

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**DEFEITOS DE REDUÇÃO DE MEMBROS: DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS E
ANÁLISE DE VARIANTES NOS GENES *ESCO2*, *SALL4* E *TBX5***

LAYSA KARINY KRIECK

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Prof. Dra. Lavinia Schüler-Faccini – Orientadora
Prof. Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino – Coorientadora

PORTO ALEGRE

MARÇO/2020

Esse trabalho é parte do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP) e foi realizado no Laboratório de Genética Médica e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

AGRADECIMENTOS

Imensa gratidão à minha orientadora Lavínia, pelo seu acolhimento desde o primeiro contato, pela confiança em mim, e pelo seu inconfundível bom humor – sempre nos recebendo com “oba”, “viva” e “iupi”. Tu és um ser humano iluminado, que nos traz muito profissionalismo com grande leveza!

À minha coorientadora Maria Teresa, pelas importantes reuniões e discussões clínicas e, assim como a Prof^a. Lavínia, por sempre transmitir compreensão e leveza. Você e a Lavínia são a minha dupla de luz!

À Fernanda Vianna, que foi fundamental na elaboração desse projeto com seu conhecimento em DRM e aspectos éticos.

À Julia e à Thayne, que desenvolveram esse projeto junto a mim. Esse projeto não teria saído do papel sem vocês.

Aos participantes/pacientes deste projeto, peças fundamentais nessa pesquisa.

Ao apoio financeiro do CNPq, INaGeMP e FIPE-HCPA.

A todos da família Lab 113, pelos brindes e momentos, e pela ajuda com este projeto - em especial Luiza, Eduarda e Mari.

À Malu, por ter dividido comigo a experiência da prática didática, e que desde então se tornou uma querida amiga que atravessa comigo às delícias e as dores da pós-graduação.

Ao PPGBM pela excelência de ensino em meio a um espírito de fraternidade. Aos professores do programa pelos ensinamentos e trocas que diminuem a nossa ansiedade. Ao Elmo por ser sempre tão prestativo e competente na coordenação do programa.

À Porto alegre, pelos seus parques e pores do sol energizantes, e que mesmo em meio a insegurança, tem sido um lar temporário maravilhoso. A todos que em POA me acolheram.

Ao Tênis de Mesa, por aqui em POA entrar em minha vida e se tornar um importante escape para a ansiedade do dia a dia, e por me proporcionar novas amizades. Destas amizades, agradeço ao Matheus pela parceria e momentos compartilhados; ao amigo e técnico Gustavo, por sua solicitude e por compartilhar

seus conhecimentos desse adorável esporte; e principalmente, agradeço à Luana e à Raeli por formarem comigo a família Ap. 206, que além da amizade e dos abraços nos momentos de crise, vem sendo uma importante fonte de aprendizagem para mim.

Aos meus amigos catarinenses que sempre estiveram ao meu lado, apesar da minha ausência física: agradeço a Alexandra pela amizade de longa data, pelas longas conversas e desabafos; À Camila, minha irmã de faculdade, pelo estímulo nos momentos de baixa energia; Aos meus amigos, agora também compadres, Laura e Marcel, pela amizade e parceria de anos e por agora nos presentear com a pequena Lívia.

Ao meu companheiro Diogo pela parceria, amor e carinho de quase 9 anos. Por toda ajuda e incentivo nessa “aventura”, que foram essenciais.

Aos meus pais, Vilmar e Gorete, por me proporcionarem a vida e sustento, por terem me ensinado princípios e valores, e sempre terem me incentivado a estudar. À minha avó Lillie, que se tornou minha segunda mãe ao morar comigo durante vários anos, por todo apoio e compreensão.

“Se as conquistas úteis à humanidade vos comovem; se ficais pasmados diante da telegrafia elétrica, da fotografia, da anestesia, e de tantas outras descobertas; se estais orgulhosos e conscientes da parte que cabe ao vosso país na conquista dessas maravilhas, tomai interesse, eu vos conjuro, por esses recintos sagrados que chamamos de laboratórios. Fazeis o possível para que eles se multipliquem. Eles representam os templos do futuro, da riqueza e do bem-estar social. É por intermédio deles que a humanidade melhora e cresce. É neles que o homem aprende a ler os segredos da natureza e da harmonia universal, enquanto as obras do homem são quase sempre obras de barbárie, de fanatismo e de destruição...”

(Marie Curie, 1914)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 DEFEITOS DE REDUÇÃO DE MEMBROS	15
1.2 EMBRIOPATIA POR TALIDOMIDA	18
1.2.1 Histórico da embriopatia por Talidomida	18
1.2.2 Características clínicas e moleculares da TE	21
1.3 SÍNDROME DE ROBERTS E O GENE <i>ESCO2</i>	24
1.4 SÍNDROME DE OKIHIRO E O GENE <i>SALL4</i>	26
1.5 SÍNDROME DE HOLT-ORAM E O GENE <i>TBX5</i>	28
1.6 SÍNDROME DE TROMBOCITOPENIA E AUSÊNCIA DE RÁDIO (TAR).....	31
1.7 OUTRAS SÍNDROMES MALFORMATIVAS	32
1.8 JUSTIFICATIVA	34
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 ARTIGO 1: Embriopatia por Talidomida e seus diagnósticos diferenciais: uma análise fenotípica.....	36
4 ARTIGO 2: Limbs reduction defects: a case series with a novel deletion in <i>ESCO2</i>	69
5 DISCUSSÃO	109
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	113
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
APÊNDICE A – CLASSIFICAÇÃO DOS DEFEITOS DE REDUÇÃO DE MEMBROS PROPOSTA POR GOLD <i>ET AL.</i> (2011).....	121
APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE TRIAGEM (FORMATO RASCUNHO).....	123
APÊNDICE C – TCLE PARA ADULTOS.....	127
APÊNDICE D – TCLE PARA RESPONSÁVEIS.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA** aminoácidos
- ABPST** Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida
- ABraOM** Arquivo Brasileiro Online de Variantes patogênicas
- AER** Crista Ectodérmica Apical (*Apical Ectodermal Ridge*)
- ANKRD11** *Ankyrin Repeat Domain 11*
- BGS** Síndrome Baller-Gerold
- BRD4** *Bromodomain Containing 4*
- CAAE** Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CdLS** Síndrome Cornelia de Lange
- CID** Código Internacional de Doenças
- CIV** Comunicação Interventricular
- CNPq** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CRBN** *Cereblon*
- CTNNB1** *Catenin Beta 1*
- CUL4A** *Cullin 4A*
- dbSNP** Banco de dados de Polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism Database*)
- DDB1** *DNA-damage break protein 1*
- DNA** Ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- DRM** Defeitos de redução de membros
- DSA** Defeito do septo atrial
- DSV** Defeito do septo ventricular
- EJC** Complexo de junção de exon (*exon junction complex*)
- ENH** Eritema Nodoso Hansênico
- ENL** *Erythema Nodosum Leprosum*
- ESCO2** *Establishment of sister chromatid cohesion 2*
- ESE** *Exonic Splicing Enhancer*
- ESS** *Exonic Splicing Silencer*
- EUA** Estados Unidos da América
- FA** Anemia de Fanconi

FANCA *Fanconi Anemia Group A Protein*
FANCB *Fanconi Anemia Group B Protein*
FANCR *Fanconi Anemia Group R Protein*
FDA *Food and Drug Administration*
FGF *Fibroblast Growth Factor*
FGF8 *Fibroblast Growth Factor 8*
FGFR *Fibroblast Growth Factor Receptor*
FGFR1 *Fibroblast Growth Factor Receptor 1*
FIPE *Fundo de Incentivo à Pesquisa*
FUNED *Fundação Ezequiel Dias*
genomAD *Genome Aggregation Database*
GHR *Genetics Home Reference*
HCPA *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*
HDAC8 *Histone Deacetylase 8*
HIF1A *Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha*
HOS *Síndrome de Holt-Oram*
HOX *Homeobox*
HPO *Human Phenotype Ontology*
HR *Heterocromatina em repulsão (Heterochromatin Repulsion)*
HSF *Human Splicing Finder*
INaGeMP *Instituto Nacional de Genética Médica Populacional*
LRD *Limb Reduction Defects*
MAGOH *Mago Homolog, Exon Junction Complex Subunit*
miRNA *micro ácido ribonucleico (RiboNucleic Acid)*
mRNA *ácido ribonucleico mensageiro (Messenger Ribonucleic Acid)*
MYF6 *Myogenic Factor 6*
MYOG *Myogenin*
NDM *degradação de mRNA mediada por mutação sem sentido (Nonsense-mediated decay)*
NGS *Sequenciamento de Nova Geração (Next Generation Sequencing)*
NIPBL *Nipped-B-Like Protein*
Nkx2.5 *NK2 Homeobox 5*

NOS3 *Nitric Oxide Synthase 3*

OMIM *Online Mendelian Inheritance in Man*

OMS *Organização Mundial da Saúde*

PCS *Separação Prematura do Centrômero (Premature Centromere Separation)*

PDS5 *PDS5 Cohesin Associated Factor*

PPARD *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta*

RAD21 *Double-Strand-Break Repair Protein Rad21 Homolog*

RARB *Retinoic Acid Receptor Beta*

RBM8A *RNA Binding Motif Protein 8A*

RBS *Síndrome de Roberts*

RECQL4 *RecQ-like Helicase 4*

SA1,2 *Cohesin Subunit SA-1 e Cohesin Subunit SA-2*

SALL1 *Spalt Like Transcription Factor 1*

SALL4 *Spalt Like Transcription Factor 4*

SHH *Sonic hedgehog*

SIFT *Sorting Intolerant From Tolerant*

SMC1A *Structural Maintenance Of Chromosomes 1A*

SMC3 *Structural Maintenance Of Chromosomes 3*

SNFMF *Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e Farmácia*

TAR *Síndrome Trombocitopenia e Ausência de Rádio*

TBR1 *T-Box Brain Transcription Factor 1*

TBX1 *T-Box Transcription Factor 1*

TBX2 *T-Box Transcription Factor 2*

TBX3 *T-Box Transcription Factor 3*

TBX4 *T-Box Transcription Factor 4*

TBX5 *T-Box Transcription Factor 5*

TBX6 *T-Box Transcription Factor 6*

TBXT *T-Box Transcription Factor T*

TCF12 *Transcription Factor 12*

TCLE *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*

TE *Empriopatia por Talidomida*

Ubc9 *Ubiquitin Carrier Protein 9*

UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UTR Região não traduzida 5' ou 3' (*untranslated region*)

VEGFA *Vascular endothelial growth factor A*

WNT7A *Wnt Family Member 7A*

ZPA Zona de atividade polarizada (*Zone of Polarizing Activity*)

RESUMO

A tragédia da talidomida na década de 60 colocou em evidência as malformações do tipo defeitos de redução de membros. Estes podem ser definidos como a ausência ou hipoplasia de osso longos, metacarpais, metatarsais ou falanges. Estes possuem uma variedade de etiologias, desde desordens genéticas até exposição ambiental e causas mecânicas, como ruptura prematura das membranas amnióticas. A embriopatia por Talidomida (TE) é uma síndrome de origem teratogênica cuja característica principal são defeitos de redução de membros, e é fenocópia de outras síndromes genéticas como as Síndromes de Roberts, Holt-Oram e Okihiro, que já foram inclusive confundidas como TE antes da identificação de sua base molecular. Essa similaridade dificulta o diagnóstico diferencial entre essas síndromes e o aconselhamento genético.

Com isso, no primeiro artigo desenvolvido nesse projeto, realizamos uma análise fenotípica comparativa e detalhada das anomalias registradas no banco de dados HPO – *Human Phenotype Ontology* para a Síndrome de Roberts, Holt-Oram, Okihiro e outras com semelhança fenotípica: Anemia de Fanconi, Síndromes acro-renal-ocular, Baller-Gerold, Cornelia de Lange, Rapadilino, SC-Focomelia, TAR – Trombocitopenia e ausência de rádio, Townes-Brocks tipo 1 e associação VACTERL. Em seguida comparamos as anomalias encontradas nessas síndromes com as encontradas na TE e identificamos quais se sobrepõe entre elas e quais são diferenciais. Os resultados principais foram as características encontradas unicamente na TE, especialmente as da cintura escapular, tais como ombro deslocável, hipoplasia do glenóide, ombro pontiagudo devido a projeção da junção acrômio-clavicular.

Em seguida, realizamos a descrição clínica e molecular de uma série de casos de defeitos de redução de membros. Oito pacientes com hipóteses diagnósticas de #OMIM 612447 (1), TAR (3), Acro-renal-ocular (1), monodactilia tetramélica (1), Síndrome de Roberts (1), e um paciente sem hipótese diagnóstica definida, tiveram os genes *ESCO2*, *SALL4*, e *TBX5* causadores da síndrome de Roberts, Okihiro e Holt-Oram, sequenciados através de painel NGS. O único paciente com diagnóstico molecular confirmado tinha síndrome de Roberts, com

uma deleção c.683_696delCGTCACTGGGACGC em homozigose em *ESCO2*. O paciente com hipótese diagnóstica de Acro-renal-ocular (síndrome alélica de Okihiro) ganhou nova hipótese diagnóstica de S. Cornelia de Lange, após nenhuma variante patogênica ser encontrada em *SALL4*. O paciente sem hipótese diagnóstica não teve nenhuma variante patogênica identificada, mas sua impressionante semelhança com TE e local de nascimento com alta distribuição de talidomida, nos levou à considerar que esse caso possa se tratar de um novo caso de TE no Brasil. Entretanto, a ingestão de talidomida pela mãe, não foi confirmada. Ainda nesse caso, identificamos a VUS c.*71_74delTATT em *ESCO2* que possui frequência alélica raríssima na população brasileira, e que já foi anteriormente identificada em pacientes com TE em outra pesquisa do nosso grupo. Com isso, levantamos a hipótese de se tratar de uma variante de suscetibilidade a TE ou defeitos de redução de membros.

Nosso estudo mostra a complexidade de diagnosticar pacientes com defeitos de redução de membros devido à grande similaridade fenotípica e complexidade molecular. Incentivamos novas pesquisas na área a fim de melhorar o diagnóstico diferencial entre essas síndromes, bem como o aconselhamento genético.

ABSTRACT

The thalidomide tragedy in the 1960s highlighted the limb defects as sentinel for environmental teratogens. Limb reduction defects are defined as the absence or hypoplasia of long bones, metacarpal, metatarsal or phalanges. Its etiology ranges from genetic disorders to environmental exposure and mechanical causes, such as premature rupture of the amniotic membranes. Thalidomide Embryopathy (TE)'s main characteristics are limb reduction defects and is a phenocopy of other genetic syndromes such as Roberts, Holt-Oram, and Okihiro which have already been mistakenly diagnosed as TE in the past. This similarity is important for the differential diagnosis and genetic counseling.

Thus, in the first manuscript included in this dissertation, we carried out a comparative and detailed phenotypic analysis of the anomalies recorded in the HPO - Human Phenotype Ontology database for syndromes with overlapping phenotypes with limb reduction defects: Roberts, Holt-Oram, Okihiro, Fanconi anemia, Acro-renal-ocular syndromes, Baller-Gerold, Cornelia de Lange, Rapadilino, SC-Phocomelia, TAR - Thrombocytopenia and absence of radius, Townes-Brocks types 1 and 2 and VACTERL association. Then we compared the anomalies observed in these syndromes with those of TE and looking for overlapping and uniqueness. Characteristics found only in TE, were those of the shoulder girdle, such as displaceable shoulder, glenoid hypoplasia and pointed shoulder due to the projection of the acromioclavicular joint. Therefore, these anomalies are considered important for differential diagnosis of TE.

In the second manuscript, it was performed the clinical and molecular description of a cases series of limb reduction defects: Eight patients with diagnostic hypotheses of #OMIM 612447 (1), TAR (3), Acro-renal-ocular (1), tetramelic monodactyly (1), Roberts Syndrome (1), and one patient with no specific diagnostic hypothesis, had the *ESCO2*, *SALL4*, and *TBX5* (Roberts, Okihiro/ Acro-renal-ocular and Holt-Oram syndromes) sequenced through a NGS panel. The only patient with confirmed molecular diagnosis was a case of Roberts syndrome, with a c.683_696delCGTCACTGGGACGC deletion in homozygosity in *ESCO2*. The patient with a diagnostic hypothesis of Acro-renal-ocular was negative for variants

in *SALL4*, but clinically was reclassified as possible a case of Cornelia-de-Lange syndrome. The patient without a diagnostic hypothesis had no identified pathogenic variant, but its striking similarity to TE and birthplace with a high distribution of thalidomide, led us to consider that this case may be a new case of TE in Brazil, although the mother's intake of thalidomide couldn't be confirmed. Still, in this case, we identified VUS c.*71_*74delTATT in *ESCO2*, which has a very rare allelic frequency in the Brazilian population, and which has been previously identified in patients with TE in another study in our group. With that, we raised the hypothesis that it is a variant of susceptibility to TE or defects in limb reduction.

Our study shows the complexity of diagnosing patients with defects in limb reduction due to the great phenotypic similarity and molecular complexity. We encourage further research in the area in order to improve the differential diagnosis between these syndromes, as well as genetic counseling.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DEFEITOS DE REDUÇÃO DE MEMBROS

Os defeitos de redução de membros (DRM) podem ser definidos como a ausência ou hipoplasia de ossos longos, metacarpianos, metatarsos ou falanges (Gold *et al.*, 2011). Existem várias tentativas de classificação sistemática das anomalias de membros com base em critérios morfológicos, anatômicos, etiológicos, dentre outras, sendo que até o momento nenhuma destas foi totalmente satisfatória. Entretanto, encontrar a classificação mais adequada é importante para entender a etiopatogenia das anomalias e permitir um rastreamento epidemiológico (Stevenson *et al.*, 2016). Além disso, uma classificação e nomenclatura padronizadas permitem fazer comparações de dados coletados mundialmente (Castilla *et al.*, 1995).

Gold *et al.* (2011) propuseram uma classificação baseada na Classificação Internacional de Doenças – CID 9, na sua extensão pela Associação Britânica de Pediatria e na classificação de Golden *et al.* (2003), como forma de obter uma terminologia direta e com ordem clara, tornando a classificação útil para avaliações de prevalência e exposição pré-natal. Os DRM podem ser subdivididos em ausência completa do membro/amelia e ausência parcial: defeito intercalar, defeito transversal terminal, defeito longitudinal pré-axial, defeito longitudinal central, defeito longitudinal pós-axial, e defeito longitudinal pré-axial e pós-axial. Os defeitos intercalares podem ser definidos como uma ausência ou hipoplasia de uma parte média de um osso longo, mas com estruturas distais presentes (focomelia, por exemplo). Defeitos transversos terminais correspondem à ausência total das estruturas distais do membro e ausência de uma parte transversal dele, como por exemplo a parte inferior do antebraço. Já os defeitos longitudinais, são aqueles com ausência ou hipoplasia de um osso paralelo ao eixo longo do membro. Destes, os pré-axiais, correspondem as estruturas no lado medial do membro, tais como rádio/tíbia e polegar/hálux, e segundo e terceiro dedo (desde que rádio/tíbia ou polegar/hálux também estejam ausentes). Os defeitos centrais afetam a porção mais próxima do eixo central, podendo apresentar ausência ou hipoplasia, do

segundo ao quarto dedo. E os pós-axiais afetam o lado lateral do membro, sendo caracterizados pela ausência ou hipoplasia da ulna/fíbula e do quinto dedo, podendo ainda, o terceiro e quarto dedos também estarem ausentes (Gold *et al.*, 2011). Essa classificação pode ser consultada no Apêndice A.

As deficiências de membros ocorrem em 3 a 8 crianças para cada 10.000 nascidos vivos. Os defeitos de membros superiores são mais frequentes que os inferiores e os defeitos unilaterais são mais comuns que os bilaterais (Gold *et al.*, 2011; Stevenson *et al.*, 2016). No Brasil, especificamente os defeitos de redução de membros registrou-se uma prevalência de 1.6 para cada 10.000 nascimentos entre 2005 e 2010, sendo maior nos estados de Pernambuco, Paraná e Rio de Janeiro (Vianna *et al.*, 2015).

Os membros são muito suscetíveis às malformações, rupturas (do termo técnico em inglês *disruptions*) e deformações, devido em parte à complexidade do seu desenvolvimento, do período prolongado da morfogênese, e da exposição dos membros à parede uterina. O seu desenvolvimento normal exige movimentação e espaço intrauterino disponível (Stevenson *et al.*, 2016). McGuirk *et al.* (2001) atribuíram 30% de DRM a causas genéticas, 5% a teratógenos e diabetes materno, 34% a rupturas vasculares e 32% a causas desconhecidas (McGuirk *et al.*, 2001). O desenvolvimento de membros passou a ser considerado sensível aos teratógenos ambientais desde a tragédia da Talidomida na década de 1960, particularmente os DRM (Castilla *et al.*, 1995). A TE é uma fenocópia de outras síndromes genéticas. Logo, causas hereditárias podem ser encontradas para defeitos de membros semelhantes à TE. As síndromes cujas características são semelhantes às da TE incluem Síndromes de Roberts, de Holt-Oram, de Okihiro, Anemia de Fanconi, Síndrome Trombocitopenia e Ausência de Raádio (TAR), Complexo fêmur-fíbula-ulna, entre outras (Lenz, 1988; Smithells and Newman, 1992; Vianna *et al.*, 2011; Mansour *et al.*, 2019).

O desenvolvimento dos membros, incluindo ombro e cintura pélvica, inicia aproximadamente no 28º dia de gestação, quando os brotos dos membros se tornam visíveis no embrião. O desenvolvimento dos membros superiores é iniciado aproximadamente dois dias antes que dos inferiores. Na 6ª semana, as placas de mãos e pés se formam e ocorre morte celular programada nos cinco centros que

formarão os espaços interdigitais. Nas regiões proximais dos membros, surgem os primeiros modelos de cartilagem hialina para os ossos. Na 12^a semana, os centros de ossificação estão presentes (Stevenson *et al.*, 2016).

O desenvolvimento dos brotos dos membros é dividido em campos distintos, determinados por expressão dos genes *HOX* ao longo do eixo craniocaudal, sendo regulado por uma extensa rede de moléculas sinalizadoras, como FGFs, ácido retinóico, fatores de transcrição t-box, SHH, WNT7a, entre outras. A crista ectodérmica apical (AER) regula o brotamento próximo-distal do membro pela secreção de FGFs, mantendo uma região de células altamente proliferativas adjacentes à crista, chamada de Zona Indiferenciada. Conforme os membros crescem, a diferenciação é regulada pela secreção de ácido retinóico: estilópode diferencia úmero e fêmur, em seguida o zeugópode diferencia rádio/ulna e tibia/fíbula, e por fim autópode diferencia punho/dedos e tornozelo/dedos do pé. A zona de atividade polarizada (ZPA), secreta sonic hedgehog (SHH), controlando a diferenciação anteroposterior (do polegar para o dedo mínimo). Os fatores de transcrição TBX5 regulam a especificação dos membros anteriores e TBX4 dos membros posteriores. O padrão dorso-ventral é mediado parcialmente pela expressão específica de WNT7a. Além disso, mecanismos de regulação cis de longo alcance parecem estar implicados na modulação da expressão da morfogênese do membro, incluindo SHH (Sadler, 2016; Stevenson *et al.*, 2016).

Os ossos são formados por ossificação endocondral e as células musculares migram dos somitos, sendo posteriormente invadidas por ramos primários ventrais (Sadler, 2016). McCredie *et al.* (1984) notaram que muitas deficiências de membros tendem a seguir padrões esclerotômicos, ou seja, quando as estruturas esqueléticas afetadas são irrigadas por um único nervo. Assim, a neuropatia de C6 poderia levar à deficiência radial do antebraço e mão, a neuropatia de C7 levaria à defeitos de raio central, como a ectrodactilia e assim sucessivamente. Eles também notaram que os DRM associados à talidomida seguem este padrão esclerotômico, assim como outros casos de DRM (McCredie *et al.*, 1984). A rede vascular funcional também é essencial para o desenvolvimento normal dos membros. Alguns dos genes que regulam a angiogênese são o fator de crescimento endotelial vascular -

VEGFA, o fator 1 induzível por hipóxia alfa - *HIF1A* e a síntese de óxido nítrico 3 - *NOS3* (Browne *et al.*, 2012).

1.2 EMBRIOPATIA POR TALIDOMIDA

1.2.1 Histórico da embriopatia por Talidomida

A embriopatia por Talidomida (TE) consiste em uma série de anomalias congênitas causadas pelo uso de talidomida durante a gravidez (Newman, 1986). Mais de 10.000 casos de TE ocorreram entre 1958 e 1963 nos países onde estava disponível (Lenz, 1988), mas estima-se que o número de afetados pode chegar a 12.000, além de um número desconhecido de abortos (Matthews and McCoy, 2003).

Em 1953 a talidomida (alfa-ftalimido-glutarimida) foi sintetizada pela primeira vez pelo laboratório suíço Ciba (Ministério da Saúde, 2014). No ano seguinte, em abril de 1954, o laboratório alemão Chemie Grünenthal, que se tornou proprietário da patente da talidomida, iniciou ensaios com o objetivo de usá-la como anti-histamínico. Em agosto de 1956 foram impressos folhetos promocionais pela farmacêutica com várias indicações terapêuticas, e alguns meses depois, em novembro de 1956, foi comercializada como um antigripal com a marca registrada Grippex ®. Entretanto, logo foram observadas suas propriedades sedativas e hipnóticas, e então, em outubro de 1957 foi lançada como sedativo com o nome de Contergan ®, anunciado pela empresa Chemie Grünenthal como “inteiramente atóxico” podendo ser consumido sem prescrição médica, pois sua overdose não causava danos maiores que um sono prolongado. Foi também indicado como antiemético e chegou a ser descrito como o melhor medicamento para ser administrado em gestantes e lactantes (Lenz, 1988; Ministério da Saúde, 2014). Em abril de 1958, a fabricante de bebidas alcoólicas Distillers Biochemicals Ltd. também iniciou a comercialização da talidomida como Distaval ® no Reino Unido, sem suporte técnico e fazendo um forte marketing sobre o produto. Além disso, a empresa também distribuiu folhetos aos médicos afirmando que a droga poderia

ser administrada com segurança em gestantes e mães que amamentavam (Smithells and Newman, 1992; Ministério da Saúde, 2014).

A partir de 1959, iniciaram os primeiros relatos médicos sobre o aumento de nascimentos de crianças com malformações nos membros, onde os ossos longos eram ausentes e as mãos ou pés variavam de normais a rudimentares, levando ao nome de focomelia, devido ao encurtamento do membro junto ao tronco se assemelhar à foca (Oliveira *et al.*, 1999). Entretanto, o primeiro caso associado a talidomida foi o de uma menina nascida sem ouvidos em 25 de dezembro 1956, antes mesmo do lançamento do medicamento, em Stolberg, onde se localizava a Chemie Grünenthal. A menina era filha de um funcionário da empresa, que recebeu amostras do novo medicamento para a esposa. Além deste, mais alguns casos foram atribuídos à pré-comercialização da talidomida, mas a epidemia só se tornou evidente cerca de um ano depois (Lenz, 1988; Oliveira *et al.*, 1999).

Em outubro de 1960 na Alemanha, Kosenow e Pfeiffer apresentaram dois casos em uma reunião pediátrica, que seriam os primeiros relatos de uma série de 34 casos apresentados em novembro de 1961 durante um encontro de pediatria na Alemanha. Logo após, Lenz levanta a hipótese de os casos estarem associados a ingestão de talidomida pelas gestantes (citado por Oliveira *et al.*, 1999). Com o aumento do número de casos, a talidomida foi retirada do mercado alemão ainda em novembro de 1961 pela Chemie Grünenthal (Oliveira *et al.*, 1999).

Um mês depois, em 16 de dezembro de 1961, em carta enviada ao editor para a revista *The Lancet*, McBride, na Austrália, informa o aumento significativo do nascimento de bebês com malformações congênitas, particularmente aqueles cujas mães receberam talidomida como antiemético ou sedativo. Segundo ele, chegavam a 20% as anomalias em recém-nascidos de gestantes que tomavam talidomida comparado à taxa normal de 1,5%. Naquele mesmo mês, a revista havia recebido uma declaração da Distillers Biochemicals Ltd. informando que retiraria a droga do mercado britânico enquanto aguardava investigação de dois relatos recebidos, onde parecia haver uma associação entre o uso da talidomida no início da gestação com malformações no feto (Mcbride, 1961).

Nos Estados Unidos, a droga não chegou a ser liberada. O Laboratório Merrel solicitou à FDA (*Food and Drug Administration*) licença para a

comercialização da talidomida, mas a Dra. Frances Oldham Kelsey rejeitou a solicitação com base nos relatos europeus de neurite periférica como efeito colateral, vindo inclusive a ganhar prêmios e homenagens por isso. Ainda assim, cerca de 1200 médicos receberam a talidomida diretamente da Chemie Grünenthal para serem usados como antieméticos em pacientes gestantes, pois na época não havia nenhum tipo de controle governamental sobre a realização de testes clínicos com medicamentos nos EUA. Como consequência, poucas crianças foram afetadas pela talidomida nos Estados Unidos (Smithells and Newman, 1992; Oliveira *et al.*, 1999; Matthews and McCoy, 2003; Ministério da Saúde, 2014).

No Brasil, o medicamento começou a ser comercializado em março de 1958 por diferentes laboratórios sob o nome de Ectiluram®, Ondosil®, Sedalis®, Sedim®, Slip® e Verdil® (Oliveira *et al.*, 1999; Ministério da Saúde, 2014). Mesmo com o surgimento de casos em outros países, o medicamento continuou disponível no Brasil pelo menos até 13 de novembro de 1962, quando o governo federal, por meio do Serviço Nacional de Fiscalização de Medicina e Farmácia (SNFMF), cassou a licença dos produtos contendo talidomida mediante o Termo de Inutilização do Medicamento. Este termo só foi estabelecido formalmente em 30 de junho de 1964 (Ministério da Saúde, 2014). Entretanto, de acordo com informações da Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST), esse medicamento só foi de fato retirado do mercado brasileiro em 1965, ou seja, com pelo menos quatro anos de atraso (Oliveira *et al.*, 1999).

Ainda em 1965 o dermatologista israelense Jacob Sheskin relatou a administração de talidomida a um paciente insone com Eritema Nodoso Hansênico - ENH. O paciente além de conseguir dormir, teve suas lesões curadas completamente após 3 dias de terapia. Sheskin relatou resultados semelhantes em outros 5 pacientes e a droga eventualmente foi licenciada para o tratamento de ENH no México e no Brasil, voltando a ser comercializada. Essa descoberta foi comprovada por diversos estudos, incluindo um ensaio clínico, multicêntrico e duplo-cego coordenado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1971 e pode ser considerada como a primeira indicação precisa para o uso da talidomida (Oliveira *et al.*, 1999; Matthews and McCoy, 2003; Ministério da Saúde, 2014). Uma Newsletter da Sociedade de Teratologia (*Teratology Society* estabelecida nos

Estados Unidos) chegou a publicar um aviso sobre a possibilidade de a talidomida reaparecer no mercado, e com ela um aumento na frequência de certos defeitos congênitos (citado por Castilla *et al.*, 1996). Com isso, acredita-se que a droga nunca tenha ficado indisponível no Brasil, ainda que por poucos meses tenha sido retirada do mercado: muitas pessoas ainda possuíam a droga em sua residência, por desaviso ou descuido continuaram a ingerindo e muitas crianças continuaram sendo afetadas (Smithells and Newman, 1992).

No Brasil, a partir de 1973 foram criadas associações das vítimas da talidomida e com isso movimentos de ação indenizatória, e criação de muitas legislações, portarias e diretrizes quanto ao uso da talidomida ao longo das décadas. Atualmente, a produção da talidomida é responsabilidade da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Minas Gerais. A prescrição segue rígidos critérios, e deve ser realizada por meio de Notificação de Receita de Talidomida acompanhada do Termo de Responsabilidade/Esclarecimento. A dispensação ocorre no local com assistência farmacêutica que orienta e monitora a entrega, a utilização, os resultados e a devolução/descarte apropriados (Ministério da Saúde, 2014).

