

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SUBTELOMÉRICAS EM PACIENTES COM
MALFORMAÇÕES MÚLTIPLAS E RETARDO MENTAL DE ETIOLOGIA
DESCONHECIDA

TESE DE DOUTORADO

MARILUCE RIEGEL

Porto Alegre, 2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SUBTELOMÉRICAS EM PACIENTES COM
MALFORMAÇÕES MÚLTIPLAS E RETARDO MENTAL DE ETIOLOGIA
DESCONHECIDA

MARILUCE RIEGEL

Orientadores

Prof. Dr. Roberto Giugliani

Prof. Dr. Albert Schinzel

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Medicina: Clínica Médica, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do
título de Doutor.

Porto Alegre

2000

R554a Riegel, Mariluce

Alterações cromossômicas subteloméricas em pacientes com malformações múltiplas e retardo mental de etiologia desconhecida / Mariluce Riegel ; orientadores Roberto Giugliani e Albert Schinzel. – Porto Alegre, 2000.

116 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica.

1. Transtornos cromossômicos do sistema nervoso. 2. Anormalidades cromossômicas. 3. Retardo mental. I. Giuliani, Roberto. II. Schinzel, Albert. III. Título.

NLM: QS 677

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Albert Schinzel, diretor do Instituto de Genética Médica da Universidade de Zurique, Suíça.

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, Chefe do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

À Fundação Nacional Suíça de Apoio a Pesquisa, Zurique, Suíça.

SUMÁRIO

- Lista de Abreviaturas.....	5
- Introdução e Revisão da Literatura.....	8
a) Citogenética Molecular.....	8
b) Estrutura dos telômeros.....	9
c) Alterações cromossômicas e síndromes com múltiplas malformações congenitas e retardo mental de etiologia desconhecida.....	15
d) A utilização de métodos citogenéticos em diagnósticos clínicos.....	19
- Objetivos.....	23
- Referências Bibliográficas.....	24
- Artigo 1. "Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformation syndromes".....	40
- Versão em português do artigo 1.....	47
- Artigo 2. "Submicroscopic terminal deletions and duplications in patients with unclassified malformation syndromes".....	61
- Versão em português do artigo 2.....	85

- Anexo I: Consentimento Livre e Esclarecido.....	110
- Anexo II: Artigos publicados.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACA	Aberrações cromossômicas autossômicas
bp	Pares de bases
C	Citosina
CGH	Hibridização genômica comparativa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
G	Guanina
HVPs	Polimorfismos hipervariáveis de DNA
Kb	Quilobase ou mil pares de base
MCM	Malformações congênitas múltiplas
PAR1	Região pseudoautossômica 1
PAR2	Região pseudoautossômica 2
RFLP	Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição
RM	Retardo mental
SRY	Região específica do cromossomo Y
T	Timidina
VNTRs	Número variável de repetições em <i>tandem</i>

RESUMO

Este projeto teve como objetivos específicos , em uma amostra selecionada: (1) Identificar alterações cromossômicas que envolvem a região dos telômeros; (2) Determinar a frequência de alterações cromossômicas que envolvem a região dos telômeros; (3) Investigar a contribuição de alterações cromossômicas envolvendo a região dos telômeros para síndromes de malformações congênitas múltiplas e retardo mental de etiologia desconhecida e, (4) Caracterizar do ponto de vista molecular as regiões envolvidas em alterações cromossômicas subteloméricas.

A seleção da amostra foi feita primeiramente através de um levantamento das fichas clínicas (com dados genéticos e de dismorfologia) de pacientes com um padrão de anomalias maiores e menores e atraso de desenvolvimento, que apresentavam um cariótipo de bandas com resultado normal. Foram excluídos da amostra aqueles pacientes que possuíam cariótipo com resultado alterado. Todos os pacientes já haviam sido submetidos a um exame clínico. Os critérios utilizados para incluir os pacientes na amostra foram atraso de desenvolvimento de grau leve a moderado e um padrão de pelo menos 5 características dismórficas distintas. Além disto, a maioria dos pacientes apresentava um retardo de crescimento pré e/ou pós-natal, e muitos apresentavam malformações maiores de órgãos. Entretanto, a presença de um ou ambos destes critérios não foi requerido como um achado obrigatório. Finalmente, foram incluídos neste estudo 102 pacientes.

