Yasuo T, Miki O, Motoko S, Motohisa T, Hideaki I, Tsuneo I, Takao K, Toshiaki I, Michael BY, Masao O (2010). Identification of a Suppressive Mechanism for Hedgehog Signaling through a Novel Interaction of Gli with 14-3-3. *The Journal of Biological Chemistry* 285(6): 4185–4194.

Zeller R, Zuniga A (2007). Shh and Gremlin1 chromosomal landscapes in development and disease. *Genetics & Development* 17:428–434.

Zhou F, Leder P, Zuniga I, Dettenhofer M (2009). Formin1 disruption confers oligodactyly and alters Bmp signaling. *Human Molecular Genetics.* 18:(13) 2472–2482.

Zlotogora J (1994). On the inheritance of the split hand/split foot malformation. *Am J Med Genet.* 53(1):29-32. Review.