Apesar das restrições, o Brasil se tornou o único país com três gerações de vítimas da Talidomida. O número de vítimas da primeira geração, que corresponde aos casos ocorridos até 1965, é estimado em cerca de trezentos (Oliveira *et al.*, 1999). No entanto, devido à dificuldade de confirmação da talidomida durante a gestação, apenas 121 delas tiveram reconhecida sua condição de vítima da talidomida (Ministério da Saúde, 2014). Na segunda geração (1966-1998), estimam-se 34 casos: 33 relatados por Castilla *et al.* (1996) que ocorreram entre 1969 a 1995 em nove estados brasileiros; e mais um caso de 1998 identificado em 2011 (Vianna *et al.*, 2013b). A terceira geração (2005-2010) corresponde à 5 crianças: um caso de Rondônia, dois do Maranhão, e gêmeos do Rio Grande do Sul (Schuler-Faccini *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2013; Ministério da Saúde, 2014).

1.2.2 Características clínicas e moleculares da TE

As malformações da TE são variáveis, podendo ser únicas ou múltiplas e envolvendo basicamente qualquer sistema do corpo. São geralmente bilaterais e

simétricas, e membros superiores são majoritariamente afetados. Malformações restritamente nos membros inferiores são raras. As alterações são pré-axiais e intercalares, como amelia, focomelia, e o polegar pode ser ausente, hipoplásico ou trifalângico. As extremidades superiores geralmente são acometidas por perda de dígitos e as inferiores por polidactilia e sindactilia. Podem incluir ainda aplasia do músculo tenar, ausência de falanges, hipoplasia do rádio e da ulna, hipoplasia de ombros e quadril, entre outras malformações. Os defeitos de membros podem estar associados a outras anomalias, como hemangioma facial na linha média, microtia e anotia, coloboma de íris, oftalmomegalia, microftalmia, anoftalmia, paralisia facial e deficiência intelectual. Anormalidades de órgãos internos, como de laringe, traqueia e lobulação dos pulmões, malformações cardíacas, genitourinárias e gastrointestinais também podem estar presentes (Smithells, 1973; Schmidt and Salzano, 1983; Smithells and Newman, 1992).

Apesar de atualmente o medicamento ser utilizado também para outras condições, como mieloma múltiplo e lúpus, por exemplo (Ministério da Saúde, 2014), segundo Castilla *et al.* (1996), a ocorrência da embriopatia por Talidomida é limitada a países subdesenvolvidos, onde a hanseníase é mais comum e o controle da droga é ineficiente. Na América do Sul, o acesso ao medicamento é proporcional à frequência da hanseníase (Castilla *et al.*, 1996). Os registros brasileiros mostram que a prevalência da hanseníase no Brasil pode chegar a 10,2/10.000 em regiões endêmicas (Vianna *et al.*, 2017), onde 24.000 casos de hanseníase multibacilar são diagnosticados anualmente, dos quais 30% a 50% apresentarão ENH. A partir desta estimativa, aproximadamente 10.000 indivíduos são possíveis usuários da talidomida (Vianna *et al.*, 2011). Entre 10 e 50% das mulheres que ingerem talidomida durante o período de sensibilidade embriológica terão filhos afetados, mesmo em pequenas doses como 50 e 100mg. A janela teratogênica foi estabelecida entre 20 a 36 dias após a fertilização, ou 34^o ao 50^o dia após a última menstruação (Newman, 1986).

O mecanismo pelo qual a talidomida causa deficiências nos membros e outras malformações é complexo e ainda está sendo investigado. Ito *et al.* (2010) demonstraram que a talidomida se liga à proteína cereblon (CRBN). Essa proteína forma um complexo de E3 ubiquitina ligase com a proteína 1 de ligação a danos no

DNA 1 (DDB1) e com a CUL4A (Cullin 4A), importante para o crescimento de membros e expressão do fator de crescimento de fibroblasto Fgf8 em peixe-zebra e galinha (Ito *et al.*, 2010). A ubiquitina ligase tem o papel de marcar proteínas indesejadas para degradação pelo proteossomo, e ao se ligar ao cereblon, a talidomida faz com que o complexo marque as proteínas erradas. Mais tarde, Donovan *et al.* (2018) e Matyskiela *et al.* (2018) demonstram de forma independente que na presença de talidomida esse complexo promove a degradação de SALL4, uma proteína importante na via de desenvolvimento de membros. Variantes heterozigotas em *SALL4* são suficientes para causar a Síndrome de Okihiro (Donovan *et al.*, 2018; Matyskiela *et al.*, 2018).

Entretanto, a talidomida participa de uma ampla rede de interações de proteínas: sabe-se por abordagens *in silico* que a talidomida interage diretamente com 33 proteínas, onde CTNNB1 e NOS3 aparecem como alguns dos componentes principais dessa rede (Kowalski *et al.*, 2019). Outros alvos já demonstrados da talidomida são TBX5 - um fator de transcrição que desempenha um papel importante no desenvolvimento de membros e coração, onde a presença de talidomida parece impedir sua ligação ao DNA em até 40% (Khalil *et al.*, 2017) e receptores dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGFRs), que na presença de talidomida tem sua expressão e função interferida (Sundaresan *et al.*, 2019).

Além do mais, sabe-se que alguns indivíduos teriam maior suscetibilidade à ação teratogênica da talidomida do que outros (Newman, 1986), e variantes em genes candidatos tem sido investigadas. Haplótipos no gene *NOS3* foram encontrados como possíveis fatores de suscetibilidade à TE (Vianna *et al.*, 2013a; Kowalski *et al.*, 2016); um efeito de soma de variantes no *CRBN* foi sugerido em pacientes com TE que apresentavam anomalias longitudinais pré-axiais nos membros e uma variante em *CUL4A* também foi encontrada como potencial de suscetibilidade (Kowalski *et al.*, 2020).

1.3 SÍNDROME DE ROBERTS E O GENE *ESCO2*

A Síndrome de Roberts (RBS) é de herança autossômica recessiva, possui uma expressividade variável e é caracterizada por uma série de anomalias, dentre elas, deformidades nos membros (tetrafocomelia), anomalias craniofaciais e genitais e restrição de crescimento (Freeman *et al.*, 1974; Afifi *et al.*, 2016). O primeiro relato surgiu em 1919 quando o Dr. John B. Roberts reportou as principais anomalias de um caso de dois irmãos: fenda labiopalatina bilateral, protusão da porção intermaxilar da mandíbula superior e desenvolvimento imperfeito dos quatro membros, com consanguinidade parental. Em 1966 Appelt *et al.* reconheceram essa combinação de malformações como uma síndrome. Entretanto, a descrição mais antiga feita para esse conjunto de anomalias parece ter sido feita já em 1671 por Bouchard (citado por Freeman *et al.*, 1974).

Em 1921 manifestações similares, porém mais leves das encontradas em RBS, foram relatadas por O'Brien e Mustard (1921), e em 1969, Herrmann *et al.* relataram um caso semelhante ao de O'Brien e Mustard (1921) e notaram essa semelhança, denominando-a de Síndrome SC ou pseudotalidomida. Em 1977 Hermann e Opitz (1977) revisaram a literatura e tentaram classificar os casos em SC-Focomelia ou RBS e consideraram que os casos mais brandos eram SC-Focomelia e mais severos eram RBS, já sendo considerada como diferentes espectros de uma mesma condição e com diferentes prognósticos de vida (Herrmann and Opitz, 1977). Posteriormente, Van Den Berg e Francke (1993) revisaram 100 casos de RBS e elaboraram um novo escore de classificação com bases em 6 critérios: restrição de crescimento, focomelia dos braços, focomelia das pernas, sobrevivência, e anormalidades palatinas e oculares, sendo que cada critério possui uma pontuação com base na sua gravidade. Nesses 100 casos avaliados, o fenótipo variou da completa ausência de braços e pernas com dígitos rudimentares até leve redução do crescimento dos membros. A redução no número ou comprimento dos dedos também foi comum, bem como redução ou ausência do fêmur, tíbia ou fíbula, sendo que alguns casos apresentavam fusão desses ossos. Além disso, vários casos possuíram alguma anomalia encontrada com pouca frequência, mostrando a expressividade variável da síndrome. Os casos graves

frequentemente tinham elevada letalidade, se manifestando como abortos espontâneos ou natimortos (Van den Berg and Francke, 1993).

O fenótipo celular é marcado por um afastamento incomum das cromátides irmãs, especialmente próximo à região centromérica. Esse fenômeno é conhecido como Heterocromatina em Repulsão (HR) ou Separação Prematura do Centrômero (PCS), e foi muito usado como critério diagnóstico antes da caracterização molecular (Freeman *et al.*, 1974; Van Den Berg and Francke, 1993). Além da separação prematura do centrômero, também retardo anafásico, aneuploidia, micronúcleo, diminuição da proliferação celular e hipersensibilidade aos agentes danificadores de DNA caracterizam o fenótipo celular da RBS (Vega *et al.*, 2005).

Vega *et al.* (2005) estabeleceram uma associação entre a RBS e o gene *ESCO2* e descobriram a base molecular por trás desse fenômeno citogenético, e Schüle *et al.* (2005) demonstraram que todo espectro fenotípico Roberts/SC-Focomelia é causado por variantes patogênicas em *ESCO2* (Schüle *et al.*, 2005). Este gene pertence à família Eco1 de acetiltransferases e está envolvida no estabelecimento de coesão das cromátides irmãs na fase S; possui 11 éxons e seu polipeptídeo possui 601 aminoácidos (Vega *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2010). Após a replicação do DNA, as cromátides irmãs são mantidas unidas pela coesina, um complexo de proteínas composto SMC1A, SMC3, RAD21, SA1,2, e PDS5 (Banerji *et al.*, 2017). Foi proposto que o estabelecimento dessa coesão pode ser regulado pela atividade de acetilação dessas proteínas. Dessa forma, a perda de acetiltransferase de *ESCO2* foi implicado no mecanismo molecular de RBS. Vega *et al.* (2010) mostraram, através de um estudo de hibridização *in situ* em embriões humanos, que a expressão do gene *ESCO2* ocorre no cérebro, face, membros, rins e gônadas, estruturas afetadas na RBS (Vega *et al.*, 2010).

A maioria das variantes descritas envolvem introdução de um novo códon de parada prematuro em *ESCO2*, transcrição por *frameshift*, *nonsense* ou variantes *splicing*, resultando provavelmente em níveis menores de mRNA (Vega *et al.*, 2010). A grande maioria das variantes ocorrem em homozigose, sendo alguns heterozigotos compostos, e em sua maioria ocorrem no éxon 3 e 4, as demais são distribuídas ao longo do gene (Afifi *et al.*, 2016).

Devido aos poucos casos relatados na literatura e à alta prevalência de consanguinidade, a RBS é considerada um distúrbio raro (Van Den Berg and Francke, 1993), e sua prevalência é desconhecida.

O principal diagnóstico diferencial é com a embriopatia por Talidomida, Síndrome TAR, Anemia de Fanconi, Baller-Gerold e com algumas coesinopatias, como Cornelia de Lange (Waldenmaier *et al.*, 1978; Gordillo *et al.*, 2006; Gerkes *et al.*, 2010; Banerji *et al.*, 2017; Colombo *et al.*, 2019). Recentemente, Colombo *et al.* (2019) relataram dois casos que foram diagnosticados como Síndrome Baller-Gerold e após teste genético o diagnóstico foi de RBS.

1.4 SÍNDROME DE OKIHIRO E O GENE SALL4

Os primeiros relatos das associações das anomalias da Síndrome de Okihiro foram feitos no início do século XX por Crisp (1918), Mennerich (1923) e Gifford (1926). A terminologia de Síndrome de Okihiro foi proposta por Hayes *et al.* (1985), mas também é chamada de Síndrome de Duane de Raio Radial ou Síndrome de DR, proposta por Temtamy (1986). Essa síndrome apresenta herança autossômica dominante, com expressividade variável inter e intra-familiar e penetrância reduzida (Hayes *et al.*, 1985; Al-Baradie *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2016), sendo alguns casos tão leves que não chegam a ser diagnosticados (Hayes *et al.*, 1985). Sua prevalência é desconhecida.

Defeitos radiais unilaterais ou bilaterais associados a anomalia de Duane caracterizam a Síndrome de Okihiro. A anomalia de Duane é um distúrbio congênito da motilidade ocular, caracterizado por limitação variável da adução e retração ocular, estreitamento da fenda palpebral na adução e ausência ou limitação grave da abdução. Não é tão rara e representa cerca de 1% dos casos de estrabismo (Hayes *et al.*, 1985). Apesar de os defeitos radiais dos membros superiores e a Anomalia de Duane serem considerados as principais características da doença, eles estão presentes em apenas 91% e 65% dos casos, respectivamente (Alves *et al.*, 2016). Outras anormalidades comuns são anomalias cardíacas, renais, vertebrais, de membros inferiores, anomalias faciais, perda auditiva

neurossensorial, atresia anal e distúrbios pigmentares (Hayes *et al.*, 1985; Al-Baradie *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2016). Nos membros superiores, a hipoplasia da eminência tenar foi frequentemente observada e pode ser acompanhada por uma incapacidade de flexionar a articulação interfalângica do polegar. Já anormalidade do raio radial pode ser mais extensa, com ausência do osso radial ou do antebraço (Hayes *et al.*, 1985). Esse distúrbio se sobrepõe parcialmente às síndromes de Townes-Brocks e Holt-Oram (Al-baradie *et al.*, 2002).

Kohlhase *et al.* (2002) e Al-Baradie *et al.* (2002) identificaram variantes no gene *SALL4* como causadoras da Síndrome de Okihiro. Esse gene possui quatro éxons e codifica um fator de transcrição de 1056 aminoácidos com oito motivos de dedo de zinco (Al-Baradie *et al.*, 2002; Kohlhase *et al.*, 2002). A proteína *SALL4* desempenha um papel importante durante o desenvolvimento embrionário, interagindo com diferentes proteínas, tais como *SALL1*, *TBX4* e *TBX5* (Alves *et al.*, 2016). Pacientes com fenótipo clínico de Holt-Oram tiveram variantes de *SALL4* identificadas (Kohlhase *et al.*, 2003; Vanlerberghe *et al.*, 2019) e acredita-se que as interações entre *SALL4* e *SALL1*, e entre *SALL4* e *TBX5*, podem explicar a sobreposição fenotípica da Síndrome de Okihiro com as de Holt-Oram e Townes-Brocks. Acredita-se que a Síndrome de Okihiro aconteça por haploinsuficiência de *SALL4* (Alves *et al.*, 2016).

Variantes encontradas em *SALL4* também causam uma condição alélica de Síndrome de Okihiro, denominada Síndrome acro-renal-ocular (Kohlhase *et al.*, 2003; Borozdin *et al.*, 2004b; Borozdin *et al.*, 2004a). Até o momento do relato de Alves *et al.* (2016), 28 variantes no gene *SALL4* tinham sido relatadas como causadoras da síndrome de Okihiro. A grande maioria corresponde à variantes *frameshift* causadas por duplicações ou deleções, e para todas elas há predição de que interrompam pelo menos um motivo de dedo de zinco (Alves *et al.*, 2016). Uma dessas variantes foi encontrada em um paciente previamente diagnosticado com embriopatia por Talidomida (Kohlhase *et al.*, 2003).

Por se sobrepor parcialmente a Townes-Brocks, Holt-Oram, e TE, esses são os principais diagnósticos diferenciais. Outros diagnósticos diferenciais incluem Anemia de Fanconi e Síndrome TAR, além de suas síndromes alélicas como acro-renal-ocular (Al-Baradie *et al.*, 2002; Kohlhase, 2004).

1.5 SÍNDROME DE HOLT-ORAM E O GENE *TBX5*

A Síndrome de Holt-Oram (HOS) é uma síndrome rara que afeta membros e coração, com prevalência ao nascimento de 1/100.000 nascidos vivos, de herança autossômica dominante e alta penetrância (próximo a 100%), com expressividade variável, variando de achados subclínicos à focomelia e defeitos cardíacos graves (Hurst *et al.*, 1991; Basson *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2012). Foi descrita por Holt e Oram (Londres, 1960) como uma síndrome de anormalidades nos membros superiores e defeitos cardíacos. Eles relataram nove indivíduos afetados de quatro gerações de uma família. A partir de então muitas famílias foram reconhecidas como tendo a mesma condição, levando a uma série de relatos no início da década de 1960 (Hurst *et al.*, 1991). Atualmente, cerca de 300 casos foram descritos na literatura (Vanlerberghe *et al.*, 2019).

As malformações nos membros superiores estão sempre presentes e mais comumente bilaterais e assimétricas. Envolvem estruturas do raio radial, que variam de uma anormalidade sutil no carpo até defeitos proximais evidentes como a focomelia. Podem apresentar aplasia, hipoplasia e fusão ou desenvolvimento anômalo, resultando em características que vão de limitação de movimento, polegares trifalângicos ou ausentes, antebraços encurtados até focomelia. Os polegares são as estruturas mais comumente afetadas (84%) com aplasia/hipoplasia radial em 64% dos casos. Defeitos do raio ulnar ocorrem apenas quando o raio radial está envolvido com menos gravidade (Basson *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2012).

Os defeitos cardíacos são geralmente os defeitos de Comunicação Interventricular (CIVs), mais comumente os Defeitos de Septo Atrial (DSA) ou raramente Defeitos de Septo Ventricular (DSV), mas outros defeitos graves e complexos já foram descritos. (Basson *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2012). Em casos familiares, 95% dos indivíduos demonstram ter problemas cardíacos. Acredita-se que não há associação entre a gravidade cardíaca e a gravidade dos defeitos de membros (Patel *et al.*, 2012).

Devido a uma combinação de clavículas curtas, hipoplasia da cabeça do úmero e musculatura diminuída, muito indivíduos apresentam ombros estreitos e

inclinados para baixo. Acredita-se que a combinação típica da síndrome seja o polegar trifalângico e o defeito do septo atrial (DSA), mas há uma variação na gravidade dos defeitos dos membros e do coração (Patel *et al.*, 2012). Os membros inferiores são geralmente normais (Patel *et al.*, 2012) e não há defeitos faciais, assim como o crescimento e desenvolvimento estão dentro da normalidade (Hurst *et al.*, 1991; Patel *et al.*, 2012). Não existe um perfil facial que o discrimine de outras síndromes mão-coração (Patel *et al.*, 2012).

Em 1997 Li *et al.* e Basson *et al.* demonstraram que a HOS é causada por variantes patogênicas no gene *TBX5* (Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). Esse gene pertence à família de genes T-box, que codificam fatores de transcrição que desempenham diversos papéis no desenvolvimento embrionário. Os genomas de camundongos e humanos contêm pelo menos sete membros da família de genes T-box, sendo eles *TBXT*, *TBR1*, *TBX1*, *TBX2*, *TBX3*, *TBX4*, *TBX5* e *TBX6* (Basson *et al.*, 1999). Algumas síndromes são associadas a variantes patogênicas nesses genes além do *TBX5* em Holt-Oram, como *TBX1* na Síndrome de DiGeorge, *TBX3* na Síndrome Ulnar-mamária (Patel *et al.*, 2012).

O gene *TBX5* codifica um fator de transcrição que contém motivos de ligação que interagem com os sulcos maiores e menores do DNA, ativando seus genes-alvo (Boogerd *et al.*, 2010). Uma alteração de aminoácidos perto da extremidade amino-terminal do T-box parece afetar interações com o sulco maior do DNA e as que alteram aminoácidos na extremidade carboxila do T-box parecem afetar as interações no sulco menor (Basson *et al.*, 1999).

Este gene possui nove éxons que codificam uma proteína de 518 aminoácidos (Ríos-Serna *et al.*, 2018; Vanlerberghe *et al.*, 2019). Mais de 90 variantes já foram descritas (Ríos-Serna *et al.*, 2018), e a maioria dos afetados possui variantes patogênicas sem sentido, resultando na proteína *TBX5* truncada e haploinsuficiente (Basson *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2012; Vanlerberghe *et al.*, 2019). As variantes são encontradas ao longo de todos os éxons, mas a maioria está dentro da região que corresponde ao domínio de ligação ao DNA do T-box (Boogerd *et al.*, 2010). O tipo de variante encontrada não prediz o fenótipo (Brassington *et al.*, 2003), e acredita-se que as deleções de todo o gene ou éxons sejam semelhantes às variantes patogênicas que causam proteína truncada,

devido à redução da dosagem de *TBX5* (Patel *et al.*, 2012). Além disso, variantes patogênicas de novo parecem relativamente frequentes na HOS (Basson *et al.*, 1999; Ríos-Serna *et al.*, 2018; Vanlerberghe *et al.*, 2019).

Em um estudo retrospectivo realizado por Vanlerberghe *et al.* (2019), foram avaliados molecularmente 212 pacientes com diagnóstico clínico para HOS, a maior série molecular descrita até o momento para esta síndrome. Eles encontraram uma taxa de detecção de variantes em *TBX5* de 58%. Das variantes encontradas, 87% eram alterações de ponto, sendo que a maioria levava à uma proteína truncada (37% *nonsense*, 26% *frameshift*, 10% *splice site*), 14% foram variantes *missense*, 8% deleções intragênicas, 4% duplicações intragênicas, e uma translocação aparentemente equilibrada t(2; 12)(q31; q24.3), implicando o locus *TBX5*. Defeito cardíaco foi observado em 91% dos pacientes, sendo o defeito do septo atrial mais frequente (61,5%). Os defeitos dos membros superiores foram bilaterais em 96% dos pacientes e assimetria foi observada em 91% quando a informação estava disponível. Eles ainda observaram falta de penetrância para quatro variantes, e um pai assintomático apresentou mosaico somático para uma variante encontrada em seu filho. Alguns pacientes com diagnóstico clínico para HOS tiveram variantes em *SALL4*, e outros apresentaram quebra cromossômica para Anemia de Fanconi e microdeleção 1q21.1 envolvendo *RBM8A*, para TAR. Ainda, alguns pacientes ficaram sem confirmação molecular.

A hipótese de heterogeneidade genética já foi anteriormente levantada. Entretanto, Vanlerberghe *et al.* (2019) avaliaram os casos que tinham diagnóstico clínico de HOS sem variantes em *TBX5* para 124 genes envolvidos no desenvolvimento de membros, e não encontraram nenhum gene candidato. Dessa forma, acredita-se que algumas variantes regulatórias podem estar envolvidas nas malformações causadas em HOS.

Os principais diagnósticos diferenciais são Síndromes de Okhiro, Townes-Brocks, TAR, Ulnar-mamária, Anemia de Fanconi, embriopatia por Talidomida e por Valproato, e associação VACTERL (Hurst *et al.*, 1991; McDermott *et al.*, 2004).

1.6 SÍNDROME DE TROMBOCITOPENIA E AUSÊNCIA DE RÁDIO (TAR)

A Síndrome de trombocitopenia e ausência de rádio (TAR) é caracterizada principalmente por trombocitopenia transitória e ausência de rádio bilateral com preservação de polegar. Entretanto, sua expressão é variável e outras características podem estar presentes, tais como: defeitos renais e cardíacos, alergia ao leite de vaca e deficiência intelectual. É herdada com um padrão autossômico recessivo: cerca de 95% dos casos apresentam microdeleção de 1q21.1 envolvendo o gene *RBM8A* em um alelo e variantes regulatórias na região 5' UTR ou no primeiro intron do outro alelo. Nos 5% restantes, foram identificadas variantes bialélicas: inativadora em um alelo e com redução de expressão no outro (Albers *et al.*, 2012; Al-Qattan, 2016).

A proteína RBM8A (ou Y14) é um componente do complexo de junção exônica (EJC) que se liga na junção de emenda no mRNA durante o *splicing* de pré mRNA, permanecendo ligado até a tradução. O EJC possui várias funções, incluindo o transporte de mRNA e marcação no mecanismo de degradação de mRNA mediada por mutação sem sentido (NMD - *Nonsense-mediated decay*). RBM8A é expressa amplamente nas células humanas e sua perda total não é compatível com a vida, porém uma redução de 50% não causa anormalidade. Para o fenótipo de TAR, é necessária uma supressão de mais de 50% de RBM8A. Recentemente se hipotetizou que os defeitos observados em TAR podem ser devidos à baixa quantidade de RBM8A e maior disponibilização de ubiquitina para degradação de FGFR1, necessária para a sinalização de FGF8. A RBM8A forma um complexo com MAGOH, e este complexo é ligado pela importin-13 à Ubc9 (enzima conjugadora da ubiquitina 9), e com isso mais ubiquitina fica disponível para degradação de FGFR1. Quando a degradação do FGFR1 é alta, o sinal FGF8 é atenuado. FGF8 é uma proteína difusível na crista ectodérmica apical (AER), acarretando em maior concentração na área do polegar do que a área do raio, promovendo assim ausência de rádio com preservação de polegares. A FGFR1 também parece desempenhar um papel na trombocitopenia transitória, alergia ao leite de vaca, defeitos cardíacos/renais e deficiência intelectual (Al-Qattan, 2016).

1.7 OUTRAS SÍNDROMES MALFORMATIVAS

Outras síndromes malformativas com DRM com acometimento do raio radial que podem apresentar sobreposição fenotípica com embriopatia por Talidomida incluem: Anemia de Fanconi, Síndrome Baller-Gerold, Cornelia de Lange, Rapadilino, Townes-Brocks e Associação VACTERL.

A Anemia de Fanconi (FA) foi descrita pela primeira vez pelo pediatra suíço Guido Fanconi em 1927 e é caracterizada por anormalidades físicas, aumento do risco de neoplasia e falência da medula óssea. O fenótipo físico em pacientes com FA é extremamente heterogêneo. Algumas malformações incluem pigmentação cutânea anormal, malformações esqueléticas dos membros superiores e inferiores, anomalias oftálmicas e do trato geniturinário. A insuficiência progressiva da medula óssea geralmente inicia com trombocitopenia ou leucopenia. Possui alta heterogeneidade genética e variantes em mais de 20 genes foram descritas em pacientes com FA, sendo que pelo menos a metade dos casos são atribuídos às variantes no gene *FANCA*, causando FA do subtipo A. As variantes no *FANCB* possuem herança ligada ao X, as variantes de *FANCR* são autossômicas dominantes e as demais seguem um padrão de herança autossômico recessivo. Estes genes codificam proteínas que atuam em uma complexa rede de reparo ao DNA (Mehta and Tolar, 2002; Fiesco-Roa *et al.*, 2019).

A Síndrome Baller-Gerold (BGS), assim como a Síndrome Rapadilino, são causadas por variantes no gene *RECQL4*, que codifica uma proteína da família das helicases. Suas variantes parecem impedir o processo normal de reparo e replicação do DNA, e tem herança autossômica recessiva. A BGS foi descrita em 1950 e é caracterizada por aplasia/hipoplasia radial e craniossinostose. Já a Rapadilino foi descrita originalmente em pacientes finlandeses e seu nome é um acrônimo de suas características clínicas: aplasia/hipoplasia RAdial, aplasia/hipoplasia das PAtelas e PAlato altamente fendido ou arqueado, DIarréia e articulações desalocadas (DIslocated joints), baixa estatura e malformações nos membros (Little size and Limb malformation), e nariz fino e inteligência normal (NOse slender and NOrmal intelligence) (Dietschy *et al.*, 2007).

A síndrome de Cornelia de Lange (CdLS) foi descrita em 1933 por uma pediatra francesa de mesmo nome e é caracterizada por aparência craniofacial distinta, restrição de crescimento e malformações nos membros. Entretanto, nem todos os casos exibem o fenótipo clássico e existe uma variabilidade de leve a grave. CdLS é causada por variantes em genes que codificam proteínas relacionadas ao complexo de coesinas, tais como: *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *BRD4*, *HDAC8* e *ANKRD11*, e assim como a Síndrome de Roberts, a CdLS é categorizada como uma coesinopatia. Cerca de 70% dos casos possuem variantes no gene *NIPBL*, e alguns genes segregam de forma autossômica dominante, enquanto outros são ligados ao X. O primeiro consenso internacional de diagnóstico e manejo de CdLS foi publicado em 2018 (Kline *et al.*, 2018).

A Síndrome Townes-Brocks possui herança autossômica dominante e foi descrita pela primeira vez por Townes e Brocks em 1972. É caracterizada geralmente por uma tríade de anomalias: ânus imperfurado, orelhas displásicas e malformações do polegar. Possui uma expressividade variável e pode incluir malformações adicionais como anomalias renais e cardíacas e defeitos oculares. É causada por variantes no gene *SALL1*, que codifica um fator de transcrição que atua como um repressor transcricional (Miller *et al.*, 2012).

A associação VACTERL foi formalmente descrita no início dos anos 1970. Seu nome é um acrônimo de uma associação não aleatória de vários defeitos: defeitos Vertebrais, atresia Anal, defeitos Cardíacos, fístula Traqueo-Esofágica, anomalias Renais e anomalias dos membros (Limbs). Atualmente, não há um conjunto bem aceito de critérios diagnósticos, mas a maioria dos clínicos e pesquisadores exige a presença de pelo menos três componentes de VACTERL para o diagnóstico. Sua causa ainda é desconhecida, mas acredita-se que tenha forte heterogeneidade etiológica e algumas análises sugerem subgrupos dentro do conjunto geral da Associação VACTERL. Algumas hipóteses tem sido levantadas, como a possibilidade de que a associação VACTERL seja na verdade uma coleção de muitas condições genéticas monogênicas diferentes. Outra é a de que ocorra devido a fatores epigenéticos ou ainda que não tenha causa genética mas sim teratogênica. As principais características de VACTERL afetam especialmente cinco sistemas anatômicos diferentes que ocorrem temporalmente em pontos

variáveis durante a embriogênese, e essa distribuição espaço-temporal dificulta uma explicação unificadora. Possivelmente deva-se à herança multifatorial, com interação de alelos de suscetibilidade e fatores não genéticos (Solomon, 2018).

1.8 JUSTIFICATIVA

Defeitos de redução de membros são anomalias relativamente frequentes na espécie humana, com uma prevalência estimada de 1.6 /10.000 nascimentos no Brasil. O Brasil é o único país do mundo que ainda apresenta novos casos de TE, e continua, portanto, importante diagnóstico diferencial em casos de DRM. Algumas síndromes genéticas possuem muita similaridade com TE, especialmente Roberts, Okihiro e Holt-Oram, que no passado já foram diagnosticadas erroneamente como TE. Dessa forma, o diagnóstico molecular de síndromes de expressão fenotípica semelhantes e identificação da variante causadora é fundamental para o aconselhamento genético.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar variantes em genes relacionados a síndromes de redução de membros com acometimento predominantemente radial em pessoas com defeitos de redução de membros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a frequência de variantes nos genes *ESCO2*, *TBX5* e *SALL4* através de painel em sequenciamento de nova geração (NGS) em uma amostra de pacientes com defeitos de redução de membros.
- b) Identificar associações entre variantes com os tipos de anomalias de membros.
- c) Predizer funcionalmente o impacto das variantes identificadas no fenótipo apresentado para as variantes que não possuem funcionalidade descrita.
- d) Comparar a frequência das variantes identificadas com aquelas descritas em bancos de dados públicos e em pessoas com embriopatia por Talidomida.