O estudo a que se propôs este projeto foi complementar as investigações citogenéticas normalmente realizadas em pacientes com quadro clínico indicativo de

cromossomopatias. Todas as informações referentes a qualquer tipo de abordagem citogenética foram esclarecidas previamente.

O material necessário para as investigações citogenéticas foi obtido à partir de 5 ml de punção venosa de sangue periférico com seringa heparinizada e 5 ml de punção venosa de sangue periférico com EDTA para extração e análise de DNA. As culturas de linfócitos foram realizadas segundo modificação da técnica de Moorhead et al. (1960). Após a obtenção de cromossomos metafásicos utilizamos o método de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) com 41 sondas de DNA específicas para as regiões subteloméricas.

Encontramos 5 alterações cromossômicas, sendo que duas destas foram consideradas variantes familiares sem influência no fenótipo. As alterações significantes incluem 1 deleção *de novo* (1p) e 2 duplicações *de novo* (8p e 9p). Concluímos que, dependendo do critério de seleção, a investigação de pacientes com retardo mental não explicado e um padrão de anomalias menores mostra rearranjos submicroscópicos desbalanceados que explicariam 3-8% do fenótipo; que a porcentagem de alterações cromossômicas será maior se investigarmos famílias com mais de um membro afetado; e, que o exame pelo método de FISH é mais adequado do que a análise molecular por marcadores devido a sua capacidade de detectar duplicações e deleções.

Os benefícios envolvidos na participação dos pacientes neste estudo estão relacionados com a possibilidade de um aconselhamento genético pelo qual os pacientes e/ou familiares com uma alteração cromossômica serão informados das conseqüências desta alteração. O aconselhamento genético, baseado no diagnóstico citogenético, procurará auxiliar os indivíduos afetados ou indivíduos em risco a entenderem a natureza da doença genética, sua transmissão e as opções possíveis para eles no manejo da doença e no planejamento familiar.

a) Citogenética Molecular

Na última década, o desenvolvimento da citogenética molecular tem aumentado a capacidade de diagnóstico pré-natal e pós-natal em relação à detecção e melhor caracterização de alterações cromossômicas em humanos (Lichter et al., 1991; Trask 1991).

A aplicação de técnicas citogenéticas utilizando instrumentos da biologia molecular têm permitido: **1)** a identificação de aberrações cromossômicas previamente descritas, particularmente cromossomos extras e duplicações *de novo*, as quais, com os métodos de bandeamento de citogenética convencionais, não poderiam ser caracterizadas (Callen et al., 1992; Carter et al., 1992; Daniel et al., 1994; Ohashi et al., 1994) **2)** a detecção de microdeleções e duplicações em nível de resolução gênica (Lupski et al., 1991; Ledbetter, 1992; Ewart et al., 1993; Estabrooks et al., 1994; Flint et al., 1995; Ghaffari et al., 1998; Horsley et al., 1998) **3)** a contribuição para o mapeamento de genes em combinação com várias alterações citogenéticas (Griffin et al., 1998), como por ex., identificação de microdeleções e translocações balanceadas ou inversões com disrupção de um ou mais genes (Dauwerse et al., 1990; Altherr et al., 1991; Kuwano et al., 1991; Breuning et al., 1993; Chevillard et al., 1993; Ewart et al., 1993; Fukushima et al., 1993; Brook-Carter et al., 1994; Girardeau et al., 1997) , e o **4)** estabelecimento de testes rápidos e de *screening* citogenéticos, como por ex., em testes de pré-natal e materiais de aborto (Cremer et al., 1986; Cremer et al., 1988; Deville et al., 1988; Ohashi et al., 1993; Ward et al., 1993; Knight et al., 1997; Eiben et al., 1998; Eiben et al., 1999).