3 ARTIGO 1

Embriopatia por Talidomida e seus diagnósticos diferenciais: uma análise fenotípica

Manuscrito em preparação

Embriopatia por Talidomida e seus diagnósticos diferenciais: uma análise fenotípica

Laysa Kariny Kriek^{1,2}, Thayne Woycinck Kowalski^{1,2}, Maria Teresa Vieira Sanseverino^{2,3,4}, Lavinia Schüller-Faccini^{1,2,3,4}

Afiliações dos autores:

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

²INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brasil

³Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

⁴Serviço Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos (SIAT), Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil

Introdução

Desde a tragédia da talidomida, quando mais de 10.000 casos de embriopatia por Talidomida (TE) ocorreram entre 1958 e 1963 nos países onde estava disponível (Lenz, 1988; Matthews and McCoy, 2003), os defeitos de redução de membros (DRM) passaram a ter como possível etiologia a exposição aos teratógenos ambientais (Castilla *et al.*, 1995). Estes podem ser definidos como a ausência ou hipoplasia de ossos longos, metacarpais, metatarsais ou falanges. Os DRM podem ser subdivididos em ausência completa do membro/amelia e ausência parcial: defeito intercalar (focomelia, por exemplo), defeito transverso terminal (porção distal e parte inferior do braço ausente), defeito longitudinal pré-axial (rádio/tíbia e polegar/hálux), defeito longitudinal central (segundo ao quarto dedo), defeito longitudinal pós-axial (ulna/fíbula e do quinto dedo), e defeito longitudinal pré-axial e pós-axial. (Gold *et al.*, 2011) No Brasil, entre os anos de 2005 e 2010, a prevalência de defeitos de redução de membros foi estimada em 1,6 em cada 10.000 nascidos vivos (Vianna *et al.*, 2013).

A TE consiste em uma série de anomalias congênitas causadas pelo uso de talidomida durante a gravidez (Newman, 1986). A talidomida foi retirada do mercado no início dos anos 1960 em escala mundial, mas no Brasil, apesar de ter sido banida também em 1962, acredita-se que seu uso não foi interrompido por causa de sua eficácia no tratamento do Eritema Nodoso Hanseniano (ENH), comprovado a partir de 1965 (Smithells and Newman, 1992). Os registros brasileiros mostram que a prevalência da hanseníase no Brasil pode chegar a 10,2/10.000 em regiões endêmicas (Vianna *et al.*, 2017), onde 24.000 casos de hanseníase multibacilar são diagnosticados anualmente dos quais 30% a 50% apresentarão ENH. A partir desta estimativa, aproximadamente 10.000 indivíduos são possíveis usuários da talidomida (Vianna *et al.*, 2011). O Brasil é o único país do mundo que ainda registra casos de TE, mesmo com restrições impostas (Schuler-Faccini *et al.*, 2007), sendo os últimos reconhecidos em 2011 (Vianna *et al.*, 2013).

Entre 10 e 50% das mulheres que ingerem talidomida durante o período de sensibilidade terão filhos afetados, mesmo em pequenas doses como 50 e 100mg.

A janela teratogênica foi estabelecida entre 20 a 36 dias após a fertilização, ou 34^o ao 50^o dia após a última menstruação (Newman, 1986). O mecanismo pelo qual a talidomida causa deficiências nos membros e outras malformações é complexo e ainda está sendo investigado. Sabe-se que a talidomida promove a degradação de SALL4, uma proteína importante que atua nas vias de desenvolvimento de membros, e variantes patogênicas no gene causam a Síndrome de Okhiro ou Síndrome de Duane do Raio Radial (Donovan *et al.*, 2018), muito parecida fenotipicamente com a TE. Entretanto, a talidomida parece interagir diretamente com 33 proteínas, onde CTNNB1 e NOS3 aparecem como alguns dos alvos principais (Kowalski *et al.*, 2019). Outro alvo da talidomida é a TBX5, variantes no seu gene causam a Síndrome de Holt-Oram e que também possui similaridade com a TE (Khalil *et al.*, 2017).

Os DRM possuem uma variedade de etiologias, desde desordens genéticas até exposição ambiental e causas mecânicas, como ruptura prematura das membranas amnióticas (McGuirk *et al.*, 2001; Gold *et al.*, 2011), sendo a TE fenocópia de outras síndromes genéticas. Isto é, causas hereditárias podem ser encontradas para defeitos de membros semelhantes à TE, tais como: Síndrome de Roberts, Síndrome de Holt-Oram, Síndrome de Okhiro, Anemia de Fanconi, Síndrome Trombocitopenia e Ausência de Rádio (TAR), complexo fêmur-fíbula-ulna, entre outras (Lenz, 1988; Smithells and Newman, 1992; Vianna *et al.*, 2011; Mansour *et al.*, 2019). No entanto, as síndromes que parecem ter maior dificuldade de diagnósticos diferenciais para TE são as síndromes de Roberts, Holt-Oram e Okhiro, pois alguns casos já foram previamente classificados como TE, antes da identificação de sua base molecular (Freeman *et al.*, 1974; Van Regemorter *et al.*, 1982; Kohlhase *et al.*, 2002).

Nos dias atuais a TE continua sendo motivo de busca de compensação legal por parte do estado (Moro and Invernizzi, 2017), por sua disponibilidade no sistema de saúde brasileiro. Dessa forma, o diagnóstico diferencial com síndromes de expressão fenotípica semelhantes é fundamental, inclusive para o aconselhamento genético.

O objetivo deste estudo foi revisar as anomalias congênitas associadas à TE e as principais síndromes ou associações malformativas com fenótipo semelhante, salientando as diferenças que podem ajudar no seu diagnóstico diferencial.

Métodos

Como critérios de inclusão foram selecionadas síndromes ou associações malformativas (chamadas a partir de agora apenas síndromes malformativas) com defeitos de redução de membros com acometimento radial. E como critérios de exclusão, síndromes ou associações onde os defeitos de redução dos membros eram caracteristicamente transverso-terminais.

A partir do fenótipo clínico em revisão de literatura, doze síndromes malformativas foram selecionadas. São elas, como seu código OMIM: Anemia de Fanconi (#227650), Síndrome acro-renal-ocular (#607323), Baller-Gerold (#218600), Cornelia de Lange (#122470), Holt-Oram (#142900), Okihiro (#607323), Rapadilino (#266280), Roberts (#268300), SC-Focomelia (#269000), TAR – Trombocitopenia e ausência de rádio (#274000), Townes-Brocks tipo 1 e 2 (#107480/#617466) e Associação VACTERL (%192350). Anemia de Fanconi e Cornelia de Lange possuem vários subtipos, e aqui escolhemos a Anemia de Fanconi do tipo A e a Cornelia de Lange do tipo 1, que são as mais frequentes entre seus subtipos, como forma de simplificar nossa análise.

A revisão foi realizada através do HPO – *Human Phenotype Ontology* (<https://hpo.jax.org/app/>), um banco de dados que reúne anomalias (fenótipos) padronizadas de doenças raras usando o OMIM, Orphanet e DECIPHER, além de mineração de texto do PubMed seguida de curadoria manual. O HPO está sendo cada vez mais adotado como padrão para anormalidades fenotípicas por diversos grupos mundialmente reconhecidos, laboratórios clínicos, recursos biomédicos e ferramentas de software (Köhler *et al.*, 2014).

Extraímos os dados do HPO em janeiro de 2019 e comparamos as síndromes malformativas entre si. Townes-Brocks tipo 2 (#617466) foi retirada desta análise devido ao baixo número de entradas no HPO (=10). Os dados

moleculares das doenças foram extraídos do OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*® (<https://www.omim.org/>), GHR – *Genetic Home Reference* (<https://ghr.nlm.nih.gov/>) e GeneCard (<https://www.genecards.org/> - Stelzer *et al.*, 2016).

A classificação de anomalias congênitas da TE seguiu o proposto por Mansour *et al.* (2019), categorizadas por especificidade: Altamente sugestivas de TE (ocorrem raramente em outras condições); Não específicas (ocorrem em TE e outras condições); Ocasionais (anomalias comuns ocasionalmente associadas à TE).

Resultados

A Tabela 1 apresenta as anomalias congênitas da TE que não estão presentes nas síndromes malformativas com sobreposição fenotípica. A Tabela 2 apresenta os dados detalhadamente, fazendo a comparação entre TE e síndromes.

A Tabela 3 apresenta as anomalias congênitas sugestivas de TE comparativamente à algumas anomalias diferenciais das demais síndromes malformativas com fenótipo similar à TE. Isto é, aquelas anomalias que não foram encontradas em outra síndrome nesta comparação. A lista completa dessas anomalias diferenciais pode ser consultada no final da Tabela 4 em “Outros achados”, além de toda a comparação de anomalias entre as síndromes malformativas.

Embora anomalias não específicas e ocasionais para TE também foram encontradas somente em TE quando comparadas às síndromes malformativas, aqui incluímos somente as altamente sugestivas de TE. Destacamos anomalias da cintura escapular, tais como acrômio longo e proeminente, hipoplasia do glenóide, além de amelia, anotia e vesícula biliar ausente.

A Anemia de Fanconi parece bem marcada para anormalidades de pigmentação na pele, além de uma anemia mais grave do que a encontrada em TAR.

Anormalidades de laringe e traqueia, do disco intervertebral, medula ancorada, artéria umbilical única e aplasia/hipoplasia de pulmões marcam a Associação VACTERL.

A síndrome Acro-renal-ocular não possui anomalias muito diferenciais, mas destacam-se o divertículo de bexiga, fusão vertebral e falange distal do polegar curta - frequentemente encontrada nessa síndrome.

Baller-Gerold possui algumas alterações diferenciais de face e cabeça, como a braquitricefalia, além de poiquilodermia.

Para a Cornelia de Lange, muitas alterações faciais distintas estão presentes, como sinofre, além de micromelia.

Holt-Oram é marcado por clavículas curtas e ombros inclinados para baixo, além de relativa frequência de ectrodactilia.

Para Okihiro foram identificadas apenas hipoplasia do peitoral e conduto auditivo externo em forma de fenda como anomalias diferenciais.

Rapadilino apresenta também alterações de face distintas e pele moteada.

O diagnóstico diferencial para Roberts pode ser feito principalmente com proeminência de genitália externa (falo/clitóris, e pequenos lábios aumentados), órbitas oculares rasas e opacificação do estroma corneano.

Townes-Brocks possui alterações diferenciais de orelha, tais como orelha de sátiro, orelha Stahl e fossa pré-auricular.

SC-focomelia apresenta ossos wormianos e distintos cabelos claros (conhecido como *silvery-blond hair*).

A Síndrome TAR pode apresentar clavícula em forma de gancho, joelho varo (*genu varum*), alergia ao leite de vaca e aplasia de útero, por exemplo.

Uma estatística descritiva desta análise está apresentada na tabela 5.

A síndrome Cornelia de Lange e a Síndrome TAR são as que mais possuem anomalias específicas, 52.1% e 49.3%, respectivamente (coluna 1). As síndromes que mais apresentaram sobreposição de fenótipos entre si (anomalias que estão presentes em duas ou mais síndromes malformativas) foram: Acro-renal-ocular, SC-Focomelia, Okihiro e Roberts (71.3% – 88.6%) – coluna 2.

Em relação à sobreposição destes fenótipos com a TE (coluna 3), Okihiro, acro-renal-ocular e SC-focomelia são as mais sobrepostas (34.6%, 29.5%, e

29.2%, respectivamente). Por outro lado, analisamos também a sobreposição de fenótipos de TE com essas síndromes (a partir da Tabela 2). Aqui, alguns fenótipos estão em agrupamento. As síndromes mais sobrepostas são Cornelia de Lange e Síndrome de Roberts, ambas com 31% (coluna 4). Logo, as síndromes que mais podem necessitar de diagnósticos diferencial com TE são Okhiro, Acro-renal-ocular e SC-Focomelia e TE mais frequentemente necessita de diagnóstico diferencial com Roberts e Cornelia de Lange. Entretanto, Cornelia de Lange do tipo 1 possui frequentemente características faciais distintas, o que faz com que na prática clínica o diagnóstico diferencial seja realizado principalmente para Roberts.

Na tabela 6, estão disponíveis os dados moleculares dessas doenças, assim como prevalência e modo de herança.

Discussão

Embora por muito tempo a TE tenha sido considerada uma síndrome que não apresenta características únicas (Smithells and Newman, 1992), Mansour *et al.* (2019), mostraram que anomalias da cintura escapular, tal como hipoplasia do glenóide e acrómio longo, parecem ser bem específicos de TE, e aqui nós reforçamos esses achados quando comparados com outras doze síndromes malformativas. Esses achados são diferentes dos encontrados em Holt-Oram, enquanto o acrómio longo em TE torna o ombro pontiagudo, Holt-Oram tende a apresentar clavículas curtas e ombros inclinados para baixo. Ainda, estes também diferem de TAR, que apresentam clavículas em forma de gancho. Além disso, outras malformações também parecem ser únicas de TE, como anotia, amelia, vesícula biliar ausente, entre outras.

Em oposição a Roberts, que apresenta uma proeminência das genitálias externas, TE tende a apresentar genitália externa hipoplásica. Cornelia de Lange pode ser facilmente diferenciada pelas suas características faciais específicas. Entretanto, ressaltamos que os achados aqui descritos correspondem a Cornelia de Lange do tipo 1 e que nem todos os casos possuem características faciais marcadas. Cornelia de Lange possui pelo menos 5 subtipos e são causados por

uma variedade de genes (Kline *et al.*, 2018). A síndrome de Okihiro e Acro-renal-ocular foram as síndromes que menos apresentaram anomalias diferenciais, o que pode tornar o diagnóstico diferencial clínico bastante difícil. Na tabela 2, algumas anomalias diferenciais são também relativamente frequentes na síndrome (sublinhadas) e talvez possam ser considerados bom marcadores fenotípicos no diagnóstico diferencial.

A alta sobreposição fenotípica encontrada entre Acro-renal-ocular, SC-Focomelia, Okihiro e Roberts podem ser explicadas em parte pelo mecanismo molecular comum: Acro-renal-ocular e Okihiro são causadas por variantes patogênicas em *SALL4* e Roberts e SC-Focomelia são causadas por variantes patogênicas em *ESCO2*. Acro-renal-ocular é geralmente descrita como uma síndrome alélica de Okihiro, mas alguns autores tendem a considerar como uma mesma condição (Becker *et al.*, 2002; Kohlhase *et al.*, 2003; Borozdin *et al.*, 2004b; Borozdin *et al.*, 2004a; Kohlhase *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2016; Vargesson, 2019). O mesmo ocorre com Roberts e SC-Focomelia: SC-Focomelia é descrita geralmente com um fenótipo mais brando que Roberts e diferenciada por um *score*, no entanto alguns autores defendem que ambas condições sejam unificadas ou apenas reportam qualquer condição de *ESCO2* como Síndrome de Roberts (Van den Berg and Francke, 1993; Vega *et al.*, 2010; Gerkes *et al.*, 2010; Goh *et al.*, 2010; Keypour *et al.*, 2013; Afifi *et al.*, 2016; Sezer *et al.*, 2019). A divergência ocorre não somente na literatura, mas também em bancos de dados e ferramentas online, pois algumas trazem as condições unidas, como “Desordens relacionadas a *SALL4*” e “Espectro Roberts/SC-Focomelia”, enquanto outras ferramentas as trazem como entidades separadas.

Na presente análise verificamos que cerca da metade das anomalias - de acordo com HPO, de Acro-renal-ocular não são sobrepostas com Okihiro, assim como entre Roberts e SC-Focomelia. Um viés importante a ser citado aqui é o fato dessas doenças serem raras e algumas estarem mais bem descritas (com maior número de entradas no HPO) do que outras. Baller-Gerold e Rapadilino, por exemplo, também são causadas pelo mesmo gene (*RECQL4*), mas Baller-Gerold possui 83 entradas, contra 18 entradas de Rapadilino. É preciso avaliar até que ponto se trata de uma variabilidade intra e interfamiliar ou se de fato são diferentes

síndromes genéticas. Um diagnóstico bem definido é importante não somente para o aconselhamento genético, visto que algumas condições podem ser mais brandas do que outras, mas também é importante do ponto de vista epidemiológico. Maiores estudos, que incluam uma correlação genótipo-fenótipo seriam indicados, entretanto, a raridade destas doenças pode tornar este estudo difícil.

Ainda sobre o HPO, além do número de entradas variar para cada doença, as entradas variam das mais genéricas às mais específicas. Também encontramos entradas com códigos diferentes, mas mesmo significado, tal como: desvio radial da mão (HP:0004059/HP:0009486), sinostose carpal (HP:0005048/HP:0009702) e displasia renal multicística/policística (HP:0000003/HP:0000113). Estes fatos podem deixar as comparações mais difíceis e menos fidedignas. Ainda assim, se usado com devida curadoria, o HPO é uma boa ferramenta para análise de fenótipos, uma vez que consegue reunir um bom número de fenótipos para várias doenças.

Pacientes com Síndrome de Roberts, Holt-Oram, e Okhiro já foram anteriormente diagnosticados como TE (Freeman *et al.*, 1974; Van Regemorter *et al.*, 1982; Kohlhase *et al.*, 2003), e são considerados os principais diagnósticos diferenciais para TE. Aqui nós enfatizamos essa similaridade e demonstramos que Síndrome de Roberts é de fato a que mais possui sobreposição de fenótipos com TE, e geralmente é o primeiro diagnóstico diferencial em casos de suspeita de TE.

Molecularmente essa sobreposição de fenótipos entre TE e Holt-Oram e Okhiro é explicada pela redução de TBX5 e SALL4 em resposta a talidomida: TBX5 é um fator de transcrição que desempenha um papel importante no desenvolvimento de membros e coração - é um alvo direto da talidomida, impedindo até 40% de se ligá-lo ao DNA (Khalil *et al.*, 2017). Além disso, o TBX5 também parece ativar a expressão de SALL4, outro importante fator de transcrição no desenvolvimento dos membros e que também é alvo da talidomida (Knobloch and Rüther, 2008; Donovan *et al.*, 2018). A sobreposição de TE e Roberts ainda não está bem correlacionada, mas acredita-se que pode ser explicada pelo comum mecanismo teratogênico de apoptose induzido durante o desenvolvimento embrionário (Cassina *et al.*, 2017; Donovan *et al.*, 2018). Com isso, reforçamos a importância da análise molecular em todos os pacientes com suspeita de TE para

fechar o diagnóstico diferencial, uma vez que as síndromes apresentam grande variabilidade fenotípica e não há garantia da presença de fenótipos específicos.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia com detalhes os fenótipos dos diagnósticos diferenciais para várias doenças similares à embriopatia por Talidomida. Enquanto Mansour *et al.* (2019) trabalham em um algoritmo para o diagnóstico diferencial e expõem alguns fenótipos úteis ao diagnóstico diferencial, aqui nós levantamos em maior detalhes as características clínicas para o diagnóstico diferencial para TE e doenças de fenótipos similares.

Referências

Afifi HH, Abdel-Salam GMH, Eid MM, Tosson AMS, Shousha WG, Abdel Azeem AA, Farag MK, Mehrez MI and Gaber KR (2016) Expanding the mutation and clinical spectrum of Roberts syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)* 56:154–162.

Alves LU, Perez ABA, Alonso LG, Otto PA and Mingroni-Netto RC (2016) Novel frameshift variant in gene SALL4 causing Okihiro syndrome. *Eur J Med Genet* 59:80–85.

Becker K, Beales PL, Calver DM and Mohammed SN (2002) Okihiro syndrome and acro-renal-ocular syndrome: clinical overlap, expansion of the phenotype, and absence of PAX2 mutations in two new families. *J Med Genet* 39:68–71.

Borozdin W, Boehm D, Leipoldt M, Wilhelm C, Reardon W, Clayton-Smith J, Becker K, Mühlendyck H, Winter R, Giray Ö *et al.* (2004a) SALL4 deletions are a common cause of Okihiro and acro-renal-ocular syndromes and confirm haploinsufficiency as the pathogenic mechanism. *J Med Genet.* 41:e113.

Borozdin W, Wright MJ, Hennekam CM, Hannibal MC, Crow YJ, Neumann TE and Kohlhase J (2004b) Novel mutations in the gene SALL4 provide further evidence for acro-renal-ocular and Okihiro syndromes being allelic entities, and extend the phenotypic spectrum. *J Med Genet.* 41:e102.

Cassina M, Cagnoli GA, Zuccarello D, Di Gianantonio E and Clementi M (2017) Human teratogens and genetic phenocopies. Understanding pathogenesis through human genes mutation. *Eur J Med Genet* 60:22–31.

Castilla EE, Cavalcanti DP, Dutra MG, Lopez Camelo JS, Paz JE and Gadow EC (1995) Limb reduction defects in South America. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 102:393–400.

Donovan KA, An J, Nowak RP, Yuan JC, Fink EC, Berry BC, Ebert BL and Fischer ES (2018) Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane radial ray syndrome. *Elife* 7:1–25.

Freeman MVR, Williams DW, Schimke RN and Temtamy SA (1974) The Roberts syndrome. *Clin Genet* 5:1–16.

Gerkes EH, van der Kevie-Kersemaekers AMF, Yakin M, Smeets DFCM and van Ravenswaaij-Arts CMA (2010) The importance of chromosome studies in Roberts syndrome/SC phocomelia and other cohesinopathies. *Eur J Med Genet* 53:40–44.

Goh ESY, Li C, Horsburgh S, Kasai Y, Kolomietz E and Morel CF (2010) The Roberts syndrome/SC Phocomelia spectrum - A case report of an adult with review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 152:472–478.

Gold NB, Westgate MN and Holmes LB (2011) Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet Part A* 155:1225–1235.

Houeijeh A, Andrieux J, Saugier-Veber P, David A, Goldenberg A, Bonneau D, Fouassier M, Journel H, Martinovic J, Escande F *et al.* (2011) Thrombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome: A clinical genetic series of 14 further cases. Impact of the associated 1q21.1 deletion on the genetic counselling. *Eur J Med Genet* 54:e471-477.

Keypour F, Naghi I and Behnam B (2013) Roberts-SC Phocomelia Syndrome (Pseudothalidomide Syndrome): A Case Report. *J Family Reprod Health* 7:45-47.

Khalil A, Tanos R, El-Hachem N, Kurban M, Bouvagnet P, Bitar F and Nemer G (2017) A HAND to TBX5 Explains the Link Between Thalidomide and Cardiac Diseases. *Sci Rep.* 7:1416.

Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard AM, Deardorff MA, Gillett PM, Ishman SL, Kerr LM, Levin A V., Mulder PA *et al.* (2018) Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Genet* 19:649–666.

Knobloch J and Rütter U (2008) Shedding light on an old mystery: Thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects. *Cell Cycle* 7:1121–1127.

Köhler S, Doelken SC, Mungall CJ, Bauer S, Firth H V, Bailleul-Forestier I, Black GCM, Brown DL, Brudno M, Campbell J *et al.* (2014) The Human Phenotype Ontology project: linking molecular biology and disease through phenotype data. *Nucleic Acids Res* 42:D966–D974.

Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L, Liebers M, Kispert A, Laccone F, Turnpenny P, Winter RM and Reardon W (2002) Okhiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet* 11:2979–2987.

Kohlhase J, Chitayat D, Kotzot D, Ceylaner S, Froster UG, Fuchs S, Montgomery T and Rösler B (2005) SALL4 mutations in Okhiro syndrome (Duane-radial ray syndrome), acro-renal-ocular syndrome, and related disorders. *Hum Mutat* 26:176–183.

Kohlhase J, Schubert L, Liebers M, Rauch A, Becker K, Mohammed SN, Newbury-Ecob R and Reardon W (2003) Mutations at the SALL4 locus on chromosome 20 result in a range of clinically overlapping phenotypes, including Okhiro syndrome, Holt-Oram syndrome, acro-renal-ocular syndrome, and patients previously reported to represent thalidomide embryopathy. *J Med Genet* 40:473–478.

Kowalski TW, Dupont Á de V, Rengel BD, Sgarioni E, Gomes J do A, Fraga LR, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2019) Assembling systems biology, embryo development and teratogenesis: What do we know so far and where to go next? *Reprod Toxicol* 88:67–75.

Lenz W (1988) A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38:203–215.

Mansour S, Baple E and Hall CM (2019) A clinical review and introduction of the diagnostic algorithm for thalidomide embryopathy (DATE). *J Hand Surg Eur Vol* 44:96–108.

Matthews SJ and McCoy C (2003) Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 25:342–395.

McGuirk CK, Westgate M-N and Holmes LB (2001) Limb Deficiencies in Newborn Infants. *Pediatrics* 108:E64.

Moro A and Invernizzi N (2017) The thalidomide tragedy: the struggle for victims' rights and improved pharmaceutical regulation. *Hist Ciencias, Saude - Manguinhos* 24:603–622.

Newman CGH (1986) The Thalidomide Syndrome: Risks of Exposure and Spectrum of Malformations. *Clin Perinatol* 13:555-573.

Schuler-Faccini L, Soares RCF, De Sousa ACM, Maximino C, Luna E, Schwartz IVD, Waldman C and Castilla EE (2007) New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* 79:671–672.

Sezer A, Kayhan G, Zenker M and Percin EF (2019) Hypopigmented patches in Roberts/SC phocomelia syndrome occur via aneuploidy susceptibility. *Eur J Med Genet* 62:103608.

Smithells RW and Newman CGH (1992) Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29:716–723.

Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y *et al.* (2016) The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinform* 54:1.30.1-1.30.33.

Van den Berg DJ and Francke U (1993) Roberts syndrome: A review of 100 cases and a new rating system for severity. *Am J Med Genet* 47:1104–1123.

Van Regemorter N, Haumont D, Kirkpatrick C, Viseur P, Jeanty P, Dodion J, Milaire J, Rooze M and Rodesch F (1982) Holt Oram Syndrome Mistaken for Thalidomide Embryopathy-Embryological Considerations. *Eur J Pediatr* 138:77-80.

Vargesson N (2019) The teratogenic effects of thalidomide on limbs. *J Hand Surg Eur Vol* 44:88–95.

Vega H, Trainer AH, Gordillo M, Crosier M, Kayserili H, Skovby F, Uzielli MLG, Schnur RE, Manouvrier S, Blair E *et al.* (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. *J Med Genet* 47:30–37.

Vianna FSL, Kowalski TW, Fraga LR, Sanseverino MTV and Schuler-Faccini L (2017) The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil. *Eur J Med Genet* 60:12–15.

Vianna FSL, Lopez-Camelo JS, Leite JCL, Sanseverino MTV, da Graça Dutra M, Castilla EE and Schüler-Faccini L (2011) Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *PLoS One* 6:e21735.

Vianna FSL, Schüler-Faccini L, Leite JCL, De Sousa SHC, Da Costa LMM, Dias MF, Morelo EF, Doriqui MJR, Maximino CM and Sanseverino MT V. (2013) Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: New cases and review of the main dysmorphological findings. *Clin Dysmorphol* 22:59–63.

Tabela 1 – Achados específicos de TE quando comparados às síndromes malformativas de fenótipo similar

Região anatômica	Anomalia
Sugestivo de TE¹	
Membros superiores	Amelia
Membros superiores	Deficiência proximal do úmero
Membros superiores	Fusão de ossos longos úmero-radial; úmero-ulnar
Membros superiores	Acrômio longo
Membros superiores	Hipoplasia do glenóide
Cinto escapular	Ombro deslocável
Cinto escapular	Ombro pontiagudo - projetando junção acrômio-clavicular
Membros inferiores	Deficiência Femoral Proximal Focal
Membros inferiores	Amelia de membro inferior
Ouvidos	Anotia
Trato Gastrointestinal	Vesícula biliar ausente
Não específica²	
Membros inferiores	Luxação da fíbula no joelho
Membros inferiores	Fusão de tálus e calcâneo
Membros inferiores	Hálux trifalângico; duplicação do hálux
Olhos	Lágrimas de crocodilo
Tórax	Pulmão direito bilobado
Genitália - Interna	Vagina septada/atresia
Ocasional³	
Trato Gastrointestinal	Apêndice ausente
Genitália - Interna	Ducto deferente interrompido, trompa de falópio interrompida
Região Oral	Paralisia do palato mole
Região Oral	Dentes ausentes/dentes sobrepostos
Coluna Vertebral	Espondilólise/espondilolistese L5
Sistema nervoso central	Epilepsia

Adaptado de Mansour *et al.* (2019) ¹Anomalias altamente sugestivas de TE (ocorre raramente em outras condições); ²Anomalias não específicas de TE (ocorrem em TE e outras condições);

³Malformação comum e ocasionalmente associado a TE.

Tabela 2 – Fenótipos de TE e diagnósticos diferenciais

Categoria	Fenótipo	Especificidade	Acro-renal-Ocular	Anemia de Fanconi	Baller-Gerold	Cornelia De Lange	Holt-Oram	Okhiro	Rapadilino	Roberts	SC Focomelia	TAR	Townes-Brocks	VACTERL
Membros superiores	Defeito pré-axial/defeito do raio radial de membro	Não específica ²	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Membros superiores	Polegar hipoplásico/polegar trifalângico/ausente	Não específica ²	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Membros superiores	Focomelia	Sugestivo de TE ¹				✓	✓			✓	✓	✓		
Membros superiores	Forma óssea anormal do úmero	Sugestivo de TE ¹	✓		✓		✓	✓					✓	
Membros superiores	Oligodactilia	Não específica ²			✓	✓				✓				
Membros superiores	Eminência tenar hipoplásica	Não específica ²					✓	✓						
Membros superiores	Amelia	Sugestivo de TE ¹												
Membros superiores	Deficiência proximal do úmero	Sugestivo de TE ¹												
Membros superiores (características radiológicas)	Rádio: forma óssea anormal	Sugestivo de TE ¹	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Membros superiores (características radiológicas)	Ossos do carpo: fusão; forma anormal; número reduzido	Sugestivo de TE ¹			✓		✓			✓		✓		
Membros superiores (características radiológicas)	Sinostose radio-ulnar	Não específica ²				✓	✓			✓				✓
Membros superiores (características radiológicas)	Acrômio longo	Sugestivo de TE ¹												
Membros superiores (características radiológicas)	Fusão de ossos longos úmero-radial; úmero-ulnar	Sugestivo de TE ¹												
Membros superiores (características radiológicas)	Hipoplasia do glenoide	Sugestivo de TE ¹												
Cinto escapular	Cintura escapular anormal	Sugestivo de TE ¹					✓						✓	
Cinto escapular	Ombro deslocável	Sugestivo de TE ¹												
Cinto escapular	Ombro ponteagudo - projetando junção acrômio-clavicular	Sugestivo de TE ¹												
Coluna Vertebral	Espondilólise/espondilolistese L5	Ocasional ³												
Tórax	Anormalidades da costela	Ocasional ³			✓	✓	✓						✓	✓
Tórax	Pulmão direito bilobado	Não específica ²												
Membros inferiores	Pé torto	Ocasional ³	✓			✓				✓		✓		
Membros inferiores	Focomelia	Sugestivo de TE ¹								✓	✓	✓ ⁴		
Membros inferiores	Luxação do quadril	Ocasional ³		✓		✓						✓		

Tabela 2 – Fenótipos de TE e diagnósticos diferenciais (continuação)

Categoria	Fenótipo	Especificidade	Acro-renal-Ocular	Anemia de Fanconi	Baller-Gerold	Cornelia De Lange	Holt-Oram	Okíhiro	Rapadilino	Roberts	SC Focomelia	TAR	Townes-Brocks	VACTERL
Membros inferiores	Polidactilia Pré-axial	Não específica ²						✓						✓
Membros inferiores	Tíbia curta/ausente/curvada	Não específica ²										✓		
Membros inferiores	Luxação congênita dos joelhos; ausência de ligamentos cruzados	Ocasional ³								✓				
Membros inferiores	Amelia de membro inferior	Sugestivo de TE ¹												
Membros inferiores	Deficiência Femoral Proximal Focal	Sugestivo de TE ¹												
Membros inferiores	Luxação da fíbula no joelho	Não específica ²												
Membros inferiores (características radiológicas)	Anormalidades do hálux: ausente/hipoplásico/curto	Não específica ²	✓											
Membros inferiores (características radiológicas)	Fusão de tálus e calcâneo	Não específica ²												
Membros inferiores (características radiológicas)	Hálux trifalângico; duplicação do hálux	Não específica ²												
Face	Fenda labio palatina	Ocasional ³		✓	✓	✓			✓	✓		✓		✓
Face	Micrognatia	Ocasional ³		✓	✓	✓				✓	✓	✓		
Face	Hemangioma Facial	Não específica ²			✓					✓	✓			✓
Face	Paralisia facial (unilateral> bilateral)	Não específica ²						✓						
Face	Úvula bífida	Ocasional ³			✓									
Face	Dentes ausentes/dentes sobrepostos	Ocasional ³												
Face	Paralisia do palato mole	Ocasional ³												
Ouvidos	Surdez	Não específica ²	✓	✓	✓	✓		✓	✓			✓	✓	
Ouvidos	Anormalidade do canal semicircular/atresia do canal auditivo ou estreito	Não específica ²				✓		✓						
Ouvidos	Microtia	Sugestivo de TE ¹												✓
Ouvidos	Anotia	Sugestivo de TE ¹												
Olhos	Miopia; visão deficiente; ptose; estrabismo/ambliopia	Ocasional ³	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓	✓	
Olhos	Coloboma	Não específica ²	✓			✓		✓		✓				✓
Olhos	Anoftalmia/microftalmia	Não específica ²	✓	✓				✓		✓				✓
Olhos	Anomalia de Duane	Sugestivo de TE ¹						✓						✓

Tabela 2 – Fenótipos de TE e diagnósticos diferenciais (continuação)

Categoria	Fenótipo	Especificidade	Acro-renal-Ocular	Anemia de Fanconi	Baller-Gerold	Cornelia De Lange	Holt-Oram	Okíhiro	Rapadilino	Roberts	SC Focomelia	TAR	Townes-Brocks	VACTERL
Olhos	Lágrimas de crocodilo	Não específica ²												
Coração	Defeito do septo ventricular	Não específica ²				✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
Coração	Defeito do septo atrial	Não específica ²		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
Coração	Persistência do canal arterial	Não específica ²		✓		✓				✓			✓	✓
Coração	Tetralogia de Fallot	Não específica ²	✓	✓								✓	✓	✓
Coração	<i>Situs inversus</i> /anomalias conotruncais	Não específica ²												✓
Trato Gastrointestinal	Atresia/estenose anal	Não específica ²		✓	✓			✓					✓	✓
Trato Gastrointestinal	Atresia/estenose duodenal	Sugestivo de TE ¹		✓									✓	
Trato Gastrointestinal	Atresia esofágica/fístula traqueoesofágica	Não específica ²		✓										✓
Trato Gastrointestinal	Divertículo de Meckel	Ocasional ³		✓								✓		
Trato Gastrointestinal	Estenose pilórica	Ocasional ³				✓								
Trato Gastrointestinal	Hérnia inguinal	Ocasional ³				✓								
Trato Gastrointestinal	Apêndice ausente	Ocasional ³												
Trato Gastrointestinal	Vesícula biliar ausente	Sugestivo de TE ¹												
Trato urinário	Malformação renal (qualquer)	Não específica ²	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓	✓	✓
Trato urinário	Megaureter; refluxo vesico-ureteral; bexiga inerte	Não específica ²	✓		✓	✓		✓					✓	✓
Trato urinário	Fístula retovaginal, fístula uretrovaginal	Não específica ²			✓								✓	
Genitália - Interna	Útero Bicornio	Ocasional ³		✓						✓				
Genitália - Interna	Ausência de gônadas	Não específica ²		✓										
Genitália - Interna	Ducto deferente interrompido, trompa de falópio interrompida	Ocasional ³												
Genitália - Interna	Vagina septada/atresia	Não específica ²												
Genitália - externa	Micropenis; hipospádia escrotal/hipoplasia labial	Não específica ²		✓	✓					✓			✓	✓
Sistema nervoso central	Atraso de fala	Ocasional ³				✓								
Sistema nervoso central	Epilepsia	Ocasional ³												

TE: embriopatia por talidomida; TAR: Trombocitopenia-Aplasia Radial (*Thrombocytopenia-absent radius*); VACTERL: associação de defeitos vertebrais, atresia anal, defeitos cardíacos, fístula traqueoesofágica, anomalias renais e anormalidades nos membros (*Vertebral defects, Anal atresia, Cardiac defects, Tracheo-Esophageal fistula, Renal anomalies, and Limb abnormalities association*);

¹Altamente sugestivos de TE (ocorre raramente em outras condições); ²Características não específicas de TE (ocorrem em TE e outras condições); ³Malformação comum e ocasionalmente associado a TE;

⁴ocorrência rara, ver Houeijeh, 2011. Tabela adaptada de Mansour *et al.*, 2019. HPO- *Human Phenotype Ontology* (<https://hpo.jax.org/app/>).

Tabela 3 – Anomalias congênitas altamente sugestivas da TE e anomalias diferenciais em síndromes malformativas semelhantes à TE

Síndrome	Anomalias diferenciais
Embriopatia por Talidomida ¹	Amelia de membros superiores e/ou inferiores; Anotia; Cintura escapular anormal: acrômio longo, hipoplasia do glenóide, ombro deslocável, ombro ponteagudo - projetando junção acrômio-clavicular; Deficiência proximal do úmero; Deficiência proximal focal do fêmur; Fusão de ossos longos úmero-radial, úmero-ulnar; Vesícula biliar ausente.
Anemia de Fanconi	Anemia sideroblástica responsiva à piridoxina HP:000522; Anormalidade da pigmentação da pele HP: 0001000; Hiperpigmentação irregular HP:0007400, Manchas de pele hipopigmentadas HP:0001053 , Várias manchas café-com-leite HP:0007565; Aplasia/hipoplasia da úvula HP:0010293; Dolicocefalia HP:0000268, Fissura palpebral em forma de amêndoa HP:0007874; Instabilidade cromossômica HP: 0003220 ; Hiperreflexia HP:0001347; Mielodisplasia HP:0002863; Testa inclinada HP:0000340.
Associação VACTERL	Anencefalia HP:0002323; Anormalidade do disco intervertebral HP:0005108; Aplasia/hipoplasia dos pulmões HP:0006703 ; Artéria umbilical única HP:0001195; Encefalocele occipital HP:0002085; Estenose laríngea HP:0001602; Estenose traqueal HP:0002777 ; Genitália ambígua HP:0000062; Hemangioma cavernoso HP:0001048; Laringomalácia HP:0001601; Medula ancorada (presa) HP:0002144; Morfologia do sacro anormal HP:0005107; Obstrução da junção ureteropélvica HP:0000074; Onfalocele HP:0001539; Patent urachus HP:0010479.
Síndrome Acro-renal-Ocular	Divertículo da bexiga HP:0000015; Falange distal do polegar curta HP:0009650 ; Fusão vertebral HP:0002948.
Síndrome Baller-Gerold	Boca estreita HP:0000160; Braquitturicefalia HP:0000244 ; Fronte plana HP:0004425; Hipotelorismo HP:0000601; Osteossarcoma HP:0002669; Poiquilodermia HP:0001029; Polimicrogíria HP:0002126; Ponte nasal estreita HP:0000446; Ponte nasal proeminente HP:0000426; Rosto fino HP:0000275; Sinostose bicoronal HP:0011318.
Síndrome Cornelia de Lange	Aplasia/hipoplasia do cerebelo HP:0007360; Atrofia cortical cerebral HP:0002120; Cabeça radial luxada HP:0003083; Cantos da boca inclinados para baixo HP:0002714; Cílios encaracolados HP:0007665; Cílios longos HP:0000527; Contorno dos lábios apagado HP:0000233 ; Cutis marmorata HP:0000965; Dentes amplamente espaçados HP:0000687 ; Duplicação de órgãos internos HP:0005217; Filtro longo HP:0000343; Hirsutismo generalizado HP:0002230; Implantação baixa dos cabelos na fronte HP:0000294; Implantação baixa dos cabelos na nuca HP:0002162 ; Lábio superior fino HP:0000219; Mão pequena HP:0200055; Maturação esquelética atrasada HP:0002750; Micromelia HP:0002983 ; Morfologia anormal da incisura HP:0031228; Pé curto HP:0001773 ; Phylis bulbi HP:0000667; Ponte nasal depressa HP:0005280; Sinofre HP:0000664; Sobrancelha arqueada HP:0002553; Sobrancelha grossa HP:0000574 ; Volvulus HP:0002580.
Síndrome de Holt-Oram	Anomalia de Sprengel HP:0000912; Aplasia do músculo peitoral maior HP:0009751; Cifose HP:0002808; Clavículas curtas HP:0000894; Ectrodactilia HP:0001171 ; Escoliose torácica HP:0002943; Ombros inclinados para baixo HP:0200021.
Síndrome de Okhiro	Conduto auditivo externo em forma de fenda HP:0008588; Hipoplasia do peitoral HP:0008998.
Síndrome de Rapadilino	Fissura palpebral estreita HP:0045025; Pele moteada HP:0001070; Queixo curto HP:0000331; Rosto comprido HP:0000276.
Síndrome de Roberts	Baço acessório HP:0001747; Encefalocele frontal HP:0007330; Higroma cístico HP:0000476; Hipertrofia do clitóris HP:0008665; Lábios menores aumentados HP:0008683; Lóbulo da orelha ausente HP:0000387; Opacificação do estroma corneano HP:0007759; Órbitas rasas HP:0000586; Pênis longo HP:0000040; Ponte nasal larga HP:0000431.
Síndrome de Townes-Brocks	Anormalidade do tragus HP:0009912; Boca grande HP:0000154; Dermóide limbal HP:0001140; Desvio ulnar do dedo HP:0009465; Fossa pré-auricular HP:0000384 ; Malformação de Arnold-Chiari HP:0002308; Nódulo subcutâneo HP:0001482; Orelha de sátiro HP:0030676; Orelha Stahl HP:0100015; Poço pré-auricular HP:000446; Útero bífido HP:0000136.
Síndrome SC-Focomelia	Cabelo claro HP:0002286; Contratura do quadril HP:0003273; Ossos wormianos HP:0002645.
Síndrome TAR	Alergia ao leite de vaca HP:0100327; Aplasia do útero HP:0000151; <i>Cavum septum pellucidum</i> HP:0002389; Clavícula em forma de gancho HP:0000895; Coxa valga HP:0002673; Fronte ampla HP:0000348; <i>Genu varum</i> HP:0002970; <i>Nevus flammeus</i> da testa HP:0007413.

¹Anomalias altamente sugestivas, de acordo com Mansour (2019) não encontradas nas outras síndromes; Fenótipos sublinhados são frequentes na síndrome de acordo com Orphanet e GARD (para Rapadilino e Okhiro os dados não estavam disponíveis), HP: código do HPO para cada anomalia.

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okihiro* OMIM_607323	Rapadilino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
Cabeça e pescoço	Agenesia do corpo caloso	HP:0001274			✓								✓	
	Anormalidade da nasofaringe	HP:0001739						✓						✓
	Assimetria facial	HP:0000324		✓				✓					✓	
	Atresia de coanas	HP:0000453		✓		✓		✓						✓
	Blefarofimose	HP:0000581							✓				✓	
	Bossa frontal	HP:0002007		✓	✓ ^{1,2}									
	Braquicefalia	HP:0000248			✓ ²	✓ ^{1,2}				✓ ^{1,2}		✓		
	Epicanto	HP:0000286	✓	✓	✓			✓						
	Estenose coanal	HP:0000452			✓			✓						
	Fenda palatina	HP:0000175		✓	✓	✓			✓	✓		✓		✓
	Fissura do lábio superior	HP:0000204				✓				✓	✓			
	Fissura palpebral curta	HP:0012745	✓	✓										
	Fissuras palpebrais oblíquas para baixo	HP:0000494			✓						✓			
	Fontanelas grandes	HP:0000239			✓ ^{1,2}									✓
	Hipoplasia alar	HP:0000430			✓					✓ ^{1,2}	✓			
	Malar Plano	HP:0000272								✓ ^{1,2}		✓		
	Microcefalia	HP:0000252		✓		✓ ^{1,2}				✓ ^{1,2}	✓		✓	
	Micrognatia	HP:0000347		✓	✓	✓ ^{1,2}				✓	✓	✓		
	Narinas antevertidas	HP:0000463				✓ ^{1,2}						✓		
Nariz curto	HP:0003196			✓	✓ ^{1,2}									

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okhiro* OMIM_607323	Rapadilino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
	Palato alto e estreito	HP:0002705				✓			✓					
	Palato alto	HP:0000218		✓	✓	✓ ^{1,2}			✓	✓				
	Pescoço curto	HP:0000470				✓ ^{1,2}				✓				
	Testa larga	HP:0000337			✓							✓		
Cardiovascular	Anormalidade da morfologia do sistema	HP:0030680		✓	✓	✓	✓ ²			✓			✓	✓
	Defeito do septo atrial	HP:0001631		✓		✓	✓	✓		✓		✓	✓	
	Defeito do Septo ventricular	HP:0001629				✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓
	Morfologia anormal do coração	HP:0001627		✓	✓									
	Morfologia anormal do septo cardíaco	HP:0001671		✓	✓							✓	✓	✓
	Morfologia aórtica anormal	HP:0001679		✓				✓						
	Persistência do canal arterial	HP:0001643		✓				✓			✓		✓	✓
Crescimento	Tetralogia de Fallot	HP:0001636	✓	✓								✓	✓	✓
	Atraso de crescimento	HP:0001510		✓	✓ ²									
	Atraso de puberdade	HP:0000823				✓							✓	
	Baixa estatura	HP:0004322		✓ ^{1,2}	✓ ^{1,2}	✓ ^{1,2}			✓		✓	✓	✓	
	Baixo ganho ponderal	HP:0001508				✓							✓	✓
	Crescimento intra-uterino restrito	HP:0001511		✓	✓	✓								✓
Fenótipo Celular	Restrição de crescimento pós-natal	HP:0008897	✓							✓ ^{1,2}				✓
	Separação prematura de heterocromatina centromérica	HP:0003616								✓	✓			

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okihiro* OMIM_607323	Rapadilino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
Membros	Agnesia de rádio	HP:0003974		✓	✓		✓	✓			✓	✓ ^{1,2}		✓
	Anormalidade da ulna	HP:0002997		✓		✓								
	Anormalidade do membro superior	HP:0002817		✓ ²						✓ ²				
	Anormalidade dos ossos do carpo	HP:0001191			✓		✓							
	Anormalidade dos ossos metacarpo	HP:0001163			✓		✓			✓				
	Anormalidade do pé	HP:0001760		✓									✓	
	Aplasia de ossos do metacarpo	HP:0010048			✓			✓						
	Aplasia/Hipoplasia da ulna	HP:0006495										✓ ¹		
	Aplasia/Hipoplasia da patela	HP:0006498			✓				✓			✓		
	Aplasia/Hipoplasia do polegar	HP:0009601			✓ ^{1,2}					✓ ^{1,2}				
	Aplasia/Hipoplasia do rádio	HP:0006501		✓ ²	✓ ^{1,2}	✓ ^{1,2}			✓					✓
	Aplasia da ulna	HP:0003982					✓				✓			
	Aplasia patelar	HP:0006443								✓		✓		
	Clinodactilia	HP:0030084								✓	✓			
	Clinodactilia do 5º dedo	HP:0004209		✓		✓				✓ ^{1,2}		✓	✓	
	Colocação proximal do polegar	HP:0009623				✓ ^{1,2}				✓ ^{1,2}				
	Contratura congênita de cotovelo	HP:0002987				✓				✓				
	Contratura congênita do joelho	HP:0006380								✓	✓			
	Desvio radial da mão	HP:0004059/ HP:0009486		✓					✓					

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okhiro* OMIM_607323	Rapadiino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
	Desvio radial do dedo	HP:0009466								√ ^{1,2}	√			
	Duplicação completa da falange do	HP:0009943		√						√ ^{1,2}				
	Duplicação parcial da falange do polegar	HP:0009944					√						√	
	Falange do hálux ampla	HP:0010059	√										√	
	Focomelia	HP:0009829				√	√			√ ^{1,2}	√	√		
	Hipoplasia da ulna	HP:0003022	√	√	√		√	√						
	Hipoplasia do rádio	HP:0002984			√	√	√	√		√ ^{1,2}				√
	Limitação da extensão de cotovelo	HP:0001377				√	√							
	Luxação do quadril	HP:0002827		√		√						√		
	Morfologia anormal do polegar	HP:0001172	√ ²	√ ²										
	Oligodactilia da mão	HP:0001180			√ ^{1,2}	√				√				
	Ossos longos curvos	HP:0006487			√					√ ^{1,2}				
	Pé plano	HP:0001763		√				√					√	
	Polegar ausente	HP:0009777		√			√	√	√			√		
	Polegar curto	HP:0009778	√ ²	√				√				√		√
	Polegar largo	HP:0011304					√					√	√	
	Polegar trifalângico	HP:0001199	√	√			√	√					√ ^{1,2}	√
	Polidactilia Pré-axial	HP:0100258						√						√
	Polidactilia pré-axial de mão	HP:0001177	√										√ ^{1,2}	√
	Sinal da sandália	HP:0001852	√					√		√				

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okhiro* OMIM_607323	Rapadilino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
	Sindactilia	HP:0001159					✓	✓		✓				✓
	Sindactilia dos dedos das mãos	HP:0006101	✓	✓			✓			✓	✓			✓
	Sindactilia dos dedos dos pés	HP:0001770	✓	✓		✓ ^{1,2}							✓	
	Sindactilia dos dedos 2-3 dos pés	HP:0004691				✓							✓	
	Sinostose carpal	HP:0005048/ HP:0009702			✓							✓		
	Sinostose radioulnar	HP:0002974				✓	✓			✓				✓
	Talipes – pé torto	HP:0001883	✓			✓								
	Úmero encurtado	HP:0005792	✓		✓		✓	✓						
Musculatura	Hérnia diafragmática congênita	HP:0000776				✓								✓
	Hipoplasia da eminência tenar	HP:0001245					✓	✓						
Neoplasia	Hemangioma capilar intermediário	HP:0007452			✓					✓	✓			
Olho	Anomalia de Duane	HP:0009921						✓					✓	
	Anormalidade da visão	HP:0000504		✓									✓	
	Astigmatismo	HP:0000483		✓		✓								
	Atrofia óptica	HP:0000648			✓	✓								
	Catarata	HP:0000518	✓	✓		✓		✓		✓			✓	
	Coloboma	HP:0000589	✓							✓				
	Coloboma coriorretiniano	HP:0000567	✓										✓	
	Coloboma da íris	HP:0000612	✓					✓					✓	

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okihiro* OMIM_607323	Rapadilino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
	Coloboma do nervo óptico	HP:0000588	✓			✓								
	Deficiência visual	HP:0000505	✓	✓										
	Esclera azul	HP:0000592								✓	✓			
	Estrabismo	HP:0000486	✓	✓	✓	✓		✓				✓	✓	
	Glaucoma	HP:0000501				✓				✓				
	Hipertelorismo	HP:0000316	✓	✓	✓			✓		✓ ^{1,2}				
	Hipoplasia do disco óptico	HP:0007766	✓					✓						
	Microcórnea	HP:0000482	✓			✓								
	Microftalmia	HP:0000568	✓	✓				✓		✓			✓	
	Miopia	HP:0000545			✓	✓								
	Nistagmo	HP:0000639	✓	✓	✓	✓				✓				
	Proptose	HP:0000520		✓	✓ ^{1,2}	✓				✓				
Ptose	HP:0000508	✓	✓		✓						✓			
Orelha	Deficiência auditiva	HP:0000365		✓					✓				✓	
	Deficiência auditiva condutiva	HP:0000405	✓		✓	✓								
	Macrotia	HP:0000400				✓							✓	
	Malformação da orelha externa	HP:0008572		✓						✓		✓ ^{1,2}		
	Orelhas baixo implantadas	HP:0000369				✓				✓				
	Orelhas com rotação baixa e rotação posterior	HP:0000368			✓	✓						✓		✓

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okhiro* OMIM_607323	Rapadilino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
	Orelhas posteriormente giradas	HP:0000358								✓	✓			
	Perda auditiva neurosensorial	HP:0000407	✓			✓		✓				✓	✓	
Pele, cabelo e unhas	Cabelo esparso	HP:0008070								✓ ^{1,2}	✓			
	Manchas <i>café-au-lait</i>	HP:0000957		✓						✓				
	Pregas palmares transversais unilaterais e bilaterais	HP:0007598				✓				✓				
Pré-natal e Nascimento	Prematuridade	HP:0001622				✓				✓				✓ ^{1,2}
	Polidrâmnios	HP:0001561								✓				✓ ^{1,2}
Sistema digestivo	Anus anteriorizado	HP:0001545			✓								✓	
	Atresia anal	HP:0002023		✓	✓			✓					✓ ^{1,2}	✓ ^{1,2}
	Divertículo de Meckel	HP:0002245		✓							✓			
	Estenose anal	HP:0002025						✓					✓	
	Fístula traqueoesofágica	HP:0002575		✓										✓
	Refluxo gastroesofágico	HP:0002020				✓ ^{1,2}							✓	
Sistema esquelético	Anormalidade das costelas	HP:0000772					✓						✓	✓
	Defeito de segmentação vertebral	HP:0003422	✓											✓
	Escoliose	HP:0002650		✓	✓		✓	✓			✓			✓
	Fusão de vértebras cervicais	HP:0002949						✓			✓			
	Morfologia vertebral anormal	HP:0003468			✓		✓						✓	✓
	<i>Pectus excavatum</i>	HP:0000767				✓	✓							

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okhiro* OMIM_607323	Rapadilino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
	Rigidez articular	HP:0001387				✓	✓ ^{1,2}							
Sistema geniturinário	Agenesia renal	HP:0000104		✓				✓						✓
	Anormalidade do rim	HP:0000077			✓						✓	✓	✓	
	Anormalidade do útero	HP:0000130		✓		✓							✓	
	Criptorquidismo	HP:0000028		✓		✓				✓			✓	✓
	Displasia renal	HP:0000110											✓	✓
	Displasia renal multicística/policística	HP:0000003/ HP:0000113				✓				✓			✓	✓
	Ectopia renal com fusão	HP:0004736	✓ ²					✓						
	Escroto bífido	HP:0000048											✓	✓
	Fístula retovaginal	HP:0000143			✓								✓ ^{1,2}	
	Hidronefrose	HP:0000126			✓			✓						✓
	Hipoplasia do pênis	HP:0008736				✓			✓				✓	✓
	Hipoplasia renal	HP:0000089				✓		✓					✓	
	Hipoplasia renal/aplasia	HP:0008678	✓	✓										
	Hipospádia	HP:0000047		✓		✓				✓			✓	✓
	Insuficiência renal	HP:0000083		✓		✓							✓	
	Localização anormal de rim	HP:0100542		✓	✓									
	Má-rotação renal	HP:0004712	✓ ²						✓					
Morfologia renal anormal	HP:0012210		✓		✓									

Tabela 4 – Lista completa dos fenótipos de doenças genéticas similares à TE

Categoria	Termo HPO	ID HPO	Acro-renal-Ocular ORPHA_959	Anemia de Fanconi OMIM_227650/ORPHA_84	Baller-Gerold OMIM_218600/ORPHA_1225	Cornelia de Lange OMIM_300590/ORPHA_199	Holt-Oram OMIM_142900/ORPHA_392	Okhiro* OMIM_607323	Rapadiino* OMIM_266280	Roberts/SC		TAR OMIM_274000/ORPHA_3320	Townes-Brocks OMIM_107480/ORPHA_857	VACTERL OMIM_192350/ORPHA_887
										Roberts OMIM_268300/ORPHA_3103	SC Focomelia* OMIM_269000			
	Refluxo vesico-ureteral	HP:0000076	✓		✓	✓		✓					✓	✓
	Rim ectópico	HP:0000086		✓		✓							✓	✓
	Rim em ferradura	HP:0000085	✓ ²	✓				✓		✓	✓			
	Útero bicorno	HP:0000813		✓						✓				
Sistema hematológico	Anemia	HP:0001903		✓ ²							✓			
	Trombocitopenia	HP:0001873		✓ ^{1,2}		✓				✓	✓ ^{1,2}			
Sistema nervoso	Atraso no desenvolvimento global	HP:0001263		✓						✓	✓	✓	✓	
	Convulsões	HP:0001250			✓	✓					✓	✓		
	Deficiência intelectual	HP:0001249		✓	✓	✓ ²			✓	✓	✓	✓	✓	
	Espinha bífida	HP:0002414		✓								✓		✓
	Espinha bífida oculta	HP:0003298			✓			✓						
	Hidrocefalia	HP:0000238		✓	✓					✓				
	Megacólon aganglionar	HP:0002251	✓	✓				✓						
	Paralisia do nervo craniano	HP:0006824		✓						✓			✓	
Ventriculomegalia	HP:0002119		✓		✓									
Tecido	Hérnia umbilical	HP:0001537		✓									✓	
Outros achados														
Acro-Renal-Ocular	Anormalidade do rádio (HP:0002818)² ; divertículo da bexiga (HP:0000015); falange distal do polegar curta (HP:0009650)² ; fusão vertebral (HP:0002948); hálux curto (HP:0010109).													

<p>Anemia de Fanconi</p>	<p>Anemia sideroblástica responsiva à piridoxina (HP:0005522)^{1,2}; anormalidade auditiva (HP:0000364); anormalidade da morfologia do fêmur (HP:0002823); anormalidade da morfologia do sistema nervoso (HP:0012639); anormalidade do eixo hipotalâmico-hipofisário (HP:0000864); anormalidade do fígado (HP:0001392); anormalidade do olho (HP:0000478); anormalidade do prepúcio (HP:0100587); anormalidade do sistema urinário (HP:0000079); anormalidade da pigmentação da pele (HP: 0001000)²; anormalidade do sangue e dos tecidos sanguíneos (HP: 0001871)²; aplasia/hipoplasia da íris (HP:0008053); aplasia/hipoplasia da úvula (HP:0010293); aplasia/hipoplasia dos dedos (HP:0006265); azoospermia (HP:0000027); cardiomiopatia hipertrófica (HP:0001639); dedos tortos (HP:0100760); densidade mineral óssea reduzida (HP:0004349); diminuição da fertilidade nos homens (HP:0012041); dolicocefalia (HP:0000268); estenose duodenal (HP:0100867); excisão deficiente de dímeros de pirimidina induzidos por UV no DNA (HP:0003213); fase prolongada de G2 do ciclo celular (HP:0003214); fissura palpebral em forma de amêndoa (HP:0007874); fissura palpebral oblíqua para cima (HP:0000582); hidroureter (HP:0000072); hiperpigmentação irregular (HP:0007400)^{1,2}; hiperreflexia (HP:0001347); hipogonadismo (HP:0000135); hipogonadismo hipergonadotrófico (HP:0000815); infecções recorrentes do trato urinário (HP:0000010); infertilidade masculina (HP:0003251); instabilidade cromossômica (HP: 0003220)^{1,2}; leucemia (HP:0001909); leucopenia (HP:0001882)^{1,2}; malformação arteriovenosa (HP:0100026); manchas de pele hipopigmentadas (HP:0001053)^{1,2}; mielodisplasia (HP:0002863); morfologia anormal da artéria carótida (HP:0005344); morfologia anormal da pálpebra (HP:0000492); morfologia anormal da válvula aórtica (HP:0001646); neoplasma (HP:0002664); neutropenia (HP:0001875); oligodramnio (HP:0001562); palidez anêmica (HP:0001017); pancitopenia (HP:0001876); pequeno para a idade gestacional (HP:0001518); perda de peso (HP:0001824); quebra cromossômica induzida por agentes clastogênicos (HP:0003221); reticulocitopenia (HP:0001896); sistema coletor duplicado (HP:0000081); suscetibilidade a hematomas (HP:0000978); testa inclinada (HP:0000340); testículo ausente (HP:0010469); várias manchas café-com-leite (HP:0007565).</p>
<p>Baller-Gerold</p>	<p>Afalangia em mãos (HP:0005886); anormalidade do ureter (HP:0000069); aplasia óssea do carpo (HP:0004231); boca estreita (HP:0000160); braquitricefalia (HP:0000244)^{1,2}; craniossinostose coronal (HP:0004440); craniossinostose lambdoide (HP:0004443); craniossinostose sagital (HP:0004442); curvatura ulnar (HP:0003031); fístula perineal (HP:0004871); fístula urogenital (HP:0100589); fronte plana (HP:0004425); fusão de costela (HP:0000902); hipoplasia patelar (HP:0003065); hipotelorismo (HP:0000601); linfoma (HP:0002665); limitação de movimento do cotovelo (HP:0002996); limitação de movimento do ombro (HP:0006467); má absorção (HP:0002024); má evolução ponderal na infância (HP:0001531)^{1,2}; osteossarcoma (HP:0002669); poiquilodermia (HP:0001029); polimicrogria (HP:0002126); ponte nasal estreita (HP:0000446); ponte nasal proeminente (HP:0000426); rosto fino (HP:0000275); sinostose bicoronal (HP:0011318); sistema venoso esplenoportal anômalo (HP:0005201); úvula bífida (HP:0000193).</p>
<p>Cornelia De Lange</p>	<p>1º metacarpo curto (HP:0010034)^{1,2}; amenorreia primária (HP:0000786); anormalidade comportamental (HP:0000708); anormalidade do movimento pré-natal (HP:0001557); ansiedade (HP:0000739); aplasia/Hipoplasia do cerebelo (HP:0007360); atraso de crescimento pós-natal grave (HP:0008850); atresia do canal auditivo externo (HP:0000413)^{1,2}; atrofia cortical cerebral (HP:0002120); aumento da translucência nucal (HP:0010880); autismo (HP:0000717); blefarite (HP:0000498); contorno dos lábios apagado (HP:0000233)^{1,2}; cabeça radial hipoplásica (HP:0003997); cabeça radial luxada (HP:0003083); cantos da boca inclinados para baixo (HP:0002714)^{1,2}; choro fraco (HP:0001612); cílios encaracolados (HP:0007665)^{1,2}; cílios longos (HP:0000527)^{1,2}; cisto renal (HP:0000107); comportamento autoagressivo (HP:0100716); comportamento obsessivo-compulsivo (HP:0000722); costelas supranumerárias (HP:0005815); cutis marmorata (HP:0000965); deficiência intelectual grave (HP:0010864)^{1,2}; dentes amplamente espaçados (HP:0000687)^{1,2}; diferenciação corticomedular renal reduzida (HP:0005565); dificuldades alimentares na infância (HP:0008872); disfunção neurológica da fala (HP:0002167); displasia do quadril (HP:0001385); distúrbios de sono (HP:0002360); duplicação de órgãos internos (HP:0005217); erupção tardia dos dentes (HP:0000684)^{1,2}; estenose pilórica (HP:0002021); esterno curto (HP:0000879); fala atrasada e desenvolvimento da linguagem (HP:0000750); filtro longo (HP:0000343)^{1,2}; genitália externa masculina hipoplásica (HP:0000050); grandes lábios hipoplásicos (HP:0000059); hérnia de hiato (HP:0002036); hérnia inguinal (HP:0000023); hipertonia (HP:0001276)^{1,2}; hipotonia muscular (HP:0001252); hirsutismo (HP:0001007); hirsutismo generalizado (HP:0002230)^{1,2}; inflamação na orelha (HP:0000388);</p>