Alterações cromossômicas submicroscópicas têm sido freqüentemente associadas a síndromes de retardo mental de etiologia desconhecida e múltiplas malformações congênitas. Através do uso de sondas de DNA pelo método de hybridização *in situ* por fluorescência (FISH) é possível se determinar um considerável número de aberrações cromossômicas não identificáveis através dos métodos de citogenética convencionais.

b) Estrutura dos telômeros

Telômeros são complexos especializados de proteínas de DNA situados nas extremidades dos cromossomos de eucariontes. Como estruturas dinâmicas, aparentemente os telômeros são necessários para a replicação cromossômica normal e estabilidade dos cromossomos, protegendo suas extremidades da degradação (Blackburn, 1990).

Os telômeros dos cromossomos humanos consistem em seqüências de DNA repetitivas (TTAGGG) de 3 a 20 Kb dispostas em *tandem*, as quais são altamente conservadas entre os vertebrados (Moyzis et al., 1988; Meyne et al., 1989). As seqüências de TTAGGG repetitivas correspondem ao DNA telomérico que pode variar em comprimento em humanos de acordo com a idade do indivíduo e também em pacientes com câncer (Counter 1996; Holt et al., 1996; Landsdorp et al., 1996).

Em humanos, as seqüências teloméricas diminuem em comprimento com o aumento da idade, com uma taxa de perda de 40 - 60 bp por ano, nos tecidos com altas taxas de proliferação. Parece não ocorrer uma perda de seqüências essenciais durante toda a vida do indivíduo. Entretanto, esta perda de seqüências tem sido relacionada a um aumento de rearranjos cromossômicos terminais de acordo com o aumento da idade. A

perda de seqüências de telômeros associada com quebras cromossômicas, resulta de mutações espontâneas. As quebras terminais são estabilizadas por um processo no qual a telomerase, enzima ribonucleica que sintetiza as seqüências teloméricas, adiciona diretamente seqüências teloméricas repetitivas ao DNA não telomérico (Wilkie et al., 1990; Lamb et al., 1993).

Também tem sido proposto uma relação entre o tamanho das seqüências teloméricas e o desenvolvimento de determinados tumores. As células que desencadeiam o processo tumoral, apresentam perdas consideráveis de seqüências teloméricas normais (Hastie et al., 1990). Supõem-se que a telomerase é inativa nos tecidos somáticos e que o tamanho destas seqüências é um indicador do número de divisões celulares que formam um tecido em particular (Hastie et al., 1990; Counter 1996). A perda gradual do DNA telomérico levaria a uma instabilidade cromossômica, contribuindo desta maneira no processo de senescência celular.

Imediatamente adjacente a estas seqüências simples de DNA repetitivo (telômeros) , existe um complexo de elementos subteloméricos repetitivos, com diferente periodicidade e variável número de cópias, dos quais alguns parecem ser únicos no genoma (Hing et al., 1993). Proximal a região subtelomérica existe uma seqüência de DNA única para cada telômero, que contém genes específicos, e que se localiza cerca de 100-300 Kb da extremidade de cada cromossomo (National Institutes of Health NIH, 1996). Portanto, esta seqüência única de DNA é a que contém genes para cada extremidade dos cromossomos.

Quantidades variáveis de seqüências de DNA repetitivo subtelomérico provavelmente influenciam a expressão de genes localizados dentro destas regiões.

Portanto, é provável que rearranjos subteloméricos submicroscópicos resultantes de eventos de quebra e reparo representem uma importante causa de determinadas doenças genéticas.