	implantação baixa dos cabelos na frente (HP:0000294) ^{1,2} ; implantação baixa dos cabelos na nuca (HP:0002162) ^{1,2} ; lábio superior fino (HP:0000219); luxação do cotovelo (HP:0003042); má-rotação de cólon (HP:0004785); mamilos hipoplásicos (HP:0002557); mão pequena (HP:0200055) ^{1,2} ; má-rotação intestinal (HP:0002566); maturação esquelética atrasada (HP:0002750) ^{1,2} ; micromelia (HP:0002983) ^{1,2} ; morfologia anormal da incisura (HP:0031228); morfologia anormal do umbigo (HP:0001551); neuropatia periférica (HP:0009830); obesidade troncular (HP:0001956); oligodactilia (HP:0012165); pé curto (HP:0001773) ^{1,2} ; <i>physis bulbi</i> (atrofia ocular) (HP:0000667); pneumonia (HP:0002090); ponte nasal deprimida (HP:0005280) ^{1,2} ; prega palmar transversal única (HP:0000954); proteinúria (HP:0000093); sobrançelha arqueada (HP:0002553) ^{1,2} ; sobrançelha grossa (HP:0000574) ^{1,2} ; sinofre (HP:0000664) ^{1,2} ; transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (HP:0007018); vôlvulo (HP:0002580); voz anormalmente grave (HP:0010300) ^{1,2} .
Holt-Oram	Anomalia de Sprengel (HP:0000912); anormalidade da clavícula (HP:0000889) ^{1,2} ; anormalidade do úmero (HP:0003063); aplasia do músculo peitoral maior (HP:0009751); bloqueio atrioventricular (HP:0001678); bloqueio atrioventricular de primeiro grau (HP:0011705); cifose (HP:0002808); clavículas curtas (HP:0000894); clinodactilia dos dedos (HP:0040019); defeito do canal atrioventricular (HP:0006695); defeito do septo atrial (<i>ostium secundum</i>); (HP:0001684). dígito curto (HP:0011927); ectrodactilia (HP:0001171) ^{1,2} ; escoliose torácica (HP:0002943); fibrilação atrial paroxística (HP:0004757); lado esquerdo do coração hipoplásico (HP:0004383); ombros inclinados para baixo (HP:0200021); retorno venoso pulmonar anômalo (HP:0010772).
Okhiro	Abdução ocular prejudicada (HP:0000634); adução ocular prejudicada (HP:0000542); coloboma retiniano (HP:0000480); conduto auditivo externo em forma de fenda (HP:0008588); convergência ocular prejudicada (HP:0000619); dilatação cardiovascular (HP:0002617); fenda palpebral estreitando-se em adução (HP:0000661); hipoplasia de músculo do membro superior (HP:0009016); hipoplasia do peitoral (HP:0008998); paralisia facial (HP:0010628).
Rapadilino	Articulações interfalângicas rígidas (HP:0005198); diarreia (HP:0002014); fissura palpebral estreita (HP:0045025); luxação recorrente (HP:0001373); nariz fino - delgado (HP:0000417); pele moteada (HP:0001070); queixo curto (HP:0000331); rosto comprido (HP:0000276).
Roberts	Anormalidade do pavilhão (HP:0000377); anormalidade do trato biliar (HP:0001080); crescimento intra-uterino restrito grave (HP:0008846) ^{1,2} ; baço acessório (HP:0001747); braquidactilia (HP:0001156); cadeias supra-orbitais subdesenvolvidas (HP:0009891); coloboma palpebral (HP:0000625); contratura congênita do punho (HP:0001239); contratura congênita progressiva (HP:0005876); contratura congênita do tornozelo (HP:0006466); craniossinostose (HP:0001363); displasia renal policística (HP:0000113); encefalocele frontal (HP:0007330); encurtamento mesomélico do braço (HP:0005011) ^{1,2} ; higroma cístico (HP:0000476); hipertrofia do clitóris (HP:0008665); lábios menores aumentados (HP:0008683); lóbulo da orelha ausente (HP:0000387); nariz fino - estreito (HP:0009933); opacificação do estroma corneano (HP:0007759); órbitas rasas (HP:0000586); pênis longo (HP:0000040); ponte nasal larga (HP:0000431); sinostose de ossos do carpo (HP:0005048); <i>talipes equinovagum</i> – pé torto (HP:0001772); tetrafocomelia (HP:0030721).
SC Focomelia	Cabelo claro (HP:0002286); contratura do quadril (HP:0003273); estenose da válvula aórtica (HP:0001650); ossos wormianos (HP:0002645).
TAR	Alergia ao leite de vaca (HP:0100327); anormalidade da coagulação (HP:0001928) ^{1,2} ; anormalidade do ombro (HP:0003043); anormalidade do sistema genitourinário (HP:0000119); aplasia do útero (HP:0000151); aplasia fibular (HP:0002990); aplasia/hipoplasia do úmero (HP:0006507); aplasia radial bilateral (HP:0004977); atraso de mielinização do SNC (HP:0002188); atraso motor (HP:0001270); <i>cavum septum pellucidum</i> (HP:0002389); cistos pancreáticos (HP:0001737); clavícula em forma de gancho (HP:0000895); coarctação de aorta (HP:0001680); costelas cervicais (HP:0000891); coxa valga (HP:0002673); dermatite seborreica (HP:0001051); diminuição do nível de anticorpos no sangue (HP:0004313); edema do dorso das mãos (HP:0007514); edema do dorso dos pés (HP:0012098); eosinofilia (HP:0001880); falanges dos dedos curtas (HP:0009803); fronte ampla (HP:0000348); <i>genu varum</i> (HP:0002970); hepatoesplenomegalia (HP:0001433); hipoplasia cerebelar (HP:0001321); hipoplasia do músculo do ombro (HP:0008952); hipoplasia dos ossos do carpo (HP:0001498); leucocitose (HP:0001974); luxação patelar (HP:0002999); má-rotação axial do rim (HP:0004717); morte na infância (HP:0001522); <i>nevus flammeus</i> da testa (HP:0007413); polegar aduzido (HP:0001181); <i>talipes equinovarus</i> – pé torto (HP:0001762); torção tibial (HP:0100694).
Townes-Brocks	Anormalidade do tragus (HP:0009912); aplasia/Hipoplasia do 3º dedo (HP:0010331); assimetria do membro inferior (HP:0100559); atresia duodenal (HP:0002247); ausência de dedos (HP:0010760); boca grande (HP:0000154); clinodactilia do 5º dedo dos pés (HP:0001864); clinodactilia dos dedos do pé

	(HP:0001863); cistos renais múltiplos (HP:0005562); dermoide limbal (HP:0001140); desvio ulnar do dedo (HP:0009465); fístula retinóide (HP:0004792)^{1,2} ; fossa pré-auricular (HP:0000384)^{1,2} ; hipotireoidismo (HP:0000821); incontinência intestinal (HP:0002607); malformação de Arnold-Chiari (HP:0002308); metatarso curto (HP:0010743); microtia (HP:0008551); morfologia anormal da vagina (HP:0000142); morfologia anormal da válvula pulmonar (HP:0001641); nódulo subcutâneo (HP:0001482); orelha de sátiro (HP:0030676); orelha Stahl (HP:0100015); poço pré-auricular (HP:0004467); prisão de ventre (HP:0002019); pseudoepífise do segundo metacarpo (HP:0006179); sindactilia de 3-4 dedos (HP:0006097); sindactilia de 3-4 dedos do pé (HP:0009779); sindactilia dos dedos 2-4 (HP:0010709); sinostose metatarsal (HP:0001440); sobredobramento de hélice (HP:0000396); sobredobramento das hélices superiores (HP:0004453); útero bífido (HP:0000136); válvula uretral (HP:0010481).
VACTERL	Anencefalia (HP:0002323); anomalia anorretal (HP:0012732); anormalidade da genitália interna feminina (HP:0000008); anormalidade da uretra (HP:0000795); anormalidade da vesícula biliar (HP:0005264); anormalidade do disco intervertebral (HP:0005108); anormalidade do esterno (HP:0000766); anormalidade do pâncreas (HP:0001732); aplasia/hipoplasia dos pulmões (HP:0006703)^{1,2} ; artéria umbilical única (HP:0001195); atresia esofágica (HP:0002032); encefalocele occipital (HP:0002085); estenose laríngea (HP:0001602); estenose traqueal (HP:0002777)^{1,2} ; fenda labial não mediana (HP:0100335); genitália ambígua (HP:0000062); hemangioma cavernoso (HP:0001048); laringomalácia (HP:0001601); medula ancorada (presa) (HP:0002144); morfologia do sacro anormal (HP:0005107); obstrução da junção ureteropélvica (HP:0000074); onfalocele (HP:0001539); <i>patent urachus</i> (HP:0010479); transposição das grandes artérias (HP:0001669).
Legenda	TAR: Trombocitopenia-Aplasia Radial (<i>Thrombocytopenia-absent radius</i>); VACTERL: associação de defeitos vertebrais, atresia anal, defeitos cardíacos, fístula traqueo-esofágica, anomalias renais e anormalidades nos membros (<i>Vertebral defects, Anal atresia, Cardiac defects, Tracheo-Esophageal fistula, Renal anomalies, and Limb abnormalities association</i>); ¹ Anomalias muito frequentes na síndrome (presentes entre 80-99% dos pacientes) – Dados GARD; ² Anomalias muito frequentes na síndrome – Dados Orphanet; *Dados de frequência não disponíveis.
Fontes	<i>Human Phenotype Ontology</i> (https://hpo.jax.org/app/); <i>Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD)</i> (https://rarediseases.info.nih.gov/); <i>Orphanet</i> (https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php).

Tabela 5 - Estatística descritiva das tabelas suplementares 1 e 2

Síndromes	Anomalias específicas (%)	Anomalias sobrepostas (%)¹	Anomalias sobrepostas à TE (%)²	Anomalias da TE sobrepostas³
Anemia de Fanconi	55/128 (43.0)	73/128 (57.0)	20/128 (15.6)	20/71 (28.2)
Associação VACTERL	24/67 (35.8)	43/67 (64.2)	17/67 (25.4)	17/71 (23.9)
Síndrome Acro-renal-Ocular	5/44 (11.4)	39/44 (88.6)	13/44 (29.5)	13/71 (18.3)
Síndrome Baller-Gerold	29/83 (34.9)	54/83 (65.1)	17/83 (20.5)	17/71 (23.9)
Síndrome Cornelia de Lange	73/140 (52.1)	67/140 (47.9)	22/140 (15.7)	22/71 (31.0)
Síndrome de Holt-Oram	18/45 (40.0)	27/45 (60.0)	12/45 (26.7)	12/71 (16.9)
Síndrome de Okihiro	10/52 (19.2)	42/52 (80.8)	18/52 (34.6)	18/71 (25.4)
Síndrome de Rapadilino	8/18 (44.4)	10/18 (55.6)	5/18 (27.8)	5/71 (7.0)
Síndrome de Roberts	24/87 (27.6)	63/87 (72.4)	22/87 (25.3)	22/71 (31.0)
Síndrome de Townes-Brocks	34/91 (37.4)	57/91 (62.6)	19/91 (20.9)	19/71 (26.8)
Síndrome SC-Focomelia	4/24 (16.7)	20/24 (83.3)	7/24 (29.2)	7/71 (9.9)
Síndrome TAR	36/73 (49.3)	37/73 (50.7)	19/73 (26.0)	19/71 (26.8)
Total	322/492 (65.4)	170/492 (34.6)	47/492 (9.6)	47/71 (66.2)

¹Não considera TE; ²Algumas anomalias estão em agrupamentos; ³Anomalias da TE que estão sobrepostas às síndromes nas respectivas linhas.

Tabela 6 - Aspectos moleculares das doenças genéticas de fenótipo similar a TE

Doença	Anemia de Fanconi	Associação VACTERL	Síndrome Acro-renal-ocular	Síndrome de Baller-Gerold	Cornelia de Lange	Síndrome de Holt-Oram	Síndrome de Okihiro	Síndrome de Rapadilino	Síndrome de Roberts	Síndrome de Townes-Brocks	Síndrome SC-Focomelia	Síndrome TAR
Herança	AR	Esporádica; XLR	AD	AR	AD	AD	AD	AR	AR	AD	AR	AR
Prevalência	1/160.000	1/10.000-40.000	Desconhecida	Desconhecida	1/10.000-30.000	1/100.000	Desconhecida	1/75.000 ²	Desconhecida	1/250.000 ³	Desconhecida	<1/100.000
Gene	FANCA - FA Complementation Group A	HOXD13 - Homeobox D13 ¹ ; ZIC3 - Zic Family Member 3	SALL4 - Spalt Like Transcription Factor 4	RECQL4 - RecQ Like Helicase 4	NIPBL - Nipped-B-Like Protein	TBX5- T-Box Transcription Factor 5	SALL4 - Spalt Like Transcription Factor 4	RECQL4 - RecQ Like Helicase 4	ESCO2 - Establishment Of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2	SALL1 - Spalt Like Transcription Factor 1 ⁴ ; DACT1 - Dapper Antagonist Of Catenin 1 ⁵	ESCO2 - Establishment Of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2	RBM8A - RNA Binding Motif Protein 8A
Localização	16q24.3	2q31.1; Xq26.3	20q13.2	8q24.3	5p13.2	12q24.21	20q13.2	8q24.3	8p21.1	16q12.1; 14q23.1	8p21.1	1q21.1
Função	Proteína de Reparo de DNA	Fator de transcrição	Fator de transcrição	DNA helicase	Transporte de coesina	Fator de transcrição	Fator de transcrição	DNA helicase	Acetiltransferase para coesão de cromátides	Fator de transcrição; Motivo de ligação a PDZ	Acetiltransferase para coesão de cromátides	Motivo de ligação ao RNA

¹Associação gene-doença não confirmada; ²Prevalência na Finlândia, prevalência mundial desconhecida; ³Estimativa; ⁴Townes-Brocks tipo 1; ⁵Townes-Brocks tipo 2. Dados de: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man (<https://www.omim.org/>), GHR – Genetics Home Reference (<https://ghr.nlm.nih.gov/>), e GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

4 ARTIGO 2

Limbs reduction defects: a case series with a novel deletion in *ESCO2*

Manuscrito em preparação

Limbs reduction defects: a case series with a novel deletion in *ESCO2*

Laysa Kariny Kriech^{1,2}, Maria Teresa Vieira Sanseverino^{2,3,4}, Julia do Amaral Gomes^{1,2}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2}, Lavinia Schüler-Faccini^{1,2,3,4}, Thayne Woycinck Kowalski^{1,2}

Authors' Affiliations

¹Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology (PPGBM), Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²INAGEMP - National Institute of Population Medical Genetics, Porto Alegre, Brazil

³ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

⁴National Service of Information on Teratogenic Agents (SIAT), Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Introduction

Limb reduction defects (LRD) can be defined as the absence or hypoplasia of long bones, metacarpal, metatarsal and/or the phalanges (Gold *et al.*, 2011). LRD are particularly considered sensitive to environmental teratogens since the thalidomide tragedy in the 1960s (Castilla *et al.*, 1995). Its etiology is heterogeneous, from genetic disorders to environmental exposure and mechanical causes such as premature rupture of amniotic membranes (McGuirk *et al.*, 2001; Gold *et al.*, 2011). However, for many cases of limb deficiencies due to genetic causes, gene mutations are not yet known. Among some exceptions, are the mutations in the *TBX5* gene in Holt-Oram syndrome, *ESCO2* in Roberts syndrome and *SALL4* in Okhiro syndrome (Carli *et al.*, 2013).

Thalidomide Embryopathy (TE) is characterized by a series of malformations, but particularly striking is the LRD, like amelia, phocomelia and thumb defects (Newman, 1986). In Brazil, the drug is prescribed mainly for the treatment of the *erythema nodosum leprosum* (ENL), a complication of leprosy. Brazilian records show that the prevalence of leprosy in Brazil can reach 10.2/10,000 in endemic regions (Vianna *et al.*, 2017), and approximately 10,000 individuals are possible users of thalidomide (Vianna *et al.*, 2011). Even with imposed restrictions, Brazil is the only country in the world that still presents new cases of TE (Schuler-Faccini *et al.*, 2007), the last of which were recognized in 2011 (Vianna *et al.*, 2013).

TE phenotype overlaps with some genetic syndromes, particularly Roberts syndrome, Holt-Oram syndrome and Okhiro syndrome among others (Lenz, 1973; Smithells and Newman, 1992; Vianna *et al.*, 2011; Mansour *et al.*, 2019), and in the past some of them were mistakenly diagnosed as TE (Freeman *et al.*, 1974; Van Regemorter *et al.*, 1982; Kohlhase, 2002).

Roberts Syndrome, also known as pseudo-thalidomide, is an autosomal recessive inheritance disease, with variable expressivity (Freeman *et al.*, 1974) characterized by limb reduction defects (tetraphocomelia), craniofacial anomalies and growth restriction (Afifi *et al.*, 2016). Roberts syndrome (which includes the milder form SC-phocomelia), is caused by mutations in the *ESCO2* gene (Schüle *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2010; Goh *et al.*, 2010).

Holt-Oram syndrome affects limbs and heart, with autosomal dominant inheritance, with high penetrance (close to 100%) and variable expressivity, ranging from subclinical findings to phocomelia and severe heart defects (Hurst *et al.*, 1991; Basson *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2012). In 1997 Li *et al.* (1997) and Basson *et al.* (1997) showed that Holt-Oram syndrome is caused by mutations in the *TBX5* gene.

The terminology of Okihiro Syndrome was proposed by Hayes *et al.* (1985), but it is also called Duane-Radial Ray Syndrome or DR Syndrome. This syndrome has also autosomal dominant inheritance, with variable inter- and intra-family expressivity and reduced penetrance (Hayes *et al.*, 1985; Al-Baradie *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2016). Unilateral or bilateral radial defects associated with Duane's anomaly characterize Okihiro's syndrome. Duane's anomaly is a congenital disorder of ocular motility, characterized by variable limitation of ocular adduction and retraction, narrowing of the eyelid cleft in adduction and absence or severe abduction limitation, and represents about 1% of strabismus cases (Hayes *et al.*, 1985). Kohlhase *et al.* (2002) and Al-Baradie *et al.* (2002) identified variants in the *SALL4* gene as causing Okihiro syndrome. Acro-renal-ocular syndrome is also caused by mutations in *SALL4*, being considered an allelic syndrome of Okihiro (Kohlhase *et al.*, 2003).

Whereas LRD are relatively frequent anomalies in the human species and thalidomide and its analogs in Brazil are still widely used for the treatment of several diseases due to its therapeutic efficacy - mainly for ENL, public education and surveillance are of fundamental importance (Vianna *et al.*, 2017). In addition, in Brazil, TE continues to be a reason for seeking legal compensation from the state (Moro and Invernizzi, 2017) and the differential diagnosis with genetic syndromes with similar phenotypic expression is fundamental for the genetic counseling. Here we present the molecular analysis of eight cases of patients with LRD with predominant radial involvement.

Subjects and Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) under CAAE number

95386618.1.0000.5327 and the participants signed the free and informed consent form.

The recruitment of patients was performed by emailing to the Brazilian Society of Medical Genetics from September 2018 to May 2019. Doctors with candidate patients filled out a Google Form® with clinical information. Children and adults who presented upper and/or lower limb phocomelia; and/or amelia; and/or pre-axial reduction defects of the upper limbs (radius or thumb); and/or thumb/hallux duplicated or triphalangeal; associated or not with other anomalies, unilateral or bilateral, were considered eligible for this study. Patients with a transverse terminal defect (amputation/amniotic band disruption); and/or post-axial defects with no pre-axial involvement; and/or post-axial syndactyly/polydactyly; and/or ectrodactyly (absence of central ray), were excluded. Clinical description, family history, prenatal history and basic social information, such as age and gender were collected.

DNAGenotek® Oragene kit was used to collect saliva and to extract DNA. Using a next-generation sequencing panel approach, we sequenced the exons, 50 bp portions of the adjacent introns, and the untranslated regions of the *ESCO2*, *SALL4*, and *TBX5* genes. (Applied Biosystems IonTorrent™ Semiconductor Chip Technology). A coverage higher than 100x was obtained in 94.16% of the bases. The average depth of coverage for the variants found was 533.2x. The analysis was performed through the Ion Reporter v.5.12 software using the hg19 reference genome.

The pathogenicity of variants was evaluated through the ClinVar (Landrum *et al.*, 2018) and VarSome (Kopanov *et al.*, 2019). Pathogenic variants and uncertain significance variants (VUS) were confirmed through Sanger sequencing.

The functional prediction of missense, synonymous, intronic and untranslated regions were performed using softwares SIFT (Kumar *et al.*, 2009), Polyphen-2 (Adzhubei *et al.*, 2010), HSF (Desmet *et al.*, 2009), MethPrimer (Li and Dahiya, 2002), Motifbreak (Coetzee *et al.*, 2015), SILVA (Buske *et al.*, 2013), PredictSNP2 (Bendl *et al.*, 2016), miRBase (Griffiths-Jones, 2006) and Mutation Taster (Schwarz *et al.*, 2014) (Supplementary Table 1). The protein modeling was performed using the SWISS-MODEL tool (Waterhouse *et al.*, 2018). Variants previously described were evaluated in Ensembl release 75 - GRCh37.p13 (Hunt

et al., 2018). The allelic frequencies of the variants were consulted in the ABraOM for Brazilian population (Naslavsky *et al.*, 2017), gnomAD genomes (Karczewski *et al.*, 2019) and 1000 Genomes databases (Auton *et al.*, 2015).

Results

Clinical description

The sample consisted of 8 patients born between 2005 and 2019 from four Brazilian states - Acre, Pará, Paraná, and Rio Grande do Sul, and one patient from Chile. All were classified as white, with European ancestry. Two were children of consanguineous couples. Five patients had absent radius, one had monodactyly, one had upper limb phocomelia and another one had tetraphocomelia. In addition, four patients had some alteration of the nervous system and three patients had some cardiovascular or renal alteration. Three patients had thrombocytopenia. Anomalies of the face and ears were also present in some patients. (Table 1 and Supplementary Table 2).

Case 1

This is a girl, born in 2017, second daughter of a non-consanguineous couple. Her mother was 32 years old and her father 45 at the time of her birth. She has also three half-sisters from her paternal side, one with severe intellectual deficit and hypotonia, and two half-brothers from her maternal side, both healthy. Her mother referred that she smoked and had occasional intake of alcoholic beverages up to 4th month of pregnancy when she found to be pregnant. A prenatal ultrasound revealed fetus had “short bones”. She was delivered at 36 weeks and 5 days weighing 2,600g and 32cm of head circumference, with shortening of four limbs. She presented delayed neuro development. At 14 months she was seen by a medical geneticist with microcephaly, unilateral deafness, radial and tibial hypoplasia, vaginal synechia, absence of both thumbs. Karyotype (G-banding) was 46, XX. Clinical hypothesis: OMIM #612447, Skeletal defects, genital hypoplasia, and mental retardation (Figure 1).

Case 2

This is a boy, born in 2007 from a non-consanguineous couple. His mother was 38 years old and her father 28 at the time of his birth. He has two older half-sisters, both healthy. Prenatal was uneventful with normal ultrasounds. He was delivered at 38 weeks, birthweight of 2,055g, 44cm of length, and head circumference of 32cm. Neurodevelopment was delayed, with independent walk only when he was 3 years old and first words when he was 30 months old. Thrombocytopenia was reported since his first year of live. At clinical exam he presented short scapulae, hypoplasia of the humerus, bilateral radial agenesis with ulnar hypoplasia and hypoplastic carpal bones. Clinical hypothesis: OMIM #274000, Thrombocytopenia-absent radius syndrome (Figure 2).

Case 3

This is a boy, born in 2005, second child from a consanguineous couple (second cousins). His mother was 30 years old and her father 36 at the time of his birth. His older brother was healthy. He was delivered by cesarean section weighing of 2,095g, and no other information was available. Mother referred sporadic alcohol intake and no other complications during pregnancy. Neurodevelopment was compatible with age. At clinical evaluation he presented deafness due to external auditory meatus stenosis; synophrys, microcornea, palpebral ptosis, mandibular and maxillary hypoplasia, bilateral undescended testis, small left kidney, radial agenesis with absent thumb on the right arm, and hypoplastic left thumb. Karyotype (G-banding) was 46, XY. Clinical hypothesis: OMIM # 607323, Acrorenocular syndrome (Figure 3).

Case 4

This is a girl, born in 2018, first child of a young, non-consanguineous couple after a non-planned pregnancy. She was delivered at 40 weeks and 5 days weighing 2,760g 46cm of length and 36cm of head circumference, presenting bilateral radial agenesis, thrombocytopenia, small cardiac interventricular communication and atrial duct persistence. Cytogenetic test for Fanconi's anemia was negative. Clinical hypothesis: OMIM #274000, Thrombocytopenia-absent radius syndrome (Figure 4).

Case 5

This is a girl, born in 2018, sixth child of a couple with one previous stillborn. Her mother referred Chikungunya Fever in the first month of pregnancy. She was born after a cesarean section and we don't have any information about anthropometric measures presenting intercalary limb reduction in the four limbs, with presence of all digits including thumbs. Pink and planar nevus in the front face. Normal cardiac exam. No clinical diagnostic hypothesis was made (Figure 5).

Case 6

This is a boy, born in 2018, only child of a non-consanguineous couple. His mother referred that she smoked 3 cigarettes/day during all pregnancy and had occasional intake of alcoholic beverages in the first month of pregnancy. He was delivered at 39 weeks, weighing 3,480g and 35.5cm of head circumference. Motor development was typical, but speech was delayed. He was diagnosed with hypothyroidism at 23 months of age and anemia with low platelet count. He has bilateral radial agenesis, bilateral partial syndactyly between 2nd and 3rd toes, undescended testes. Cytogenetic test for Fanconi's anemia was negative. Clinical hypothesis: OMIM #274000, Thrombocytopenia-absent radius syndrome (Figure 6).

Case 7

This is a boy, born in 2019, from a non-consanguineous couple. His mother was 31 years old and his father 30. He was delivered by cesarean section with 39 weeks. At clinical evaluation he presented monodactyly in both hands and feet. Echocardiogram showed interventricular communication and atrial duct persistence. No other abnormalities were recorded. Clinical hypothesis: OMIM #187510, Tetramelic monodactyly (Figure 7).

Case 8

This is a boy, born in 2019, second child from a consanguineous couple (cousins). His mother was 25 years old. His older sister was healthy. Mother smoked 5 cigarettes/day during whole pregnancy. He was delivered at 43 weeks presenting tetraphocomelia, cleft lip/palate on the right side, nasal hypoplasia,

bilateral ocular leukokoria. Clinical hypothesis: OMIM #268300, Roberts syndrome (Figure 8).

Molecular analysis

In the nine individuals analyzed (eight patients and one parent), twenty-seven variants were found: seven in the *ESCO2* gene (three in 3'UTR, two intronic, one in 5' UTR, and one frameshift), nine in *SALL4* (six synonyms, two missenses, and one intronic) and eleven in *TBX5* (five intronic, four in 3' UTR, and two in 5' UTR). Only one variant was classified as pathogenic and another was classified as of uncertain significance (VUS), both in the *ESCO2* gene (Table 2, Supplementary Table 3).

Patient 8 was the only one whose clinical diagnosis was confirmed by molecular analysis (NGS and Sanger sequencing). The patient is son of a consanguineous couple and presented a homozygous deletion in *ESCO2*:c.683_696delCGTCACTGGGACGC, confirming Roberts Syndrome. This variant was not described in public databases yet.

A variant of uncertain significance was found in case 5: *ESCO2*:c.*71_*74delTATT in heterozygosis. The variant is described in the public databases on dbSNP reference rs533417099 and has an allelic frequency of 0.0025 (-) in the Brazilian population (Supplementary Table 4).

Functional prediction

The data for all functional predictions is described in supplementary table 5.

The pathogenic variant *ESCO2*:c.683_696delCGTCACTGGGACGC (p.Pro228HisfsTer5) found in patient 8 corresponds to a deletion of 14 bases in exon 3, resulting in the substitution of four amino acids from position 228 producing a stop codon, leading to the loss of 370 amino acids (frameshift mutation) (Figure 9).

The VUS in *ESCO2*:c.*71_*74delTATT (rs533417099) was observed in patient 05 and corresponds to a deletion in the 3'UTR of *ESCO2* and had predicted alteration in splicing.

The remaining variants were considered benign or likely benign.

Regarding the variant *SALL4*:c.131-226T>C (rs146597375), despite being located in an intronic region, MotifBreak predicts changes in the motifs of MYOG, MYF6, and TCF12. MYOG is related to Wnt-mediated beta-catenin signaling regulation pathways and the transcription of target genes and the hypertrophy model. MYF6 and TCF12 are related to developmental biology pathways. Mutation Taster had predicted alteration in splicing and protein features might be affected. This variant was found only in case 5.

The same occurs for the *SALL4* variant: c.1520T>G (rs6126344), missense variant: it has a prediction of changes in the PPARD motif - related to the Wnt signaling pathway and the pluripotency and Wnt signaling pathways: beta-Catenin-dependent Wnt signaling, and RARB related to developmental biology pathways. Mutation Taster had predicted alteration in splicing and protein features might be affected. HSF had predicted the breaking of exonic splicing enhancer (ESE) site. This variant was found in case 3, his father and in cases 5 in homozygosis and in case 8 in heterozygosis. The variant has an allelic frequency of 0.3506 (C) in the ABraOM and genotype frequency is 0.1610 (C/C) and 0.3960 (A/C) on 1000 genomes (Supplementary Table 4).

To the variant *SALL4*:c.1860A>G (rs6021437), synonymous variant, also had predicted alteration by Mutation Taster in splicing and protein features might be affected. In addition, MethPrimer found changes in 2 CpG islands. The same way that *SALL4*:c.1520T>G, this variant was found in case 3, his father and in cases 5 in homozygosis and in case 8 in heterozygosis. The variant has an allelic frequency of 0.3621 (C) in the ABraOM and genotype frequency is 0.1710 (C/C) and 0.4220 (T/C) on 1000 genomes (Supplementary Table 4).

The variant *TBX5*:c.*384T>C (rs12426660), 3'UTR variant, has a prediction of hsa-miR-300 gain and alteration in splicing. This variant was found in cases 5 and 7 in heterozygosis.

Discussion

Our most important finding corresponds to the new variant *ESCO2*: c.683_696delICGTCACTGGGACGC found in homozygosity in exon 3, causing

Roberts Syndrome. Most of the identified variants in the literature are in exon 3 and 4 and are of the frameshift type (Afifi *et al.*, 2016). So far, 27 variants are described in Ensembl as pathogenic for the canonical transcript and a 2018 publication reported one more novel variant, not yet included in the database (Mengen *et al.*, 2018). However, none of the described variants corresponds to a large deletion as reported by us.

Roberts syndrome has autosomal recessive inheritance and therefore high prevalence of inbreeding among parents is observed (Van den Berg and Francke, 1993). The parents of patient 8 live in the inland of Acre in a city of approximately 40 thousand inhabitants located 400 km from the capital Rio Branco, a region surrounded by the Amazon forest and with difficult access by road or river. This geographic isolation can favor inbreeding (Rudan, 2006), and although so far no other cases had been described there (Cardoso *et al.*, 2019), a more careful investigation is important due to the elevated mortality of Roberts syndrome.

Case 5 presents upper limb phocomelia, alteration in the shoulder, a pink linear plane hemangioma in the glabella and nose region, and hypoplastic and constantly flexed thumbs, with a striking resemblance of TE (Vianna *et al.*, 2013; Mansour *et al.*, 2019). The non-consanguineous couple lives in an endemic leprosy region with wide availability of Thalidomide (Vianna *et al.*, 2011; Vianna *et al.*, 2015). Therefore, we couldn't rule out that this is a new case of TE, although the mother has not referred ingestion of the drug. No pathogenic variants were found, but one variant in *ESCO2*, one in *TBX5* and one in *SALL4* were observed. The variant *ESCO2*: c.*71_*74delTATT was found only in this patient with no other pathogenic variants. Interestingly, this variant was found in three individuals in a sample of 27 patients with TE in another study from our group (Gomes *et al.*, 2019) equivalent of an allelic frequency of 0.055 (3/54). Since its allelic frequency in the Brazilian population is of only 0.0025, we hypothesize that this might be a variant of susceptibility to TE or limb defects. This variant is located at UTR 3', with a prediction of splicing changes. Previously, regulatory-type variants in *ESCO2* showed greater pathogenic risk potential for TE (Gomes *et al.*, 2019). Another variant found only in this case and in other patients with TE was *SALL4*:c.131-226T>C (rs146597375). This variant has predicted changes in some motifs, such as of MYOG, related to Wnt-mediated beta-catenin signaling regulation pathways. Wnt-signaling is an important pathway for limb

developmental and beta-catenin is known to be the target of thalidomide (Ito *et al.*, 2010).