Além da natureza única da região repetitiva subtelomérica, existem ainda outros aspectos da estrutura dos telômeros que estão relacionados ao papel que estes possuem nos mecanismos de rearranjos cromossômicos e desequilíbrio de dosagem de genes. A primeira evidência é que as regiões de seqüência única dos telômeros em humanos contém altas concentrações de genes estruturais (Bickmore & Bird, 1992), maiores do que qualquer outra região cromossômica no genoma (Saccone et al., 1992), e possuem uma alta atividade de transcrição e recombinação (Holmquist, 1992). Estas observações baseiam-se na identificação de elementos ricos em Citosina-Guanina (CG) com uma alta freqüência de ilhas CpG em bandas Teloméricas nos telômeros humanos (Saccone et al., 1992; Craig & Bickmore, 1994), e no sequenciamento de DNA de vários telômeros (Flint et al., 1997a; Flint et al., 1997b; Rosenberg et al., 1997).

Estas observações sugerem também que deleções submicroscópicas ou duplicações envolvendo os telômeros devem ter uma influência clínica maior do que rearranjos desbalanceados em outras regiões cromossômicas. Um exemplo disto é a recente caracterização de uma deleção subtelomérica em 22q. Embora esta deleção tivesse menos do que 130 Kb, estava associada com retardo mental e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (Wong et al., 1997)

Como citamos anteriormente, uma considerável quantidade variável de seqüências de DNA telômero-adjacentes, as quais estão presentes em algumas regiões subteloméricas (Ijdo et al., 1992), têm influência na expressão de genes localizados

dentro destas regiões (Brown et al., 1990). Provavelmente estas seqüências devem mediar o pareamento de cromossomos não homólogos e eventos únicos de *crossing over*, os quais poderiam levar à um desequilíbrio na dosagem de genes.

Uma segunda evidência da influência dos telômeros nos mecanismos de rearranjos cromossômicos e desequilíbrio de dosagem de genes, é que os telômeros humanos têm um aumento nas taxas de recombinação genética quando comparados com outras regiões do genoma. Tem sido observado que existe um aumento nas taxas de recombinação nas regiões teloméricas em ambos o sexos em humanos.

Embora as taxas de recombinação em mulheres sejam geralmente mais altas do que em homens para a maioria das regiões do genoma, este modelo não é o mesmo para as regiões teloméricas. A taxa de recombinação telomérica em homens é significativamente maior do que em mulheres (Blouin et al., 1995; Donis-Keller et al., 1987; Rouyer et al., 1990). A única exceção conhecida ocorre nas regiões cromossômicas 14q, nas quais as taxas de recombinação em ambos os sexos são aumentadas, mas a recombinação telomérica em mulheres é ainda maior do que em homens (Wintle et al., 1997).

Esta alta taxa de recombinação dos telômeros poderia ter influência nas taxas de trocas cromossômicas, como tem sido observado em ambas as regiões PAR dos cromossomos X e Y. Recombinações únicas da região PAR1 (Xp;Yp) acontecem em 80% dos homens XX (1/20000 homens nascidos), devido a translocação do gene SRY para Xp (Rouyer et al., 1987; Weil et al., 1994). O mesmo é observado em mulheres XY, onde o gene SRY está deletado. Mais recentemente, eventos similares de troca única afetando a

região PAR2(Xq;Yq) têm sido observados. Estes eventos levam a uma síndrome de retardo mental grave em homens com cariótipos Yq- (Lahn et al., 1994).

Um terceiro fator único dos telômeros humanos é o papel destes no pareamento cromossômico meiótico. Estudos de citogenética clássica sugerem que os telômeros são parte integral do pareamento cromossômico de homólogos na meiose e que talvez sejam as primeiras regiões dos cromossomos a se parearem. O mecanismo preciso que medeia este processo de procura pelo homólogo permanece relativamente obscuro. Entretanto, estudos recentes com FISH em uma variedade de espécies têm demonstrado fatores altamente conservados do comportamento dos telômeros na prófase meiótica (Lese & Ledbetter, 1998).

Estudos em humanos e ratos mostram que os telômeros se movem para o envelope nuclear e se agregam em uma formação de *bouquet* (Scherthan et al., 1996; Bass et al., 1997). Este evento precoce coincide com o primeiro evento de pareamento cromossômico, consistente com a idéia de que a procura da homologia e o pareamento devem iniciar pelos telômeros. Seria interessante especular que este agrupamento de todos os telômeros permitem uma oportunidade para que pareamentos teloméricos entre cromossomos não homólogos ocorram, os quais poderiam levar a eventos de trocas (ex., translocações) (Lese & Ledbetter, 1998).

Um outro fator a ser observado, é a evidência de polimorfismos nas seqüências teloméricas dentro da população humana (Brown et al., 1990; Wilkie et al., 1991). Wilkie et al (1991) foram os primeiros a descrever três diferentes alelos para o cromossomo 16p com um polimorfismo de comprimento de mais de 260 Kb. Não apenas os três alelos diferiam em comprimento, como um deles tinha uma diferença da seqüência

subtelomérica. Isto fazia com que estes alelos fossem não homólogos entre si, mas homólogos com o cromossomo Xq e outras extremidades cromossômicas.

Teoricamente, esta diferença entre os alelos também aumentaria a possibilidade de que indivíduos heterozigotos para dois alelos teloméricos diferentes (16p) tivessem um risco aumentado, tanto para taxas de não-disjunção para o cromossomo 16, como para translocações desbalanceadas envolvendo estas extremidades cromossômicas (Ledbetter, 1992; Wilkie et al., 1991).

Um importante polimorfismo de 55 Kb também tem sido identificado no cromossomo 2q (Macina et al., 1994). Adicionalmente, um segmento de DNA duplicado contendo duas ilhas CpG presentes no braço longo do cromossomo 2 tem homologia com o braço curto do cromossomo 8. Estes achados sugerem a hipótese de pareamento e translocação entre os cromossomos 2 e 8, ou aumento das taxas de não-disjunção para ambos os cromossomos.

Todos estes aspectos únicos da estrutura dos telômeros e polimorfismos, sugerem que as seqüências teloméricas devem mediar o pareamento cromossômico entre não homólogos e eventos únicos de *crossing over*, o que levaria a um desequilíbrio de dosagem gênica. Investigações continuadas da integridade dos telômeros permitirão uma correlação genótipo-fenótipo, contribuindo para a definição de diagnósticos clínicos.

c) Alterações cromossômicas e síndromes de múltiplas malformações congênitas e retardo mental de etiologia desconhecida

O fenótipo de aberrações cromossômicas autossômicas (ACA) é caracterizado por 4 critérios maiores, em ordem de importância: (1) deficiência mental; (2) um padrão menor de sinais dismórficos; (3) retardo de crescimento e (4) malformações maiores. Para o reconhecimento clínico, o padrão de anomalias menores e, ocasionalmente de malformações muito consistentes, é o mais importante. As malformações congênitas mais freqüentemente encontradas em aberrações cromossômicas autossômicas são relativamente comuns, incluindo defeitos cardíacos, malformações uro-genitais, fendas faciais, pé torto e sindactilias menores (Schinzel, 1988). Malformações que são raramente associadas com ACA estão freqüentemente relacionadas a uma deleção ou duplicação particular. Nestes casos, e especialmente para deleções e para malformações únicas, é possível muitas vezes mapear o gene associado com uma malformação particular.