The TBX5:c.*384T>C variant was also found in case 5 and case 7 and had the miR-300 gain predicted. In a study conducted in mice by Cruz *et al.* (2015), after forced expression of this miRNA, endothelial and cardiogenic differentiation was clearly compromised and protein analysis revealed a significant reduction in the transcription factors Tbx5 and Nkx2.5 (Cruz *et al.*, 2015). In addition, this UTR 3' variant is expected to change splicing. That is, it is possible that the variant produces a new miRNA that reduces the TBX5 transcription itself.

Case 5 has no cardiac changes and case 7 has interventricular communication and patent ductus arteriosus. Still, it may be interesting to analyze that TBX5 - a transcription factor that plays an important role in the development of limbs and heart, is a direct target of thalidomide, preventing up to 40% from binding it to DNA (Khalil *et al.*, 2017). In addition, TBX5 also appears to activate the expression of SALL4, another important transcription factor in limb development and which is also the target of thalidomide (Knobloch and Rüther, 2008; Donovan *et al.*, 2018).

The variants SALL4c.1520T>G and SALL4:c1860A>G were in a haplotype block in patients with TE from another study of our group (Gomes *et al.*, 2019). Curiously, the patient in case 5 also appears to have these variants in a haplotype. Both variants were found only in cases 3, his father, 5 and 8; in the first three in homozygosis and in case 8 - Roberts syndrome, in heterozygosis. Haplotypes of other genes have previously been associated with TE (Kowalski *et al.*, 2016) and risk of teratogenesis (Lupo *et al.*, 2012).

For case 3, the initial diagnostic hypothesis was acro-renal-ocular syndrome (*SALL4*), which was not confirmed by our panel. However, in the analysis of the phenotypes reviewed through the literature and through the HPO - Human Phenotype Ontology (Köhler *et al.*, 2014) we raised the possibility of dealing with a case of Cornelia de Lange. When we inserted the phenotypes mentioned in Table 1 in the Phenomizer tool, available at HPO, together with the dominant inheritance mode - since her father was born with a *talipes*, it suggested Cornelia de Lange with a p-value of 0.0213 and a similarity score of 3.4171, and after that Duane-radial ray syndrome (Okihiro) with a p-value of 0.0466 and a similarity score of 3.4940. Cornelia de Lange is known for her characteristic facial

phenotype, however, it is known that some cases do not have this characteristic and that the severity of phenotypes varies from mild to severe (Kline *et al.*, 2018). In addition, Cornelia de Lange has 5 different types registered in OMIM and caused by variants in several genes. Therefore, it is recommended genetic analysis for Cornelia de Lange for this patient.

For cases 1, 2, 4, 6 and 7, our panel was performed for a differential diagnosis, since they had previously clinical suspicious of other known disease. And as expected, we did not find any variant. Case 1 came to us with the hypothesis of #OMIM 612447, cases 2, 4 and 6 with hypothesis of TAR, and case 7 with tetramelic monodactyly, remaining with these hypotheses after sequencing.

Briefly, we raised a new diagnostic hypothesis for case 3, suspected a new case of TE (case 5) and found a novel variant in *ESCO2* that confirmed the diagnosis of Roberts Syndrome for case 8.

With that, we emphasize the need for more studies in the area in order to improve the diagnosis and consequently genetic counseling and quality of life of these patients, since the present study raises new hypotheses and shows the complexity of making a diagnosis for phenocopies, due precisely to their phenotypic similarities and genetic complexity, even in the new genomic era.

Acknowledgement

The authors acknowledge the financial support: National Institute of Population Medical Genetics (INaGeMP), Research Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), and Grant CNPq (National Council for Scientific and Technological Development).

References

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky V, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS and Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations : Nature Methods. Nat. Methods 7:248-248.

Afifi HH, Abdel-Salam GMH, Eid MM, Tosson AMS, Shousha WG, Abdel Azeem AA, Farag MK, Mehrez MI and Gaber KR (2016) Expanding the mutation and clinical spectrum of Roberts syndrome. Congenit Anom (Kyoto) 56:154–162.

- Al-Baradie R, Yamada K, St. Hilaire C, Chan WM, Andrews C, McIntosh N, Nakano M, Martonyi EJ, Raymond WR, Okumura S *et al.* (2002) Duane radial ray syndrome (Okhiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *Am J Hum Genet* 71:1195–1199.
- Alves LU, Perez ABA, Alonso LG, Otto PA and Mingroni-Netto RC (2016) Novel frameshift variant in gene SALL4 causing Okhiro syndrome. *Eur J Med Genet* 59:80–85.
- Auton A, Abecasis G, Altshuler D, Durbin R, Abecasis G, Bentley D, Chakravarti A, Clark A, Donnelly P, Eichler E *et al.* (2015) A global reference for human genetic variation: The 1000 Genomes Project Consortium. *Nature* 526:68–74.
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J *et al.* (1997) Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat. Genet.* 15:30-35.
- Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, Bruzzone R, Quadrelli R, Lerone M, Romeo G *et al.* (1999) Different TBX 5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2919-2924.
- Bendl J, Musil M, Štourač J, Zendulka J, Damborský J and Brezovský J (2016) PredictSNP2: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions. *PLoS Comput Biol* 12:1–18.
- Buske OJ, Manickaraj A, Mital S, Ray PN and Brudno M (2013) Identification of deleterious synonymous variants in human genomes. *Bioinformatics* 29:1843–1850.
- Cardoso GC, Zagonel de Oliveira M, Paixão-Côrtes VR, Castilla EE and Schuler-Faccini L (2019) Clusters of genetic diseases in Brazil. *J Community Genet* 10:121–128.
- Carli D, Fairplay T, Ferrari P, Sartini S, Lando M, Garagnani L, Di Gennaro GL, Di Pancrazio L, Bianconi G, Elmakky A *et al.* (2013) Genetic Basis of Congenital Upper Limb Anomalies: Analysis of 487 Cases of a Specialized Clinic. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* 97:798–805.
- Castilla EE, Cavalcanti DP, Dutra MG, Lopez Camelo JS, Paz JE and Gadow EC (1995) Limb reduction defects in South America. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 102:393–400.
- Coetzee SG, Coetzee GA and Hazelett DJ (2015) MotifbreakR: An R/Bioconductor package for predicting variant effects at transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 31:3847–3849.
- Cruz FM, Tomé M, Bernal JA and Bernad A (2015) MIR-300 mediates Bmi1 function and regulates differentiation in primitive cardiac progenitors. *Cell Death Dis* 6:1–10.

- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-B eroud G, Claustres M and B eroud C (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37:1–14.
- Donovan KA, An J, Nowak RP, Yuan JC, Fink EC, Berry BC, Ebert BL and Fischer ES (2018) Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane radial ray syndrome. *Elife* 7:1–25.
- Freeman MVR, Williams DW, Schimke RN and Temtamy SA (1974) The Roberts syndrome. *Clin Genet* 5:1–16.
- Goh ES, Li C, Horsburgh S, Kasai Y, Kolomietz E and Morel CF (2010) The Roberts syndrome/SC Phocomelia spectrum - A case report of an adult with review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 152:472–478.
- Gold NB, Westgate MN and Holmes LB (2011) Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet Part A* 155:1225–1235.
- Gomes J do A, Kowalski TW, Fraga LR, Macedo GS, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2019) The role of ESCO2, SALL4 and TBX5 genes in the susceptibility to thalidomide teratogenesis. *Sci Rep* 9:1–11.
- Griffiths-Jones S (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34:D140–D144.
- Hayes A, Costa T and Polomeno RC (1985) The okihiro syndrome of Duane anomaly, radial ray abnormalities, and deafness. *Am J Med Genet* 22:273–280.
- Hunt SE, McLaren W, Gil L, Thormann A, Schuilenburg H, Sheppard D, Parton A, Armean IM, Trevanion SJ, Flicek P *et al.* (2018) Ensembl variation resources. *Database (Oxford)* 2018:1–12.
- Hurst JA, Hall CM and Baraitser M (1991) The Holt-Oram syndrome. *J Med Genet* 28:406–410.
- Ito T, Ando H, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H, Suzuki T, Ogura T and Hotta K (2010) Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science (80-)* 327:1345–1350.
- Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alf ldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP *et al.* (2019) Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv* 531210.
- Khalil A, Tanos R, El-Hachem N, Kurban M, Bouvagnet P, Bitar F and Nemer G (2017) A HAND to TBX5 Explains the Link Between Thalidomide and Cardiac Diseases. *Sci Rep.* 7:1416.
- Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard AM, Deardorff MA, Gillett PM, Ishman SL, Kerr LM, Levin A V., Mulder PA *et al.* (2018) Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Genet* 19:649–666.
- Knobloch J and R uther U (2008) Shedding light on an old mystery: Thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects. *Cell Cycle* 7:1121–1127.

- Köhler S, Doelken SC, Mungall CJ, Bauer S, Firth H V, Bailleul-Forestier I, Black GCM, Brown DL, Brudno M, Campbell J *et al.* (2014) The Human Phenotype Ontology project: linking molecular biology and disease through phenotype data. *Nucleic Acids Res* 42:D966–D974.
- Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L, Liebers M, Kispert A, Laccone F, Turnpenny P, Winter RM and Reardon W (2002) Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet* 11:2979–2987.
- Kohlhase J, Schubert L, Liebers M, Rauch A, Becker K, Mohammed SN, Newbury-Ecob R and Reardon W (2003) Mutations at the SALL4 locus on chromosome 20 result in a range of clinically overlapping phenotypes, including Okihiro syndrome, Holt-Oram syndrome, acro-renal-ocular syndrome, and patients previously reported to represent thalidomide embryopathy. *J Med Genet* 40:473–478.
- Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R and Massouras A (2019) VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 35:1978–1980.
- Kowalski TW, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Sanseverino MTV, Hutz MH, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2016) New Findings in eNOS gene and Thalidomide Embryopathy Suggest pre-transcriptional effect variants as susceptibility factors. *Sci Rep* 6:1–6.
- Kumar P, Henikoff S and Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4:1073–1082.
- Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W *et al.* (2018) ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res* 46:D1062–D1067.
- Lenz PW (1973) Phenocopies. *J Med Genet* 10:34.
- Li LC and Dahiya R (2002) MethPrimer: Designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18:1427–1431.
- Li QY, Newbury-Ecob R, Terrett JA, Wilson DI, Curtis ARJ, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T *et al.* (1997) Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat. Genet.* 15:21-29.
- Lupo PJ, Chapa C, Noursome D, Duhon C, Canfield MA, Shaw GM, Finnell RH and Zhu H (2012) A GCH1 haplotype and risk of neural tube defects in the National Birth Defects Prevention Study. *Mol Genet Metab* 107:592–595.
- Mansour S, Baple E and Hall CM (2019) A clinical review and introduction of the diagnostic algorithm for thalidomide embryopathy (DATE). *J Hand Surg Eur Vol* 44:96–108.
- McGuirk CK, Westgate M-N and Holmes LB (2001) Limb Deficiencies in Newborn Infants. *Pediatrics* 108:E64.

Mengen E, Kotan LD, Ucakturk SA, Topaloglu AK and Yuksel B (2018) A Novel Frameshift Mutation in ESCO2 Gene in Roberts Syndrome. *J Coll Physicians Surg Pakistan* 28:403–405.

Moro A and Invernizzi N (2017) The thalidomide tragedy: the struggle for victims' rights and improved pharmaceutical regulation. *Hist Ciencias, Saude - Manguinhos* 24:603–622.

Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, Bozoklian D, Sandberg TOM, Brito LA, Lazar M *et al.* (2017) Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat* 38:751–763.

Newman CGH (1986) The Thalidomide Syndrome: Risks of Exposure and Spectrum of Malformations. *Clin Perinatol* 13:555-573.

Patel C, Silcock L, McMullan D, Brueton L and Cox H (2012) TBX5 intragenic duplication: A family with an atypical Holt-Oram syndrome phenotype. *Eur J Hum Genet* 20:863–869.

Rudan I (2006) Health Effects of Human Population Isolation and Admixture. *Croat. Med. J.* 47:526-531.

Schüle B, Oviedo A, Johnston K, Pai S and Francke U (2005) Inactivating Mutations in ESCO2 Cause SC Phocomelia and Roberts Syndrome: No Phenotype-Genotype Correlation. *Am J Hum Genet* 77:1117-1128.

Schuler-Faccini L, Soares RCF, De Sousa ACM, Maximino C, Luna E, Schwartz IVD, Waldman C and Castilla EE (2007) New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* 79:671–672.

Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M and Seelow D (2014) Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11:361–362.

Smithells RW and Newman CGH (1992) Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29:716–723.

Van den Berg DJ and Francke U (1993) Roberts syndrome: A review of 100 cases and a new rating system for severity. *Am J Med Genet* 47:1104–1123.

Van Regemorter N, Haumont D, Kirkpatrick C, Viseur P, Jeanty P, Dodion J, Milaire J, Rooze M and Rodesch F (1982) Holt Oram Syndrome Mistaken for Thalidomide Embryopathy-Embryological Considerations. *Eur J Pediatr* 138:77-80

Vega H, Trainer AH, Gordillo M, Crosier M, Kayserili H, Skovby F, Uzielli MLG, Schnur RE, Manouvrier S, Blair E *et al.* (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. *J Med Genet* 47:30–37.

Vianna FSL, Lopez-Camelo JS, Leite JCL, Sanseverino MTV, da Graça Dutra M, Castilla EE and Schüler-Faccini L (2011) Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *PLoS One* 6:e21735.

Vianna FSL, Schüler-Faccini L, Leite JCL, De Sousa SHC, Da Costa LMM, Dias MF, Morelo EF, Doriqui MJR, Maximino CM and Sanseverino MT V. (2013) Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: New cases and review of the main dysmorphological findings. *Clin Dysmorphol* 22:59–63.

Vianna FSL, Zagonel De Oliveira M, Sanseverino MTV, Morelo EF, De Lyra D, Neto R, Lopez-Camelo J, Camey SA and Schuler-Faccini L (2015) Pharmacoepidemiology and thalidomide embryopathy surveillance in Brazil. *Reprod Toxicol* 53:63–67.

Vianna FSL, Kowalski TW, Fraga LR, Sanseverino MTV and Schuler-Faccini L (2017) The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil. *Eur J Med Genet* 60:12–15.

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, De Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L *et al.* (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46:W296-W303.

Table 1 - Clinical description of individuals with limb reduction defects

	01	02	03	04	05	06	07	08		
Social profile										
Age	3	13	15	2	2	5	1		neonatal death	
Gender	F	M	M	F	F	M	M		M	
Family history										
Maternal age at birth (years)	32	38	30	-	-	-	31		25	
Siblings (n)	1	0	1	0	5	0	0		1	
Half siblings (n)	3	2	0	0	0	0	0		0	
Previous abortion/stillbirth (n)	1	0	0	0	1	0	0		0	
Affected siblings/ half-siblings (n)	1	0	0	0	0	0	0		0	
Affected parent	0	0	Father	0	0	0	0		0	
Consanguinity among parents	N	N	Y	N	N	N	N		Y	
Prenatal/Neonatal history										
Alcohol	Y	N	Y	N	N	Y	N		N	
Drugs	N	N	N	N	N	N	N		N	
Smoking	Y	N	N	N	N	Y	N		Y	
Medications teratogenic	N	N	N	N	N	N	N		N	
Birth weight	2060g	2055g	2950g	2760g	-	3480g	-		-	
Birth length	36cm	44cm	-	46cm	-	48cm	-		-	
Gestational age	36w	38w	-	40w	-	39w	39w		43w	
Congenital anomalies (ID HPO)										
<i>Head and neck</i>										
Lateral cleft lip (HP:0100335)									✓	1/8
Microcephaly (HP:0000252)	✓									1/8
<i>Limbs</i>										
Absent radius (HP:0003974)	✓	✓	✓	✓		✓				5/8
Absent thumb (HP:0009777)	✓		✓				✓			3/8
Absent hallux (HP:0012386)	✓						✓			2/8
2-3 toe syndactyly (HP:0004691)						✓				1/8
Abnormality of the shoulder (HP:0003043)		✓ ²								1/8
Aplasia/hypoplasia of the humerus (HP:0006507)		✓								1/8
Aplasia/Hypoplasia of the thumb (HP:0009601)			✓							1/8
Aplasia/Hypoplasia of the tibia (HP:0005772)	✓									1/8
Bowed humerus (HP:0003865)		✓								1/8
Carpal bone hypoplasia (HP:0001498)		✓								1/8
Clinodactyly of the 5th finger (HP:0004209)						✓				1/8
Foot monodactyly (HP:0200054)							✓			1/8
<i>Genu valgum</i> (HP:0002857)							✓			1/8
Hand monodactyly (HP:0004058)								✓		1/8
Hypoplasia of the ulna (HP:0003022)		✓								1/8
Short 5th finger (HP:0009237)						✓				1/8
Short thumb (HP:0009778)					✓					1/8
<i>Talipes equinovarus</i> (HP:0001762)		✓								1/8
Tetraphocomelia (HP:0030721)									✓	1/8
Upper limb phocomelia (HP:0009813)					✓					1/8
<i>Cardiovascular</i>										
Persistent arterial duct (HP:0001643)				✓				✓		2/8
Ventricular septal defect (HP:0001629)				✓				✓		2/8
Patent foramen ovale (HP:0001655)		✓								1/8
<i>Face</i>										
Facial midline hemangioma (HP:0004664)						✓				1/8
Unusual facies (HP:0001999)			✓ ³							1/8
Eyes: Microcornea (HP:0000482)			✓							1/8
<i>Ears</i>										
Atresia of the external auditory canal (HP:0000413)			✓							1/8
Conductive hearing impairment (HP:0000405)			✓							1/8
Hearing impairment - not specified (HP:0000365)	✓									1/8
Digestive system: Meckel diverticulum (HP:0002245)		✓								1/8
<i>Genitourinary system</i>										
Abnormality of the kidney (HP:0000077)		✓ ⁴	✓			✓ ⁴				3/8
Cryptorchidism (HP:0000028)			✓			✓				2/8
Abnormal localization of kidney (HP:0100542)			✓							1/8
Renal hypoplasia (HP:0000089)			✓							1/8
<i>Nervous system</i>										
Delayed speech (HP:0000750)			✓			✓				2/8
Intellectual disability (HP:0001249)		✓	✓							1/8
Global developmental delay (HP:0001263)	✓									1/8
<i>Growth</i>										
Short stature (HP:0004322)		✓								1/8
Metabolism/Laboratory abnormality										
Thrombocytopenia (HP:0001873)		✓		✓		✓				3/8
Anemia (HP:0001903)						✓				1/8
Hypothyroidism (HP:0000821)						✓				1/8
Clinical diagnosis (hypothesis)	#OMIM 612447	TAR ⁵	Acro-renal-ocular syndrome	TAR ⁵	ND ⁶	TAR ⁵	Tetramelic monodactyly	Roberts syndrome		

¹number of individuals with the phenotype; ²short scapular waist; ³slightly low nasal bridge with synophrys; ⁴pyelocalyaly dilation; ⁵TAR - Thrombocytopenia absent radius syndrome; ⁶Not defined.



Figure 1. Photograph and forearm radiography of case 1.

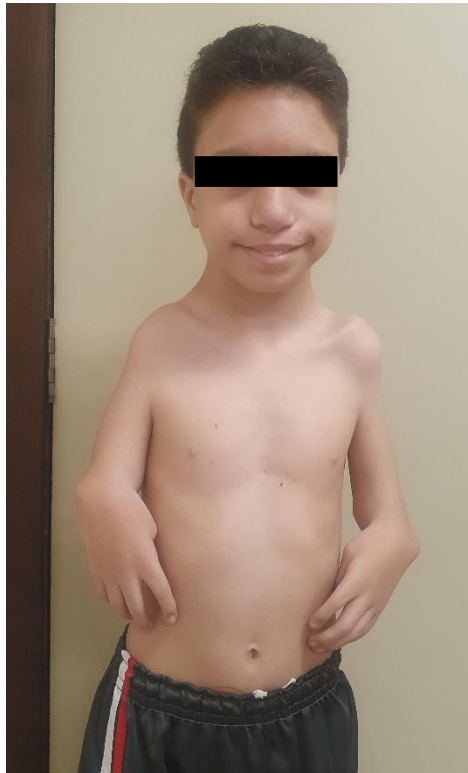
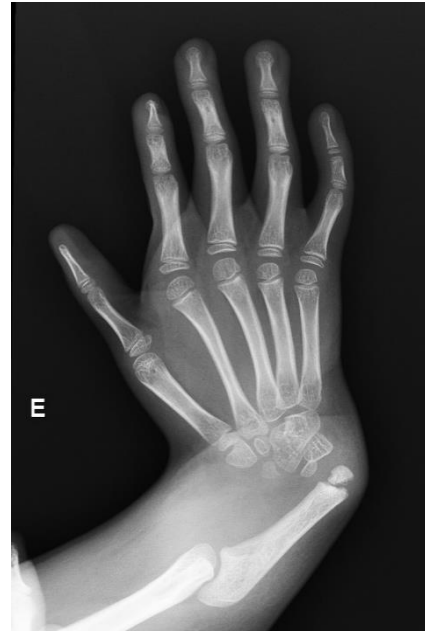


Figure 2. Radiography of forearm/hands right and left (upper images) and photograph (lower image) of case 2.



Figure 3. Radiography of forearm/hand right and left hand radiography of case 3.



Figure 4. Photograph of case 4 and radiograph of the arm and forearm (right arm in the upper image and left arm in the lower image). Radiograph are from the neonatal period.



Figure 5. Photograph of case 5.



Figure 6. Photograph of case 6; lower limb radiography; radiography of forearms/hand right; left forearm radiography.

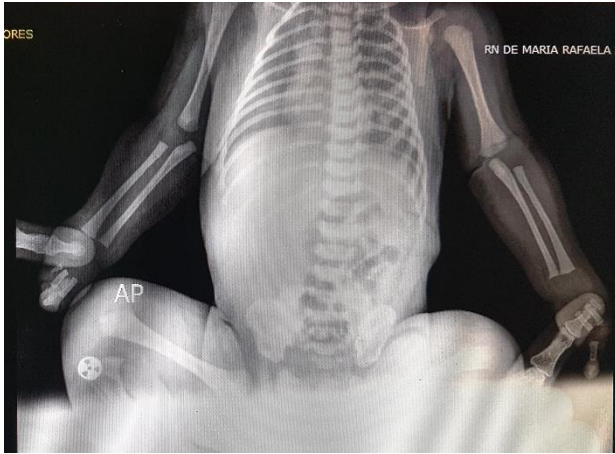


Figure 7. Radiograph of upper and lower limbs (left side) and photographs of case 7 (right side).

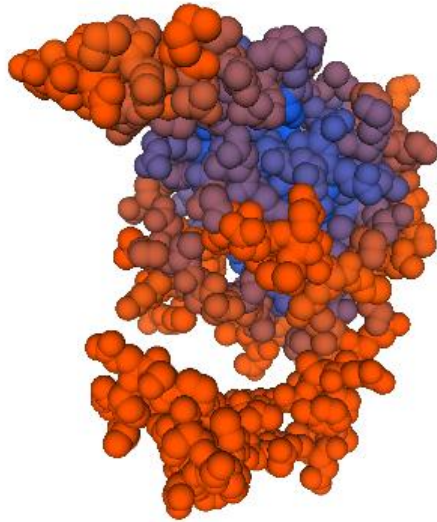


Figure 8. Photograph and radiograph of case 8.

Table 2 – Molecular results to *ESCO2*, *SALL4* and *TBX5* genes per patient

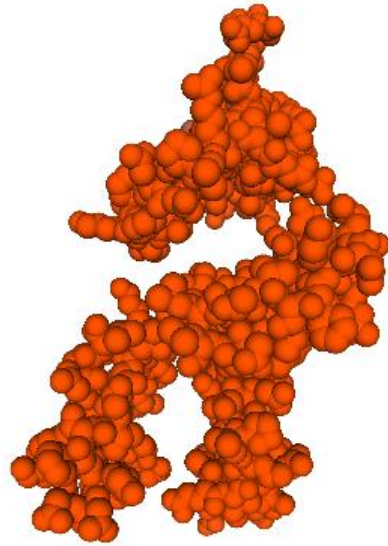
Patient	Diagnostic hypothesis	Genes	dbSNP ref	DNA variation	Zygoty	ClinVar Classification	VarSome Classification
05		ESCO2	rs533417099	c.*71_*74delTATT	heterozygous	uncertain significance	likely benign
08	Roberts syndrome	ESCO2	novel variant	c.683_696delCGTC ACTGGGACGC	homozygous	not reported in ClinVar	Pathogenic

To patient 01 (OMIM #612447), 02 (TAR - Thrombocytopenia absent radius syndrome), 03 (Acro-renal-ocular syndrome) and his father, 04 (TAR - Thrombocytopenia absent radius syndrome), 06 (TAR - Thrombocytopenia absent radius syndrome) and 07, no pathogenic/probably pathogenic/uncertain significance variant (VUS) has been identified in the *ESCO2*, *SALL4*, and *TBX5* genes. Reference sequences are *ESCO2* transcript NM_001017420, *SALL4* transcript NM_020436, and *TBX5* transcript NM_000192. Ensembl release 75 - GRCh37.p13 (Hunt *et al.*, 2018); ClinVar (Landrum *et al.*, 2018); VarSome (Kopanos *et al.*, 2018).

A

wildtype AA sequence

MAALTPRRRKQDSLKCDSELLHFTENLFPSPNKKHCFYQNSDKNEENLHCSQQEHFVLSAL
 KTEINRLPSANQGSPPKFSALSTVSFYQNKWYLNPLERKLIKESRSTCLKTNDKSFPIV
 EKMQGKPVCSKKNKKPKQKSLTAKYQPKYRHIKPVSRNSRNSKQNRVIYKPIVEKENNC
 HSAENNSNAPRVLSQLIKPQVTLQGGAAFFVRKKSSLRKSSLENEPSLGRTQKSKSEVIEDS
 DVETVSEKKTAFTRQVPKCLVLEEKIKIGLLSASSKNKEKLIKDSSDDRVSSEKHKVDKNEAF
 SSEDLSLGENKTIKSTVYPIFSASSVNSKRSLGEEQFVSGSVNFMKQTNIQKNTNTRDTSK
 KTKDQLIIDAGQKHFGATVCKSCGMIYTASNPEDEMQRVQHHRFLEGIKYVGVWKKER
 VVAEFWDGKIVLVLPHDPSFAIKKVEDVQELVDNELGFQVVPKCPNKIKTLFISDEKRV
 VGCLIAEPIKQAFRVLSEPIGPEPSSTECPRAWQCSVDVPEPAVCGISRIWVFRLLRKRRIA
 RRLVDTLRNCFMFGCFLSTDEIAFSDPTPDGKLFATKYCNTPNFLVYVNFNS*

B

mutated AA sequence

MAALTPRRRKQDSLKCDSELLHFTENLFPSPNKKHCFYQNSDKNEENLHCSQQEHFVLSAL
 KTEINRLPSANQGSPPKFSALSTVSFYQNKWYLNPLERKLIKESRSTCLKTNDKSFPIV
 EKMQGKPVCSKKNKKPKQKSLTAKYQPKYRHIKPVSRNSRNSKQNRVIYKPIVEKENNC
 HSAENNSNAPRVLSQLIKPQVTLQGGAAFFVRKKSSLRKSSLENEHPKE*

Figure 9. A) Wildtype conformation and AA sequence of ESCO2. B) Mutated conformation and AA sequence of ESCO2: c.683_696delCGTCACTGGGACGC variant. The sequence highlighted in green corresponds to the similarity between the wild and mutated type.

Supplementary table 1 - Funcional prediction tools and type analyzed variants

Tool	Function	Analyzed variants
HSF	predicts changes in splicing sites	missense, synonymous, intronic and 3'UTR
MethPrimer	searches the sequence for potential CpG islands	missense, synonymous, intronic and 5'UTR
miRBase	predicts possible gains or losses of miRNAs interactions	all variants
Motifbreak	(R/bioconductor software package) evaluates genomes with motifs from many public sources and predicts how much information is gained or lost in one allele of the polymorphism	missense and intronic
Mutation Taster	predicts the impact of the variants through physico-chemical characteristics of original and new amino acids and evaluates possible splicing changes	all variants
Polyphen-2	predicts the impact of amino acid changes in a human protein based in sequence and structure predictive features	missense
PredictSNP2	predicts the impact of the variants through 6 tools (DANN, FATHMM-MKL, GWAVA, FunSeq2, FitCons, CADD)	all variants
SIFT	classifies amino acid substitution using a sequence homology-based approach	missense and synonymous
SILVA	(R/bioconductor software package) harmfulness prediction of synonymous (silent) mutations	synonymous

SIFT - Sorting Intolerant From Tolerant (Kumar *et al.*, 2009); Polyphen-2 - Polymorphism Phenotyping v.2 (Adzhubei *et al.*, 2010); HSF - Human Splicing Finder (Desmet *et al.*, 2009); MethPrimer (Li and Dahiya, 2002); Motifbreak (Coetzee *et al.*, 2015); SILVA (Buske *et al.*, 2013); PredictSNP2 (Bendl *et al.*, 2016); miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2006); Mutation Taster (Schwarz *et al.*, 2014).