O retardo mental (RM) de etiologia desconhecida é um motivo freqüente de consultas de aconselhamento genético. Apesar dos recentes avanços no entendimento dos mecanismos moleculares da doença, em pelo menos 50% dos casos a etiologia permanece inexplicável, o que dificulta a estimativa dos riscos de recorrência (Schinzel 1984; Schinzel 1994). Nos casos em que a causa do RM é identificada, cerca de 60% são devidos a distúrbios genéticos. O mapeamento e o delineamento de síndromes de genes contíguos, sugerem que os rearranjos cromossômicos submicroscópicos, em conjunto com outros distúrbios genéticos, contribuem substancialmente na patogênese do retardo mental (Schinzel 1988; Robinson et al., 1993; Schinzel et al., 1997a, 1997b, 1997c).

Considerando uma correlação cariótipo-fenótipo, a deleção de um segmento cromossômico afeta o desenvolvimento normal mais gravemente do que uma duplicação do mesmo segmento. Deleções submicroscópicas ou duplicações cromossômicas envolvendo os telômeros podem ter, proporcionalmente, maiores conseqüências clínicas do que rearranjos cromossômicos similares que não envolvam estas regiões. Das 20 síndromes de genes contíguos caracterizadas até o momento, pelo menos sete síndromes (Wolf-Hirschhorn, Cri-du-Chat, Beckwith-Wiedemann, Miller-Dieker, Rubinstein-Taybi, Hemoglobina H/ α -talassemia e Kallmann) encontram-se mapeadas nas regiões teloméricas.

Lamb et al. (1989) descreveram um dos primeiros casos de translocação críptica ou telomérica em um paciente jovem com α -talassemia, dismorfias e retardo mental. Embora o cariótipo de alta resolução do paciente fosse normal, através de uma combinação de análise de DNA e hibridização *in situ* foi revelado que o paciente era portador de uma translocação telomérica desbalanceada. A importância da identificação das translocações crípticas foi melhor caracterizada pela descoberta de várias translocações envolvidas na síndrome de Miller-Dieker (17p13) (Ledbetter 1992).

Evidências adicionais de que deleções subteloméricas submicroscópicas devem ser muito mais freqüentes do que se reconhece atualmente, foram fornecidas pela observação de autossomos em anel em pacientes com retardo mental e/ou dismorfias (Pezzolo et al., 1993). Os pontos de quebra de deleções subteloméricas simples são tão terminais que na maioria das vezes não são detectadas pelas técnicas de citogenética convencionais, mas um cromossomo em anel não escaparia à detecção. O mecanismo de formação de cromossomos em anel envolve quebras nas extremidades cromossômicas e posterior rearranjo, de maneira que as extremidades livres se unam. Portanto, é plausível

supor que exista ainda um considerável número de alterações não identificadas envolvendo as regiões subteloméricas .

Existem poucas condições importantes tão comuns como o retardo mental cuja patogênese seja tão pouco entendida. Embora o RM afete cerca de 3% da população (Rutter et al., 1970; Birch et al., 1970), o diagnóstico é obtido em apenas um terço dos casos. As causas do RM variam com a gravidade da condição: RM moderado a grave (definido como um QI escore menor do que 50) parece ser muito mais devido a causas patológicas únicas (genéticas ou ambientais) do que o RM leve (definido como um QI escore entre 50 e 70), o qual é freqüentemente de origem multifatorial (Knight et al., 1999).

Doenças genéticas e cromossômicas são encontradas em 30-40% do RM moderado a grave. Influências ambientais explicam cerca de 10-30% e a causa é desconhecida em cerca de 40% dos casos (Drillien et al., 1966; Laxova et al., 1967; McDonald 1973; Gustavson et al., 1977; Elwood & Darragh 1981;). Causas genéticas e ambientais explicam cerca de 30% do RM leve e em 70% dos casos o diagnóstico etiológico permanece desconhecido (Blomquist et al., 1981; Hagberg et al., 1981; Einfeld, 1984; Broman et al., 1987; Lamont & Dennis 1988; Bunday et al., 1989; Lamb et al., 1989).