Supplementary table 2 - Differential diagnoses per patient

Patient	HPO term	HPO ID	Acro-renal-Ocular	Anemia de Fanconi	Baller-Gerold	Cornelia de Lange	Holt-Oram	Okhiro*	Rapadilino*	Roberts	SC Focomelia	TAR	Townes-Brocks	VACTERL
01	Absent hallux	HP:0012386												
	Absent radius	HP:0003974		✓	✓		✓	✓			✓	✓ ^{1,2}		✓
	Absent thumb	HP:0009777		✓			✓	✓	✓			✓		
	Aplasia/Hypoplasia of the tibia	HP:0005772												
	Global developmental delay	HP:0001263		✓						✓	✓	✓	✓	
	Hearing impairment - not specified	HP:0000365		✓					✓				✓	
	Microcephaly	HP:0000252		✓		✓ ²				✓	✓		✓	
02	Abnormality of the kidney	HP:0000077			✓							✓	✓	
	Abnormality of the shoulder	HP:0003043										✓		
	Absent radius	HP:0003974		✓	✓		✓	✓			✓	✓ ^{1,2}		✓
	Aplasia/hypoplasia of the humerus	HP:0006507										✓		
	Aplasia/hypoplasia of the ulna	HP:0003022/HP:0006495	✓	✓	✓		✓	✓				✓ ¹		
	Bowed humerus	HP:0003865										✓		
	Carpal bone hypoplasia	HP:0001498										✓		
	Intellectual disability	HP:0001249		✓	✓	✓ ²			✓	✓		✓	✓	
	Meckel diverticulum	HP:0002245		✓								✓		
	Patent foramen ovale	HP:0001655												
	Short stature	HP:0004322		✓ ²	✓ ^{1,2}	✓ ²			✓		✓	✓	✓	
	Talipes equinovarus	HP:0001762										✓		
Thrombocytopenia	HP:0001873		✓ ²		✓				✓		✓ ^{1,2}			
03	Abnormal localization of kidney	HP:0100542		✓	✓									
	Abnormality of the kidney	HP:0000077			✓							✓	✓	
	Absent radius	HP:0003974		✓	✓		✓	✓			✓	✓ ^{1,2}		✓
	Absent thumb	HP:0009777		✓			✓	✓	✓			✓		
	Aplasia/Hypoplasia of the thumb	HP:0009601			✓ ^{1,2}					✓				
	Atresia of the external auditory canal	HP:0000413				✓								
	Conductive hearing impairment	HP:0000405	✓		✓	✓								
	Cryptorchidism	HP:0000028		✓		✓				✓			✓	✓
	Delayed speech	HP:0000750				✓								
	Intellectual disability	HP:0001249		✓	✓	✓ ²			✓	✓		✓	✓	
	Depressed nasal bridge	HP:0005280				✓								
	Microcornea	HP:0000482	✓			✓								
	Renal hypoplasia	HP:0000089				✓		✓					✓	
Synophrys	HP:0000664				✓									
04	Absent radius	HP:0003974		✓	✓		✓	✓			✓	✓ ^{1,2}		✓
	Persistent arterial duct	HP:0001643		✓			✓			✓			✓	✓
	Thrombocytopenia	HP:0001873		✓ ²		✓				✓		✓ ^{1,2}		
	Ventricular septal defect	HP:0001629				✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓
05	Facial midline hemangioma	HP:0004664												
	Phocomelia	HP:0009829				✓	✓			✓ ^{1,2}	✓	✓		
	Short thumb	HP:0009778	✓ ²	✓				✓			✓			✓
06	2-3 toe syndactyly	HP:0004691				✓							✓	
	Abnormality of the kidney	HP:0000077			✓							✓	✓	
	Absent radius	HP:0003974		✓	✓		✓	✓			✓	✓ ^{1,2}		✓
	Anemia	HP:0001903		✓ ²								✓		
	Clinodactyly of the 5th finger	HP:0004209		✓		✓				✓		✓	✓	
	Cryptorchidism	HP:0000028		✓		✓				✓			✓	✓
	Delayed speech	HP:0000750				✓								
	Genu valgum	HP:0002857												
	Hypothyroidism	HP:0000821											✓	
	Short 5th finger	HP:0009237												
Thrombocytopenia	HP:0001873		✓ ²		✓				✓		✓ ^{1,2}			

Supplementary table 2 - Differential diagnoses per patient (continued)

Patient	HPO term	HPO ID	Acro-renal-Ocular	Anemia de Fanconi	Baller-Gerold	Cornelia de Lange	Holt-Oram	Okihiro*	Rapadilino*	Roberts	SC Focomelia	TAR	Townes-Brocks	VACTERL
07	Absent hallux	HP:0012386												
	Absent thumb	HP:0009777		✓			✓	✓	✓			✓		
	Foot monodactyly	HP:0200054												
	Hand monodactyly	HP:0004058												
	Persistent arterial duct	HP:0001643		✓			✓			✓			✓	✓
08	Ventricular septal defect	HP:0001629		✓		✓	✓	✓		✓		✓	✓	
	Cleft palate	HP:0000175		✓	✓	✓			✓	✓		✓		✓
	Tetraphocomelia	HP:0030721								✓				

¹ Very frequent anomalies in the syndrome (present between 80-99% of patients) - GARD data; ² Very frequent anomalies in the syndrome - Orphanet data; * Frequency data not available; TAR - Thrombocytopenia-absent radius; VACTERL - Vertebral defects, Anal atresia, Cardiac defects, tracheo-esophageal fistula, Renal anomalies, and Limb abnormalities association; HPO - Human Phenotype Ontology (Köhler *et al.*, 2018); Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD) (<https://rarediseases.info.nih.gov/>); Orphanet (<https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>).

Supplementary Table 3 -Variants found in *ESCO2*, *SALL4* and *TBX5* genes per patient

Patient	Diagnostic hypothesis	Genes	dbSNP ref	Location	DNA variation	Aminoacid variation	Position	Consequence	Reference allele	Alternative allele	Genotype	ClinVar Classification	VarSome Classification
01	#612447	ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs200666958	chr8:27661096	c.*141T>C		3' UTR (exon 11)		T	C	T/C	likely benign	benign
		ESCO2	rs62498042	chr8:27661085	c.*130G>A		3' UTR (exon 11)		G	A	G/A	benign	benign
		ESCO2	rs35430328	chr8:27631990	c.-151G>A		5' UTR (exon 1)		G	A	G/A	not reported in ClinVar	benign
		SALL4	rs13038893	chr20:50407966	c.1056G>A	p.Ala352=	exon 2	synonymous	C	T	C/T	benign	benign
		SALL4	rs17802735	chr20:50405502	c.2640G>C	p.Ser880=	exon 3	synonymous	C	G	C/G	benign	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		TBX5	rs1248046	chr12:114845506	c.-39+113A>G		intron		T	C	T/C	not reported in ClinVar	benign
		TBX5	rs2277377	chr12:114823187	c.755+94C>A		intron		G	T	G/T	not reported in ClinVar	benign
		TBX5	rs6489956	chr12:114792236	c.*1101A>G		3' UTR (exon 9)		T	C	C/C	benign	benign
		TBX5	rs883079	chr12:114793240	c.*97G>A		3' UTR (exon 9)		C	T	C/T	benign	benign
02	TAR Thrombocytopenia absent radius syndrome	ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs2272730	chr8:27632143	c.-17+19C>T		intron		C	T	T/T	benign	benign
		SALL4	rs13038893	chr20:50407966	c.1056G>A	p.Ala352=	exon 2	synonymous	C	T	T/T	benign	benign
		SALL4	rs17802735	chr20:50405502	c.2640G>C	p.Ser880=	exon 3	synonymous	C	G	C/G	benign	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		SALL4	rs6091375	chr20:50406630	c.2392A>C	p.Ile798Leu	exon 2	missense	T	G	T/G	benign	benign
		TBX5	rs140532076	chr12:114792664	c.*673C>T		3' UTR (exon 9)		G	A	G/A	likely benign	benign
		TBX5	rs2236017	chr12:114832510	c.663+36G>T		intron		C	A	C/A	benign	benign
		TBX5	rs2277377	chr12:114823187	c.755+94C>A		intron		G	T	G/T	not reported in ClinVar	benign
		TBX5	rs6489956	chr12:114792236	c.*1101A>G		3' UTR (exon 9)		T	C	C/C	benign	benign
		TBX5	rs883079	chr12:114793240	c.*97G>A		3' UTR (exon 9)		C	T	C/T	benign	benign
TBX5	rs1248046	chr12:114845506	c.-39+113A>G		intron		T	C	T/C	not reported in ClinVar	benign		

Supplementary Table 3 - Variants found in *ESCO2*, *SALL4* and *TBX5* genes per patient (continued)

Patient	Diagnostic hypothesis	Genes	dbSNP ref	Location	DNA variation	Aminoacid variation	Position	Consequence	Reference allele	Alternative allele	Genotype	ClinVar Classification	VarSome Classification
03	Acro renal ocular syndrome	ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs2272730	chr8:27632143	c.-17+19C>T		intron		C	T	T/T	benign	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		SALL4	rs6021437	chr20:50407162	c.1860A>G	p.Thr620=	exon 2	synonymous	T	C	C/C	benign	benign
		SALL4	rs6126344	chr20:50407502	c.1520T>G	p.Leu507Arg	exon 2	missense	A	C	C/C	benign	benign
		TBX5	rs2236017	chr12:114832510	c.663+36G>T		intron		C	A	A/A	benign	benign
Father 03	father 03	ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs2272730	chr8:27632143	c.-17+19C>T		intron		C	T	C/T	benign	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		SALL4	rs6021437	chr20:50407162	c.1860A>G	p.Thr620=	exon 2	synonymous	T	C	C/C	benign	benign
		SALL4	rs6126344	chr20:50407502	c.1520T>G	p.Leu507Arg	exon 2	missense	A	C	C/C	benign	benign
		TBX5	rs2236017	chr12:114832510	c.663+36G>T		intron		C	A	A/A	benign	benign
		TBX5	rs6489956	chr12:114792236	c.*1101A>G		3' UTR (exon 9)		T	C	T/C	benign	benign
		TBX5	rs883079	chr12:114793240	c.*97G>A		3' UTR (exon 9)		C	T	C/T	benign	benign
04	TAR Thrombocytopenia absent radius syndrome	ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs2272730	chr8:27632143	c.-17+19C>T		intron		C	T	C/T	benign	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		SALL4	rs75554760	chr20:50407465	c.1557C>T	p.Pro519=	exon 2	synonymous	G	A	G/A	likely benign	benign
		TBX5	rs2236017	chr12:114832510	c.663+36G>T		intron		C	A	C/A	benign	benign
		TBX5	rs2277377	chr12:114823187	c.755+94C>A		intron		G	T	G/T	not reported in ClinVar	benign
		TBX5	rs6489956	chr12:114792236	c.*1101A>G		3' UTR (exon 9)		T	C	C/C	benign	benign
		TBX5	rs883079	chr12:114793240	c.*97G>A		3' UTR (exon 9)		C	T	T/T	benign	benign
		TBX5	rs11837917	chr12:114845607	c.-39+12C>A		intron		G	T	G/T	benign	benign
		TBX5	rs1248046	chr12:114845506	c.-39+113A>G		intron		T	C	T/C	not reported in ClinVar	benign
		TBX5	rs78462880	chr12:114845885	c.-305C>A		5' UTR (exon 1)		G	T	G/T	benign	benign
		TBX5	rs79465718	chr12:114846228	c.-648C>G		5' UTR (exon 1)		G	C	G/C	benign	benign

Supplementary Table 3 - Variants found in *ESCO2*, *SALL4* and *TBX5* genes per patient (continued)

Patient	Diagnostic hypothesis	Genes	dbSNP ref	Location	DNA variation	Aminoacid variation	Position	Consequence	Reference allele	Alternative allele	Genotype	ClinVar Classification	VarSome Classification
05	ND ¹	ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs533417099	chr8:27661025	c.*71_*74delTATT		3' UTR (exon 11)		CTATT	C	CTATT/C	uncertain significance	likely benign
		ESCO2	rs62498042	chr8:27661085	c.*130G>A		3' UTR (exon 11)		G	A	G/A	benign	benign
		SALL4	rs146597375	chr20:50409117	c.131-226T>C		intron		A	G	A/G	not reported in ClinVar	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		SALL4	rs6021437	chr20:50407162	c.1860A>G	p.Thr620=	exon 2	synonymous	T	C	C/C	benign	benign
		SALL4	rs6126344	chr20:50407502	c.1520T>G	p.Leu507Arg	exon 2	missense	A	C	C/C	benign	benign
		TBX5	rs12426660	chr12:114792953	c.*384T>C		3' UTR (exon 9)		A	G	A/G	benign	benign
		TBX5	rs2236017	chr12:114832510	c.663+36G>T		intron		C	A	A/A	benign	benign
		TBX5	rs6489956	chr12:114792236	c.*1101A>G		3' UTR (exon 9)		T	C	T/C	benign	benign
		TBX5	rs883079	chr12:114793240	c.*97G>A		3' UTR (exon 9)		C	T	C/T	benign	benign
TBX5	rs1248046	chr12:114845506	c.-39+113A>G		intron		T	C	T/C	not reported in ClinVar	benign		
06	TAR Thrombocytopenia absent radius syndrome	ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs62498042	chr8:27661085	c.*130G>A		3' UTR (exon 11)		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs35430328	chr8:27631990	c.-151G>A		5' UTR (exon 1)		G	A	A/A	not reported in ClinVar	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		TBX5	rs2236017	chr12:114832510	c.663+36G>T		intron		C	A	C/A	benign	benign
		TBX5	rs2277377	chr12:114823187	c.755+94C>A		intron		G	T	G/T	not reported in ClinVar	benign
		TBX5	rs6489956	chr12:114792236	c.*1101A>G		3' UTR (exon 9)		T	C	T/C	benign	benign
TBX5	rs883079	chr12:114793240	c.*97G>A		3' UTR (exon 9)		C	T	C/T	benign	benign		

Supplementary Table 3 - Variants found in *ESCO2*, *SALL4* and *TBX5* genes per patient (continued)

Patient	Diagnostic hypothesis	Genes	dbSNP ref	Location	DNA variation	Aminoacid variation	Position	Consequence	Reference allele	Alternative allele	Genotype	ClinVar Classification	VarSome Classification
07	ND ¹	ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs62498042	chr8:27661085	c.*130G>A		3' UTR (exon 11)		G	A	G/A	benign	benign
		ESCO2	rs2272730	chr8:27632143	c.-17+19C>T		intron		C	T	C/T	benign	benign
		ESCO2	rs35430328	chr8:27631990	c.-151G>A		5' UTR (exon 1)		G	A	G/A	not reported in ClinVar	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		TBX5	rs12426660	chr12:114792953	c.*384T>C		3' UTR (exon 9)		A	G	A/G	benign	benign
		TBX5	rs2236017	chr12:114832510	c.663+36G>T		intron		C	A	C/A	benign	benign
		TBX5	rs2277377	chr12:114823187	c.755+94C>A		intron		G	T	G/T	not reported in ClinVar	benign
		TBX5	rs571924700	chr12:114841450	c.147+107C>A		intron		G	T	G/T	not reported in ClinVar	benign
08	Roberts syndrome	ESCO2	novel variant	chr8:27634507	c.683_696delCGTCACTGGGACGC	p.Pro228HisfsTer5	exon 3	frameshift	CCGTCACTGGGACGC	C	C/C	novel variant	pathogenic
		ESCO2	rs1824449	chr8:27641609	c.1013+35G>A		intron		G	A	A/A	benign	benign
		ESCO2	rs2272730	chr8:27632143	c.-17+19C>T		intron		C	T	T/T	benign	benign
		SALL4	rs13038893	chr20:50407966	c.1056G>A	p.Ala352=	exon 2	synonymous	C	T	C/T	benign	benign
		SALL4	rs13043248	chr20:50406985	c.2037C>T	p.Thr679=	exon 2	synonymous	G	A	G/A	benign	benign
		SALL4	rs6013281	chr20:50408482	c.540T>C	p.Asn180=	exon 2	synonymous	A	G	G/G	benign	benign
		SALL4	rs6021437	chr20:50407162	c.1860A>G	p.Thr620=	exon 2	synonymous	T	C	T/C	benign	benign
		SALL4	rs6126344	chr20:50407502	c.1520T>G	p.Leu507Arg	exon 2	missense	A	C	A/C	benign	benign
		TBX5	rs2277377	chr12:114823187	c.755+94C>A		intron		G	T	T/T	not reported in ClinVar	benign
		TBX5	rs6489956	chr12:114792236	c.*1101A>G		3' UTR (exon 9)		T	C	C/C	benign	benign
		TBX5	rs883079	chr12:114793240	c.*97G>A		3' UTR (exon 9)		C	T	T/T	benign	benign
TBX5	rs1248046	chr12:114845506	c.-39+113A>G		intron		T	C	C/C	not reported in ClinVar	benign		

¹Not defined; Reference sequences are: *ESCO2* transcript NM_001017420, *SALL4* transcript NM_020436 and *TBX5* transcript NM_000192. Ensembl release 75 - GRCh37.p13 (Hunt *et al.*, 2018); ClinVar (Landrum *et al.*, 2018); VarSome (Kopanos *et al.*, 2018).

Supplementary Table 4 - Allelic frequencies of the variants found in the individuals with limb reduction defects

Gene	dbSNP ref	DNA variation	ABraOM	gnomAD genomes				1000 Genomes				n ¹
			MAF	Total MAF	African MAF	Latino MAF	European MAF	Total MAF	African MAF	American MAF	European MAF	
ESCO2	novel variant	c.683_696del CGTCACTGGGACGC										1
ESCO2	rs1824449	c.1013+35G>A	0.0148 (G)	0.0200	0.0720	0.0020	0.0004	0.0220	0.0820	0.0030	0.0000	9
ESCO2	rs200666958	c.*141T>C	no matches (C)	0.0170	0.0530	0.0030	0.0010	0.0250	0.0580	0.0090	0.0010	1
ESCO2	rs2272730	c.-17+19C>T	0.3794 (T)	0.4232	0.3798	0.4316 (C)	0.4363	0.4670	0.3680	0.4860 (C)	0.4240	6
ESCO2	rs35430328	c.-151G>A	0.2736 (A)	0.2580	0.1170	0.2390	0.3300	0.1830	0.0960	0.3080	0.3540	3
ESCO2	rs533417099	c.*73_*76delTTTA	0.0025 (-)	0.0080	0.0310	0.0050	0.0001	0.0060	0.0230	0.0010	0.0000	1
ESCO2	rs62498042	c.*130G>A	0.2442 (A)	0.4300	0.3830	0.3750	0.4410	0.4970	0.4530	0.4900 (G)	0.4580 (G)	4
SALL4	rs13038893	c.1056G>A	0.2660 (T)	0.2950	0.3240	0.1780	0.3250	0.2090	0.3070	0.2050	0.3280	3
SALL4	rs13043248	c.2037C>T	0.0698 (A)	0.0730	0.0220	0.0640	0.1030	0.0440	0.0040	0.0560	0.1150	1
SALL4	rs146597375	c.131-226T>C	0.0117 (G)	0.0090	0.0020	0.0140	0.0130	0.0080	0.0000	0.0200	0.0170	1
SALL4	rs17802735	c.2640G>C	0.0837 (G)	0.0910	0.0210	0.0640	0.1360	0.0500	0.0030	0.0730	0.1270	2
SALL4	rs6013281	c.540T>C	0.0016 (A)	0.0030	0.0020	0.0010	0.0050	0.0030	0.0020	0.0000	0.0040	9
SALL4	rs6021437	c.1860A>G	0.3621 (C)	0.3080	0.2060	0.3100	0.3280	0.3820	0.1980	0.3410	0.3360	4
SALL4	rs6091375	c.2392A>C	0.0739 (G)	0.0720	0.1500	0.0370	0.0510	0.0660	0.1620	0.0490	0.0650	1
SALL4	rs6126344	c.1520T>G	0.3506 (C)	0.2890	0.1400	0.3010	0.3280	0.3590	0.1220	0.3390	0.3350	4
SALL4	rs75554760	c.1557C>T	0.0025 (A)	0.0010	0.0005	0.0000	0.0020	0.0010	0.0000	0.0010	0.0040	1
TBX5	rs11837917	c.-39+12C>A	0.0236 (T)	0.0370	0.1300	0.0130	0.0005	0.0360	0.1270	0.0140	0.0000	1
TBX5	rs12426660	c.*384T>C	0.0363 (G)	0.0090	0.0040	0.1770	0.0010	0.0430	0.0020	0.2250	0.0000	2
TBX5	rs1248046	c.-39+113A>G	0.3396 (C)	0.3190	0.0940	0.2190	0.4580	0.1760	0.0400	0.2390	0.4160	5
TBX5	rs140532076	c.*673C>T	no matches (A)	0.0040	0.0020	0.0040	0.0060	0.0020	0.0010	0.0030	0.0050	1
TBX5	rs2236017	c.663+36G>T	0.4021 (C)	0.4520	0.4200 (A)	0.2640	0.3870	0.4710	0.3930 (A)	0.2970	0.3950	7
TBX5	rs2277377	c.755+94C>A	0.2512 (T)	0.2570	0.2200	0.2010	0.3050	0.1890	0.2180	0.2320	0.3070	6
TBX5	rs571924700	c.147+107C>A	no matches (T)	0.0007	0.0003	0.0000	0.0009	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	1
TBX5	rs6489956	c.*1101A>G	0.2225 (T)	0.1910	0.1880	0.3240	0.1890	0.1920	0.1630	0.3360	0.1900	7
TBX5	rs78462880	c.-305C>A	0.0210 (T)	0.0410	0.1430	0.0140	0.0010	0.0410	0.1450	0.0160	0.0000	1
TBX5	rs79465718	c.-648C>G	0.0455 (C)	0.0410	0.1430	0.0140	0.0010	0.0410	0.1450	0.0160	0.0000	1
TBX5	rs883079	c.*97G>A	0.3481 (C)	0.3250	0.3290	0.4690 (T)	0.2850	0.4280	0.3380	0.4940	0.2850	7

¹number of variants in this sample including patient's father 03; MAF - Minor allele frequency; Reference sequences are *ESCO2* transcript NM_001017420, *SALL4* transcript NM_020436, and *TBX5* transcript NM_000192; *Ensembl* release 75 - GRCh37.p13 (Hunt *et al.*, 2018); ABraOM (Naslavsky *et al.*, 2017); gnomAD genomes (Karczewski *et al.*, 2019); 1000 Genomes (Auton *et al.*, 2015).

Supplementary Table 5 - Functional prediction of variants found in *ESCO2*, *SALL4* and *TBX5* genes

Gene	dbSNP ref	SIFT	Polyphen-2	HSF	MethPrimer	Motifbreak	SILVA	PredictSNP2	miRBase	Mutation Taster
ESCO2	novel variant				no island				Lost hsa-miR-1225-5p	Splicing affected; Protein features might be affected
ESCO2	rs1824449			New ESS site; ESE site broken ¹	no island	TBP, POU6F1		neutral - 6 tools ¹	no matches	Splicing affected ¹
ESCO2	rs200666958			not found				neutral - 5 tools	Lost hsa-miR-3149, won hsa-miR-574-3p	Splicing affected
ESCO2	rs2272730			ESE site broken ¹	no changes	PAX5, ZFX		neutral - 4 tools ¹	no differences	no abrogation of potential splice sites
ESCO2	rs35430328				Changes 1 CpG island ¹			deleterious - 5 tools ¹	no differences	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
ESCO2	rs533417099								Lost hsa-miR-606, Won hsa-miR-3149	Splicing affected
ESCO2	rs62498042			New ESS site; ESE site broken ¹				neutral - 5 tools ¹	Lost hsa-miR-297	Splicing affected ¹
SALL4	rs13038893	tolerated		New ESS site; ESE site broken ¹	Lost of 1 CpG island ¹		Likely benign ¹	neutral - 6 tools ¹	no matches	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
SALL4	rs13043248	tolerated		New ESS site ¹	Changes 1 CpG island ¹		Likely benign ¹	neutral - 6 tools ¹	Won hsa-miR-6874, hsa-miR-9851-3p	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
SALL4	rs146597375			ESE site broken ¹	no island	MYOG, ZBTB7B, NH1H1, TFAP4, MYF6, TCF12		neutral - 5 tools ¹	Won hsa-miR-615	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
SALL4	rs17802735	tolerated		New ESS site ¹	Lost of 1 CpG island		Likely benign ¹	neutral - 6 tools ¹	no matches	Splicing affected; Protein features might be affected ¹

Supplementary Table 5 - Functional prediction of variants found in *ESCO2*, *SALL4* and *TBX5* genes (continued)

Gene	dbSNP ref	SIFT	Polyphen-2	HSF	MethPrimer	Motifbreak	SILVA	PredictSNP2	miRBase	Mutation Taster
SALL4	rs6013281	tolerated		New donor site; New ESS site; ESE site broken ¹	no island		Likely benign ¹	neutral - 6 tools ¹	no matches	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
SALL4	rs6021437	tolerated		No significant splicing motif alteration detected	Changes 2 CpG island ¹		Likely benign ¹	neutral - 6 tools ¹	no matches	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
SALL4	rs6091375	tolerated ¹	benign ¹	ESE site broken ¹	no island	null		neutral - 5 tools ¹	Lost hsa-miR- 10397-5p	Splicing affected; Protein features mightbe affected ¹
SALL4	rs6126344	tolerated ¹	benign ¹	ESE site broken	no island	PPARD, PPARG, ESR2, NR1H2, THRB, RXRA, RXRB, RARB, NR2C1, THRA		neutral - 5 tools ¹	no differences	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
SALL4	rs75554760	tolerated		No significant splicing motif alteration detected	no island			neutral - 6 tools	Lost hsa-miR- 6735-3p, hsa- miR-4692	no abrogation of potential splice sites
TBX5	rs11837917			unexpected error	no island	null		neutral - 5 tools	Lost hsa-miR- 761, hsa-miR- 7851-3p, hsa- miR-490-3p	Splicing affected
TBX5	rs12426660			not found				neutral - 4 tools	Won hsa-miR- 300, hsa-miR- 1185-2-3p, hsa- miR-1185-1-3p	Splicing affected
TBX5	rs1248046			unexpected error	no island	null		neutral - 5 tools ¹	Lost hsa-miR- 6889-3p, hsa- miR-195-5p	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
TBX5	rs140532076			not found				neutral - 4 tools	no matches	Splicing affected
TBX5	rs202095845			ESE site broken				neutral - 6 tools	Lost hsa-miR- 4668-5p	Splicing affected

Supplementary Table 5 - Functional prediction of variants found in *ESCO2*, *SALL4* and *TBX5* genes (continued)

Gene	dbSNP ref	SIFT	Polyphen-2	HSF	MethPrimer	Motifbreak	SILVA	PredictSNP2	miRBase	Mutation Taster
TBX5	rs2236017			New ESS site; ESE site broken ¹	no island	null		neutral - 5 tools ¹	no matches	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
TBX5	rs2277377			ESE site broken ¹	no island	FLI1, ELF2, ZBTB4, ETS1, TEAD1		neutral - 4 tools ¹	Lost hsa-miR- 1207, hsa-miR- 6893	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
TBX5	rs571924700			New donor site ¹	Changes 1 CpG island ¹	RUNX3, IRF5		neutral - 5 tools ¹	no differences	Splicing affected; Protein features might be affected ¹
TBX5	rs6489956			not found				neutral - 5 tools ¹	Lost hsa-miR- 1294	Splicing affected ¹
TBX5	rs78462880				no changes			deleterious - 6 tools	Won hsa-miR- 6763-3p, hsa- miR-6754-3p	Splicing affected; Protein features might be affected
TBX5	rs79465718				no island			neutral - 4 tools	no matches	no abrogation of potential splice sites
TBX5	rs883079			New ESS site ¹				neutral - 4 tools ¹	Lost hsa-miR- 492	Splice donor marginally increased

¹analysis previously conducted by our group and published at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47739-8> (Gomes *et al.*, 2019). SIFT - Sorting Intolerant From Tolerant (Kumar *et al.*, 2009); Polyphen-2 - Polymorphism Phenotyping v.2 (Adzhubei *et al.*, 2010); HSF - Human Splicing Finder (Desmet *et al.*, 2009); MethPrimer (Li and Dahiya, 2002); Motifbreak (Coetzee *et al.*, 2015); SILVA (Buske *et al.*, 2013); PredictSNP2 (Bendl *et al.*, 2016); miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2006); Mutation Taster (Schwarz *et al.*, 2014); ESE - Exonic Splicing Enhancer; ESS - Exonic Splicing Silencer.

5 DISCUSSÃO

As síndromes com defeitos de redução de membros passaram a ganhar notoriedade na comunidade científica a partir da década de 60, quando ocorreram milhares de casos de TE. Contudo, o Brasil continua apresentando novos casos, e a análise dismorfológica juntamente com análise genética em pacientes com DRM são fundamentais para fazer o diagnóstico diferencial, uma vez que a confirmação de ingestão da talidomida nem sempre pode ser confirmada.

Sessenta anos se passaram, e não somente a análise genômica sofreu transformações, mas também as análises fenotípicas, com o surgimento de um grande número de ferramentas de bioinformática. Essas ferramentas nos trazem a oportunidade de estudar em mais detalhes os aspectos genotípicos e fenotípicos da TE e das síndromes genéticas cuja TE é fenocópia, nos permitindo buscar associações entre as variantes e anomalias encontradas e um melhor entendimento dos mecanismos moleculares dessas síndromes.

Com o propósito de melhorar o diagnóstico diferencial clínico, no primeiro artigo fizemos uma revisão comparativa das anomalias disponíveis no HPO das síndromes Anemia de Fanconi (#227650), Síndrome acro-renal-ocular (#607323), Baller-Gerold (#218600), Cornelia de Lange (#122470), Holt-Oram (#142900), Okhiro (#607323), Rapadilino (#266280), Roberts (#268300), SC-Focomelia (#269000), TAR – Trombocitopenia e ausência de rádio (#274000), Townes-Brocks tipo 1 e 2 (#107480/#617466) e Associação VACTERL (%192350). Mansour *et al.* (2019) estão desenvolvendo um algoritmo com a finalidade de fazer diagnóstico diferencial para TE, enquanto nós construímos uma extensa lista comparativa dos fenótipos das principais síndromes similares e disponibilizamos este material para consulta. Dessa forma, é de nosso conhecimento que este seja o primeiro estudo que analisa um grande número de anomalias para vários diagnósticos diferenciais para TE.

A partir de uma lista com mais de 400 fenótipos, apontamos as anomalias que são sobrepostas e as que são diferenciais para cada síndrome analisada. Identificamos achados únicos de TE, especialmente da cintura escapular, também demonstrados recentemente por Mansour *et al.* (2019), e os comparamos com os

achados escapulares encontrados em HOS e TAR. Ainda, salientamos a sobreposição de anomalias de TE encontrada principalmente em RBS e Okihiro.

Além desse proposto, nos questionamos quanto a classificação das síndromes alélicas. RBS e SC-Focomelia, Okihiro e Acro-renal-ocular, e ainda BGS e Rapadilino, são causadas por variantes nos mesmos genes. Nos últimos anos, condições assim têm sido unificadas, de forma que à medida que novos genes vão sendo descobertos, o número de síndromes diminui (Bonafe *et al.*, 2015). Em nossa análise, essas síndromes tiveram grande sobreposição fenotípica, mas anomalias diferenciais também foram encontradas. No caso de RBS e SC-Focomelia, a gravidade do fenótipo é variável, inclusive quanto ao aspecto de sobrevida, importante a ser considerado no aconselhamento genético. No entanto, estudos que analisem a correlação genótipo-fenótipo são difíceis de realizar devido a raridade dessas doenças. Assim, embora possam ser consideradas diferentes espectros de uma mesma condição, elas devem ser unificadas?

No segundo artigo, realizamos a descrição clínica de 8 pacientes com defeitos de redução de membros, e realizamos o teste genético através de um painel NGS e predições *in silico*.

Identificamos uma nova variante deletéria em *ESCO2* no paciente 8 e confirmamos o diagnóstico clínico de RBS. Essa variante foi encontrada no filho de um casal de primos que vive em região cercada pela floresta amazônica. A consanguinidade aqui observada é importantíssima no aconselhamento genético, dada as circunstâncias de moradia/vida do casal e gravidade da doença produzida.

Para o paciente 3, esperávamos encontrar alguma variante em *SALL4*, devido ao diagnóstico clínico de Acro-renal-ocular. Porém, nenhuma variante patogênica foi encontrada, e após análise de sua descrição clínica, sugerimos se tratar de Cornelia de Lange. Este caso, denota a complexidade de diagnóstico entre síndromes de semelhança fenotípica e como ferramentas de bioinformática para análise fenotípica, como o HPO e Phenomizer, podem ser úteis no auxílio do diagnóstico diferencial.

Outro caso interessante dessa série, é o caso 5. A paciente apresenta focomelia de membros superiores e não possui nenhuma variante patogênica em *ESCO2*, *SALL4*, e *TBX5*, que constituem os principais diagnósticos diferenciais para TE. No entanto, encontramos uma VUS em *ESCO2* que é extremamente rara na

população brasileira, e em nosso grupo de pesquisa já foi anteriormente encontrada em mais três pacientes com TE (Gomes *et al.*, 2019). Com isso, acreditamos que possa se tratar de uma variante de suscetibilidade para TE ou DRM e essa hipótese ainda deve ser investigada. Além da focomelia, a paciente apresenta outras anomalias muito compatíveis com TE, e nasceu em região endêmica de hanseníase. Com isso, acreditamos que possa se tratar de um novo caso de TE no Brasil, ainda que a ingestão da talidomida não pode ser confirmada. Esse caso mostra como o estudo de casos com DRM é sensível para a identificação de novos casos de TE, mesmo em uma pequena série como esta. Anteriormente, Vianna *et al.* (2011) desenvolveram um fenótipo de vigilância para TE (TEP – fenótipo de embriopatia por Talidomida) que incluem amelia, defeito de redução intercalar transversal - tal como focomelia, e defeito de redução longitudinal pré-axial. Esse fenótipo se mostrou altamente sensível para identificação de novos casos, e mostrou que as maiores taxas de TEP coincidem com as regiões com maior disponibilidade de talidomida. Nesse mesmo estudo, dois casos com fenótipo altamente sugestivo de TE foram encontradas e a ingestão de talidomida também não pode ser confirmada.

No presente estudo levantamos novas hipóteses que mostram a complexidade de se diagnosticar fenocópias, devido precisamente às suas semelhanças fenotípicas e complexidade genética, e que podem futuramente auxiliar na melhora do diagnóstico dessas síndromes.

Além de questões puramente clínicas e moleculares, é preciso considerar o aspecto humanístico que envolve o trabalho com esses pacientes. Recentemente, um estudo avaliou os aspectos físicos e psicológicos que os pacientes com HOS vivenciam. A análise mostrou que diferentes questões são preocupações nas diferentes etapas de suas vidas, desde a necessidade de adaptações físicas nos primeiros anos de vida, ao medo de rejeição e preocupações com a descendência na vida adulta. Além disso, a análise mostrou que os pacientes buscam tentar entender o porquê de serem diferentes e necessitam entender as causas de seu problema (Brugallé *et al.*, 2019).

Pensando nos pacientes com TE, a explicação da causalidade é especialmente difícil, já que atualmente a confirmação da ingestão da talidomida é necessária para confirmar o diagnóstico no Brasil. No entanto, o uso indiscriminado de medicação é

muito comum no país, e não raro, o usuário não sabe ou não se lembra que medicamento ingeriu.

Nesse sentido, é notável a necessidade de estudos multidisciplinares que busquem melhorar o diagnóstico, aconselhamento genético e qualidade de vida dos pacientes com DRM, uma vez que, apesar de serem doenças raras, as pessoas que passam por esses problemas não podem ser esquecidas.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisamos os genes *ESCO2*, *TBX5* e *SALL4* em oito pacientes com defeitos de redução de membros e identificamos uma nova variante *frameshift* para a Síndrome de Roberts, cumprindo o objetivo geral deste trabalho.

Os objetivos específicos também foram cumpridos, com exceção ao item b) “Identificar associações entre variantes com os tipos de anomalias de membros”, devido ao baixo n alcançado neste projeto.

Ainda, realizamos um trabalho de revisão clínica que não estava incluído nos nossos objetivos, e que se mostrou importante para o diagnóstico diferencial dessas síndromes. Conseguimos também levantar novas hipóteses a serem consideradas nos estudos dessas doenças, mostrando a relevância de se realizar estudos observacionais descritivos.

Agora, como forma de complementar esse projeto, estamos realizando um estudo de biologia de sistemas que engloba os genes de todas as doenças avaliadas no primeiro artigo. Esta análise visa melhorar o entendimento molecular dessas síndromes, de como produzem os fenótipos observados. Podendo inclusive, posteriormente serem utilizados para a criação de um novo painel NGS para síndromes com DRM.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afifi HH, Abdel-Salam GMH, Eid MM, Tosson AMS, Shousha WG, Abdel Azeem AA, Farag MK, Mehrez MI and Gaber KR (2016) Expanding the mutation and clinical spectrum of Roberts syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)* 56:154–162.

Al-Baradie R, Yamada K, St. Hilaire C, Chan WM, Andrews C, McIntosh N, Nakano M, Martonyi EJ, Raymond WR, Okumura S *et al.* (2002) Duane radial ray syndrome (Okhiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *Am J Hum Genet* 71:1195–1199.

Albers CA, Paul DS, Schulze H, Freson K, Stephens JC, Smethurst PA, Jolley JD, Cvejic A, Kostadima M, Bertone P *et al.* (2012) Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet* 44:435–439.

Al-Qattan MM (2016) The Pathogenesis of Radial Ray Deficiency in Thrombocytopenia-Absent Radius (TAR) Syndrome. *J Coll Physicians Surg Pakistan* 26:912–916.

Alves LU, Perez ABA, Alonso LG, Otto PA and Mingroni-Netto RC (2016) Novel frameshift variant in gene SALL4 causing Okhiro syndrome. *Eur J Med Genet* 59:80–85.

Banerji R, Skibbens R V. and Iovine MK (2017) How many roads lead to cohesinopathies? *Dev Dyn* 246:881–888.

Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J *et al.* (1997) Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat. Genet.* 15:30-35.

Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, Bruzzone R, Quadrelli R, Lerone M, Romeo G *et al.* (1999) Different TBX 5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2919-2924.

Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Sangiorgi L, Savarirayan R, Sillence D *et al.* (2015) Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet Part A* 167:2869–2892.

Boogerd CJ, Dooijes D, Ilgun A, Mathijssen IB, Hordijk R, Van De Laar IM, Rump P, Veenstra-Knol HE, Moorman AF, Barnett P *et al.* (2010) Functional analysis of novel TBX5 T-box mutations associated with Holt-Oram syndrome. *Cardiovasc Res* 88:130–139.

Borozdin W, Boehm D, Leipoldt M, Wilhelm C, Reardon W, Clayton-Smith J, Becker K, Mühlendyck H, Winter R, Giray Ö *et al.* (2004a) SALL4 deletions are a common

cause of Okhiro and acro-renal-ocular syndromes and confirm haploinsufficiency as the pathogenic mechanism. *J Med Genet.* 41:e113.

Borozdin W, Wright MJ, Hennekam CM, Hannibal MC, Crow YJ, Neumann TE and Kohlhasse J (2004) Novel mutations in the gene SALL4 provide further evidence for acro-renal-ocular and Okhiro syndromes being allelic entities, and extend the phenotypic spectrum. *J Med Genet.* 41:e102.

Brugallé E, Antoine P, Geerts L, Bellengier L, Manouvrier-Hanu S and Fantini-hauwel C (2019) Growing up with a rare genetic disease: an interpretative phenomenological analysis of living with Holt-Oram syndrome. *Disabil Rehabil* 0:1–8.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Talidomida: orientação para o uso controlado/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.* – Brasília:Ministério da Saúde, 2014. 100 pp.

Brassington AME, Sung SS, Toydemir RM, Le T, Roeder AD, Rutherford AE, Whitby FG, Jorde LB and Bamshad MJ (2003) Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype. *Am J Hum Genet* 73:74–85.

Browne ML, Carter TC, Kay DM, Kuehn D, Brody LC, Romitti PA, Liu A, Caggana M, Druschel CM and Mills JL (2012) Evaluation of genes involved in limb development, angiogenesis, and coagulation as risk factors for congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet Part A* 158:2463–2472.

Castilla EE, Cavalcanti DP, Dutra MG, Lopez Camelo JS, Paz JE and Gadow EC (1995) Limb reduction defects in South America. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 102:393–400.

Castilla EE, Ashton-Prolla P, Barreda-Mejia E, Brunoni D, Cavalcanti DP, Correa-Neto J, Delgadillo JL, Dutra MG, Felix T, Giraldo A *et al.* (1996) Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 54:273–277.

Colombo EA, Mutlu-Albayrak H, Shafeghati Y, Balasar M, Piard J, Gentilini D, Di Blasio AM, Gervasini C, Van Maldergem L and Larizza L (2019) Phenotypic overlap of Roberts and Baller-Gerold syndromes in two patients with craniosynostosis, limb reductions, and ESCO2 mutations. *Front Pediatr* 7:1–7.

Dietschy T, Shevelev I and Stagljar I (2007) The molecular role of the Rothmund-Thomson-, RAPADILINO- and Baller-Gerold-gene product, RECQL4: Recent progress. *Cell Mol Life Sci* 64:796–802.

Donovan KA, An J, Nowak RP, Yuan JC, Fink EC, Berry BC, Ebert BL and Fischer ES (2018) Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane radial ray syndrome. *Elife* 7:1–25.

Fiesco-Roa MO, Giri N, McReynolds LJ, Best AF and Alter BP (2019) Genotype-phenotype associations in Fanconi anemia: A literature review. *Blood Rev.* 37:100589.

Freeman MVR, Williams DW, Schimke RN and Temtamy SA (1974) The Roberts syndrome. *Clin Genet* 5:1–16.

Gerkes EH, van der Kevie-Kersemaekers AMF, Yakin M, Smeets DFCM and van Ravenswaaij-Arts CMA (2010) The importance of chromosome studies in Roberts syndrome/SC phocomelia and other cohesinopathies. *Eur J Med Genet* 53:40–44.

Gold NB, Westgate MN and Holmes LB (2011) Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am J Med Genet Part A* 155:1225–1235.

Gordillo M, Vega H, Jabs EW. Roberts Syndrome. 2006 Apr 18 [Updated 2013 Nov 14]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.

Hayes A, Costa T and Polomeno RC (1985) The okihiro syndrome of Duane anomaly, radial ray abnormalities, and deafness. *Am J Med Genet* 22:273–280.

Herrmann J and Opitz JM (1977) The SC phocomelia and the Roberts syndrome: Nosologic aspects. *Eur J Pediatr* 125:117–134.

Hurst JA, Hall CM and Baraitser M (1991) The Holt-Oram syndrome. *J Med Genet* 28:406–410.

Ito T, Ando H, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H, Suzuki T, Ogura T and Hotta K (2010) Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science* (80-) 327:1345–1350.

Khalil A, Tanos R, El-Hachem N, Kurban M, Bouvagnet P, Bitar F and Nemer G (2017) A HAND to TBX5 Explains the Link Between Thalidomide and Cardiac Diseases. *Sci Rep.* 7:1416.

Kline AD, Moss JF, Selicorni A, Bisgaard AM, Deardorff MA, Gillett PM, Ishman SL, Kerr LM, Levin A V., Mulder PA *et al.* (2018) Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Genet* 19:649–666.

Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L, Liebers M, Kispert A, Laccone F, Turnpenny P, Winter RM and Reardon W (2002) Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet* 11:2979–2987.

Kohlhase J, Schubert L, Liebers M, Rauch A, Becker K, Mohammed SN, Newbury-Ecob R and Reardon W (2003) Mutations at the SALL4 locus on chromosome 20 result in a range of clinically overlapping phenotypes, including Okihiro syndrome,

Holt-Oram syndrome, acro-renal-ocular syndrome, and patients previously reported to represent thalidomide embryopathy. *J Med Genet* 40:473–478.

Kohlhase J. SALL4-Related Disorders. 2004 Aug 16 [Updated 2015 Jan 15]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.

Kowalski TW, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Sanseverino MTV, Hutz MH, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2016) New Findings in eNOS gene and Thalidomide Embryopathy Suggest pre-transcriptional effect variants as susceptibility factors. *Sci Rep* 6:1–6.

Kowalski TW, Dupont Á de V, Rengel BD, Sgarioni E, Gomes J do A, Fraga LR, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2019) Assembling systems biology, embryo development and teratogenesis: What do we know so far and where to go next? *Reprod Toxicol* 88:67–75.

Kowalski TW, Gomes J do A, Garcia GBC, Fraga LR, Paixao-Cortes VR, Recamonde-Mendoza M, Sanseverino MTV, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2020) CRL4-Cereblon complex in Thalidomide Embryopathy: a translational investigation. *Sci Rep* 10:1–13.

Lenz W (1988) A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 38:203–215.

Li QY, Newbury-Ecob R, Terrett JA, Wilson DI, Curtis ARJ, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T *et al.* (1997) Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat. Genet.* 15:21-29.

Mansour S, Baple E and Hall CM (2019) A clinical review and introduction of the diagnostic algorithm for thalidomide embryopathy (DATE). *J Hand Surg Eur Vol* 44:96–108.

Matthews SJ and McCoy C (2003) Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 25:342–395.

Matyskiela ME, Couto S, Zheng X, Lu G, Hui J, Stamp K, Drew C, Ren Y, Wang M, Carpenter A *et al.* (2018) SALL4 mediates teratogenicity as a thalidomide-dependent cereblon substrate. *Nat Chem Biol* 14:981–987.

McBride WG (1961) Thalidomide and Congenital Abnormalities. *Lancet* 278:1358.

McCredie J, North K and Iongh R DE (1984) Thalidomide deformities and their nerve supply. *J Anat* 139:397-410.

McDermott DA, Fong JC, Basson CT. Holt-Oram Syndrome. 2004 Jul 20 [Updated 2019 May 23]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.

McGuirk CK, Westgate M-N and Holmes LB (2001) Limb Deficiencies in Newborn Infants. *Pediatrics* 108:E64.

Mehta PA, Tolar J. Fanconi Anemia. 2002 Feb 14 [Updated 2018 Mar 8]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.

Miller EM, Hopkin R, Bao L and Ware SM (2012) Implications for genotype-phenotype predictions in Townes-Brocks syndrome: Case report of a novel SALL1 deletion and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 158:533–540.

Newman CGH (1986) The Thalidomide Syndrome: Risks of Exposure and Spectrum of Malformations. *Clin Perinatol* 13:555-573.

Oliveira MA, Bermudez JAZ and Souza ACM de (1999) Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada? *Cad Saúde Pública* 15:99–112.

Patel C, Silcock L, McMullan D, Brueton L and Cox H (2012) TBX5 intragenic duplication: A family with an atypical Holt-Oram syndrome phenotype. *Eur J Hum Genet* 20:863–869.

Ríos-Serna LJ, Díaz-Ordoñez L, Candelo E and Pachajoa H (2018) A novel de novo TBX5 mutation in a patient with holt-oram syndrome. *Appl Clin Genet* 11:157–162.

Sadler, TW (2016) Langman, embriologia médica. 13ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 330pp.

Schmidt M and Salzano FM (1983) Clinical studies of teenage Brazilian victims of thalidomide. *Brazilian J Med Biol Res* 16:105–109.

Schüle B, Oviedo A, Johnston K, Pai S and Francke U (2005) Inactivating Mutations in ESCO2 Cause SC Phocomelia and Roberts Syndrome: No Phenotype-Genotype Correlation. *Am J Hum Genet* 77:1117-1128.

Schuler-Faccini L, Soares RCF, De Sousa ACM, Maximino C, Luna E, Schwartz IVD, Waldman C and Castilla EE (2007) New cases of thalidomide embryopathy in Brazil. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol* 79:671–672.

Smithells RW (1973) Defects and Disabilities of Thalidomide Children. *Br Med J* 1:269–272.

Smithells RW and Newman CGH (1992) Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29:716–723.

Solomon BD (2018) The etiology of VACTERL association: Current knowledge and hypotheses. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 178:440–446.

Stevenson RE, Hall JG, Everman DB, Solomon BD (2016) *Human Malformations and Related Anomalies*. 3rd edition. Oxford University Press, New York, 1000pp.

Sundaresan L, Kumar P, Manivannan J, Balaguru UM, Kasiviswanathan D, Veeriah V, Anishetty S and Chatterjee S (2019) Thalidomide and Its Analogs Differentially Target Fibroblast Growth Factor Receptors: Thalidomide Suppresses FGFR Gene Expression while Pomalidomide Dampens FGFR2 Activity. *Chem Res Toxicol* 32:589–602.

Van den Berg DJ and Francke U (1993) Roberts syndrome: A review of 100 cases and a new rating system for severity. *Am J Med Genet* 47:1104–1123.

Vanlerberghe C, Jourdain AS, Ghoumid J, Frenois F, Mezel A, Vaksmann G, Lenne B, Delobel B, Porchet N, Cormier-Daire V *et al.* (2019) Holt-Oram syndrome: clinical and molecular description of 78 patients with TBX5 variants. *Eur J Hum Genet* 27:360–368.

Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, Van Gosliga D, Kayserili H, Xu C, Ozono K *et al.* (2005) Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet* 37:468–470.

Vega H, Trainer AH, Gordillo M, Crosier M, Kayserili H, Skovby F, Uzielli MLG, Schnur RE, Manouvrier S, Blair E *et al.* (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. *J Med Genet* 47:30–37.

Vianna FSL, Lopez-Camelo JS, Leite JCL, Sanseverino MTV, da Graça Dutra M, Castilla EE and Schüler-Faccini L (2011) Epidemiological surveillance of birth defects compatible with thalidomide embryopathy in Brazil. *PLoS One* 6:e21735.

Vianna FSL, Fraga LR, Tovo-Rodrigues L, Tagliani-Ribeiro A, Biondi F, Maximino CM, Sanseverino MTV, Hutz MH and Schuler-Faccini L (2013a) Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy. *Nitric Oxide* 35:89–92.

Vianna FSL, Schüler-Faccini L, Leite JCL, De Sousa SHC, Da Costa LMM, Dias MF, Morelo EF, Doriqui MJR, Maximino CM and Sanseverino MT V. (2013b) Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: New cases and review of the main dysmorphological findings. *Clin Dysmorphol* 22:59–63.

Vianna FSL, Zagonel De Oliveira M, Sanseverino MTV, Morelo EF, De Lyra D, Neto R, Lopez-Camelo J, Camey SA and Schuler-Faccini L (2015) Pharmacoepidemiology and thalidomide embryopathy surveillance in Brazil. *Reprod Toxicol* 53:63–67.

Vianna FSL, Kowalski TW, Fraga LR, Sanseverino MTV and Schuler-Faccini L (2017) The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil. *Eur J Med Genet* 60:12–15.

Waldenmaier C, Aldenhoff P and Klemm T (1978) The Roberts syndrome. *Hum Genet* 40:345–349.

APÊNDICE A – CLASSIFICAÇÃO DOS DEFEITOS DE REDUÇÃO DE MEMBROS PROPOSTA POR GOLD ET AL. (2011).

	MEMBROS SUPERIORES	MEMBROS INFERIORES
	Ausência Completa	Ausência Completa
	Intercalar	Intercalar
	Terminal Transverso com amputação no nível do braço superior (úmero distal) com nubbins	Terminal Transverso com amputação no nível do fêmur distal com nubbins
	Terminal Transverso com amputação no nível do braço superior (úmero distal) sem nubbins	Terminal Transverso com amputação no nível do fêmur distal sem nubbins
	Terminal Transverso com amputação no nível do antebraço (proximal) com nubbins	Terminal Transverso com amputação no nível da canela (proximal) com nubbins
	Terminal Transverso com amputação no nível do antebraço (proximal) sem nubbins	Terminal Transverso com amputação no nível da canela (proximal) sem nubbins
	Terminal Transverso com amputação no nível do pulso com nubbins	Terminal Transverso com amputação no nível do tornozelo com nubbins
	Terminal Transverso com amputação no nível do pulso sem nubbins	Terminal Transverso com amputação no nível do tornozelo sem nubbins
	Terminal Transverso com amputação no nível do meio da mão com nubbins	Terminal Transverso com amputação no nível do antepé com nubbins
	Terminal Transverso com amputação no nível do meio da mão sem nubbins	Terminal Transverso com amputação no nível do antepé sem nubbins
	Terminal Transverso com amputação no nível de articulações metacarpofalângicas (MCP) dígitos 2-5	Terminal Transverso com amputação no nível de articulações metatarsofalângica (MTP) dígitos 2-5
	Terminal Transverso com amputação no nível de articulações metacarpofalângicas (MCP) dígitos 1-4	Terminal Transverso com amputação no nível de articulações metatarsofalângica (MTP) dígitos 1-4
	Terminal Transverso com amputação no nível de articulações metacarpofalângicas (MCP) dígitos 1-5	Terminal Transverso com amputação no nível de articulações metatarsofalângica (MTP) dígitos 1-5
Ausência Parcial	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de rádio e dígito 1	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de tíbia e dígito 1
	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de rádio e dígito 1-2	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de tíbia e dígito 1-2
	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1
	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1-2	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1-2
	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1-3	Longitudinal pré-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1-3
	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 2	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 2
	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 3	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 3
	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 4	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 4
	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 2-3	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 2-3
	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 3-4	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 3-4
	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 2-4	Longitudinal central com ausência ou hipoplasia de dígito 2-4
	Longitudinal pós-axial com ausência ou hipoplasia de ulna e dígito 5	Longitudinal pós-axial com ausência ou hipoplasia de fíbula e dígito 5
	Longitudinal pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 5	Longitudinal pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 5
	Longitudinal pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 4-5	Longitudinal pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 4-5
	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de ulna, rádio e dígito 1	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de tíbia, fíbula e dígito 1
	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1 e 5	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1 e 5

Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 2 e 5	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 2 e 5
Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1 e 3-5	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1 e 3-5
Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1-2 e 4-5	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 1-2 e 4-5
Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 2-5	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de dígito 2-5
Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de rádio e dígito 5	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de tíbia e dígito 5
Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de rádio, dígito 1 e 5	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de tíbia, dígito 1 e 5
Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de rádio e dígito 1-4	Longitudinal pré e pós-axial com ausência ou hipoplasia de tíbia e dígito 1-4

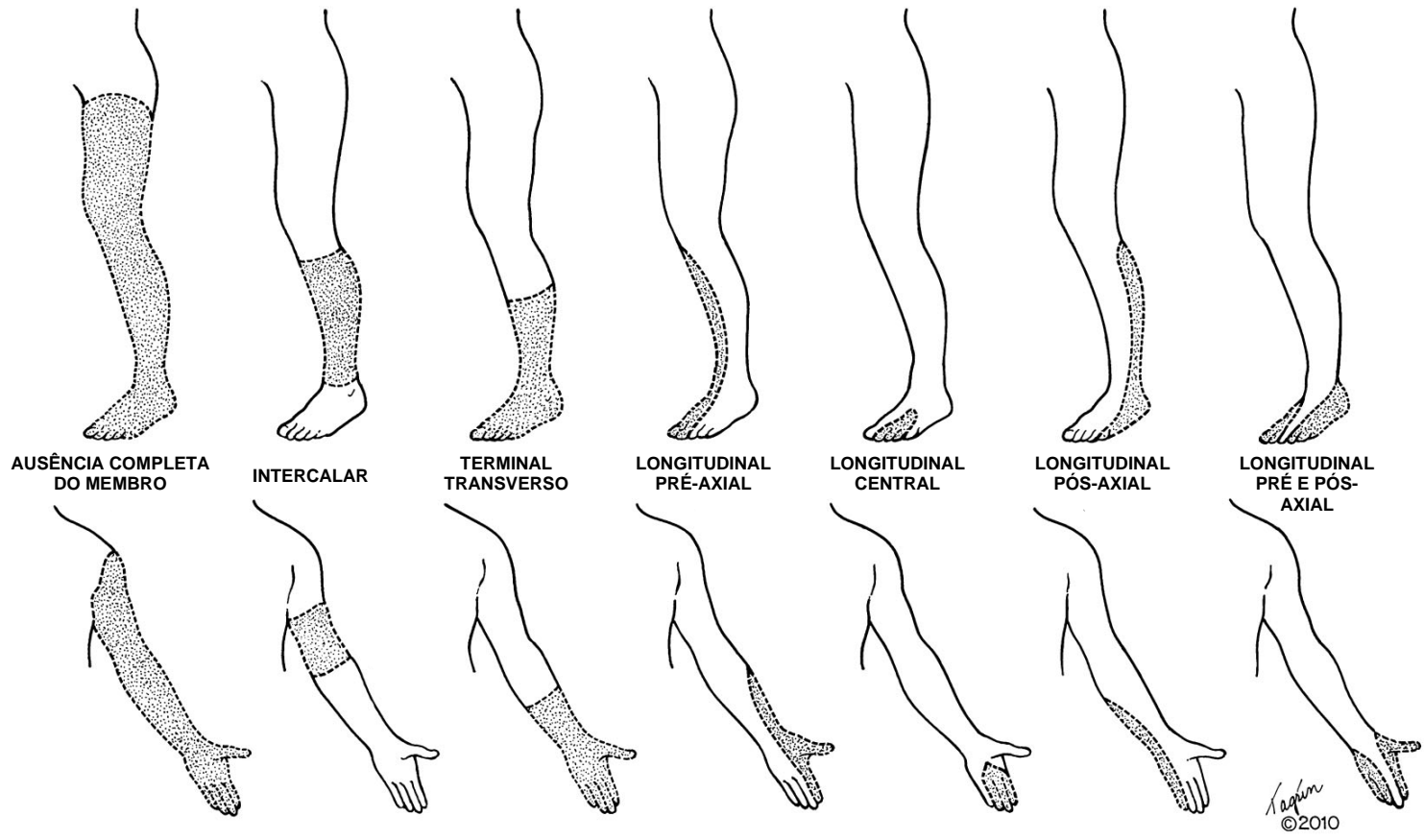


Figura adaptada de Gold *et al.* (2011)

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE TRIAGEM (FORMATO RASCUNHO)

Formulário para Triagem

Dados do Médico

1. Nome Completo/CRM

2. Telefone

3. E-mail

4. Endereço Completo

Dados de Triagem

5. O(a) paciente apresenta alguma(as) das seguintes anomalias?

Marque todas que se aplicam.

- Focomelia de membros superiores e/ou inferiores
- Amelia de membros superiores e/ou inferiores
- Defeito de redução pré-axial de membros superiores (rádio/polegar)
- Polegar/hálux duplicado ou polegar trifalângico

6. Ele(a) está recebendo benefício do INSS por diagnóstico de embriopatia por talidomida?

Marcar apenas uma oval.

- Sim *Após a última pergunta desta seção, interromper o preenchimento deste formulário.*
- Não

7. Além das anomalias acima, o(a) paciente também apresenta alguma das anomalias a seguir?

Marcar apenas uma oval.

- Defeito transversal terminal (amputações/bridões) de membros superiores e/ou inferiores
Pare de preencher este formulário.
- Defeitos pós-axiais de membros superiores e/ou inferiores sem presença de defeitos pré-axiais
Pare de preencher este formulário.
- Sindactílios/polidactílios pós-axiais de membros superiores e/ou inferiores *Pare de preencher este formulário.*
- Ectrodactília (ausência de raio central) de membros superiores e/ou inferiores *Pare de preencher este formulário.*
- Mais de uma alternativa acima *Pare de preencher este formulário.*
- Nenhuma das alternativas acima

Dados do Paciente**8. Nome Completo**

9. Sexo*Marcar apenas uma oval.*

- Feminino
- Masculino
- Outro: _____

10. Data de Nascimento

*Exemplo: 15 de dezembro de 2012***11. Local de Nascimento**

12. Nome e idade dos pais

13. Escolaridade da Mãe*Marcar apenas uma oval.*

- Analfabeta
- Lê e escreve
- Ensino fundamental incompleto
- Ensino fundamental completo
- Ensino médio incompleto
- Ensino médio completo
- Ensino superior incompleto
- Ensino superior completo
- Pós-graduação

14. Escolaridade do pai*Marcar apenas uma oval.*

- Analfabeto
- Lê e escreve
- Ensino fundamental incompleto
- Ensino fundamental completo
- Ensino médio incompleto
- Ensino médio completo
- Ensino superior incompleto
- Ensino superior completo
- Pós-graduação

Histórico Familiar

15. Marcar apenas uma oval por linha.

	Sim	Não
Consanguinidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Malformações Congênitas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doenças Genéticas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abortos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Morte Precoce	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

16. Se sim, descreva aqui (grau de consanguinidade, doenças, etc.)

Histórico Pré-natal e Perinatal

17. DUM

18. Dados pré-natais (nº de consultas, local, alterações, exames, medicações ou suplementos ingeridos)

19. Teratógenos

Marcar apenas uma oval por linha.

	Sim	Não	Não sabe
Álcool	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Drogas (incluindo medicações)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tabaco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Agrotóxicos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Químicos/Poluentes	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Radiação	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

20. Se sim, especifique aqui (o quê, quanto e quando)

21. Diagnóstico Pré-natal

22. Tipo do Parto

Marcar apenas uma oval.

Vaginal

Cesária

23. Idade gestacional ao nascer (semanas/dias)

24. Outras informações relevantes da gestante/gestação

Descrição Clínica

Descreva aqui dados morfológicos e resultados de exames.

25.

26. Anexe aqui fotos, vídeos, exames, heredograma, prontuário, DNV ou outro documento que achar pertinente

Arquivos enviados:

APÊNDICE C – TCLE PARA ADULTOS

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 95386618.1.0000.5327

Título do Projeto: Investigação de variantes nos genes *ESCO2*, *TBX5* e *SALL4* em casos de defeitos de redução de membros

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar a presença de alterações genéticas em regiões do DNA associadas a síndromes genéticas de alterações de membros (braços e pernas). Você está sendo convidado(a) a participar dessa pesquisa porque apresenta alterações nos membros e ainda não tem um diagnóstico definitivo. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, você deverá coletar uma amostra de saliva (em torno de 4mL, uma colher de chá) para que sejam avaliadas as regiões do DNA associadas a Síndromes genéticas que frequentemente apresentam alterações de membros. Além disso, nós necessitaremos coletar dados sobre sua história familiar e de saúde, assim como ter acesso a exames que você já fez que possam ajudar no diagnóstico.

A coleta de saliva poderá causar desconfortos passageiros, pois algumas pessoas podem ter dificuldades de produzir saliva. Nesses casos, sugere-se adicionar meia colher de chá de açúcar na boca para auxiliar a produção de saliva. A coleta não deve durar mais de 5 minutos. Os participantes não podem comer, beber ou fumar em um período de 30 minutos antes da coleta.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são a identificação de uma variante causadora das alterações que o paciente apresenta, auxiliando assim no diagnóstico e aconselhamento genético. No entanto, as variantes genéticas identificadas podem não ter qualquer relação com as malformações ou ainda não se ter exato conhecimento sobre seu significado em relação às alterações que o paciente apresenta. Todos os participantes receberão o resultado e aconselhamento genético individualizado, ou seja, serão informados sobre a repercussão do resultado para o participante e seus familiares.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Lavinia Schüller-Faccini, pelo telefone (51) 3359-8011 ou (51) 3308-9819, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconsentir com o uso do material.

Com relação ao armazenamento de amostras biológicas:

- Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.
 Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

APÊNDICE D – TCLE PARA RESPONSÁVEIS

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 95386618.1.0000.5327

Título do Projeto: Investigação de variantes nos genes *ESCO2*, *TBX5* e *SALL4* em casos de defeitos de redução de membros

O(a) paciente pelo qual você é responsável está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar a presença de alterações genéticas em regiões do DNA associadas a síndromes genéticas de alterações de membros (braços e pernas). Ele(a) está sendo convidado(a) a participar dessa pesquisa porque apresenta alterações nos membros e ainda não tem um diagnóstico definitivo. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se aceitar participar da pesquisa, o(a) paciente deverá coletar uma amostra de saliva (em torno de 4mL, uma colher de chá) para que sejam avaliadas as regiões do DNA associadas a Síndromes genéticas que frequentemente apresentam alterações de membros. Para pessoas com dificuldades em realizar a coleta de saliva, em especial crianças pequenas, a coleta poderá ser realizada por meio de um cotonete que será deslizado na parte interna da bochecha. Além disso, nós necessitaremos coletar dados sobre sua história familiar e de saúde, assim como ter acesso a exames que ele(a) já fez que possam ajudar no diagnóstico.

A coleta de saliva poderá causar desconfortos passageiros, pois algumas pessoas podem ter dificuldades de produzir saliva. Nesses casos, sugere-se adicionar meia colher de chá de açúcar na boca para auxiliar a produção de saliva. A coleta não deve durar mais de 5 minutos. Os participantes não podem comer, beber ou fumar em um período de 30 minutos antes da coleta.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são a identificação de uma variante causadora das alterações que o paciente apresenta, auxiliando assim no diagnóstico e aconselhamento genético. No entanto, as variantes genéticas identificadas podem não ter qualquer relação com as malformações ou ainda não se ter exato conhecimento sobre seu significado em relação às alterações que o paciente apresenta. Todos os participantes receberão o resultado e aconselhamento genético individualizado, ou seja, serão informados sobre a repercussão do resultado para o participante e seus familiares.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso não autorize a participação, ou ainda, desistir de participar e retirar o consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que ele(a) recebe ou possa vir a receber.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e ele(a) não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, ele(a) receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Lavinia Schüller-Faccini, pelo telefone (51) 3359-8011 ou (51) 3308-9819, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e ele(a) será chamado para reconsentir com o uso do material.

Com relação ao armazenamento de amostras biológicas:

- Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.
 Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (*se aplicável*)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____