Existem algumas evidências de que rearranjos cromossômicos pequenos envolvendo as bandas terminais dos cromossomos (regiões subteloméricas) são uma causa importante e não reconhecida do RM. Flint et al. (1995) relataram o primeiro estudo em uma série de pacientes com retardo mental, que apresentavam cariótipo normal. Os pacientes foram investigados para deleções subteloméricas através da análise

de marcadores microsátélites e foram detectados 3 casos com anormalidades envolvendo a região dos telômeros. Dois pacientes apresentavam deleção 22qter, e um dos pacientes deleção 13qter.

Girardeau et al. (1997), em uma série de pacientes com retardo mental investigados primeiramente por polimorfismos hipervariáveis de DNA (HVPs) e posteriormente pela técnica de FISH, relataram um paciente com deleção 1p36.3.

Knight et al (1999), investigaram a prevalência de rearranjos cromossômicos submicroscópicos em 466 crianças com retardo mental de origem desconhecida e dismorfias. Os resultados relatados mostram que 7,45% das crianças com RM moderado a severo e 0,5% das crianças com RM leve são portadoras de aberrações cromossômicas submicroscópicas, não detectadas pelas técnicas de citogenética convencionais. Foi proposto recentemente que a investigação de rearranjos cromossômicos submicroscópicos se estenda ao genoma inteiro, utilizando-se 400 microsátélites em casos em que alterações subteloméricas não foram encontradas. Rosenberg et al (2000) relataram 2 alterações encontradas em uma série de 11 crianças polimalformadas.

Os resultados obtidos com este tipo de *screening* concordam a hipótese de que rearranjos cromossômicos afetam mais freqüentemente as regiões subteloméricas do que outras partes do genoma, e que apresentam uma incidência significativa nos casos de retardo mental de origem desconhecida. Desde que várias translocações e rearranjos teloméricos não são detectados pelos métodos citogenéticos convencionais, o aprimoramento de testes moleculares com sondas de DNA específicas para estas regiões se faz necessário.

d) A utilização de métodos citogenéticos em diagnósticos clínicos

Desde a descrição, em 1956, das preparações citogenéticas utilizando-se pré-tratamentos hipotônicos, as técnicas utilizadas em citogenética têm permitido acurácia e precisão crescente da capacidade de investigação cromossômica. Este progresso tem levado a detecção de um número quase ilimitado de alterações cromossômicas em humanos.

Até 1970, através de colorações utilizadas em citogenética convencional, cerca de 20 alterações cromossômicas podiam ser determinadas. A introdução de técnicas de bandeamento G (Scheres et al., 1972) permitiu a detecção de um número cada vez maior de alterações cromossômicas, e as técnicas para obtenção de cromossomos mais longos (prometáfase) aumentaram ainda consideravelmente a capacidade de detecção dessas alterações.

Durante este período, apenas um pequeno número de microdeleções específicas (síndrome de genes contíguos) foram detectadas em pacientes com um fenótipo clínico bem definido. Como na maioria dos pacientes afetados com estas síndromes as microdeleções não podiam ser detectadas, vários pesquisadores centraram seus trabalhos no desenvolvimento de técnicas de citogenética molecular para investigar alterações cromossômicas específicas (ex., RFLP, análise de microsátélites, FISH). Exemplos de síndromes candidatas para investigações de microdeleções incluíram a síndrome de Miller-Dieker e Lisencefalia tipo I (17p13), síndromes de Prader-Willi e Angelman (15q11.2-q12), síndrome de Williams (7q11), síndrome de DiGeorge (22q11.22) e para microduplicações, a doença de Carchot-Marie-Tooth tipo I (17p11.2) (Kuwano et al., 1991; Driscoll et al., 1992; Breuning et al. 1993; Dobyns et al., 1993; Lüdecke et al., 1995).

Com a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) , passa-se agora a capacidade de determinar não apenas as microdeleções, mas a origem de qualquer duplicação, tanto na forma de segmentos cromossômicos, quanto na forma de cromossomos extras ou anéis cromossômicos.

FISH é um procedimento citoquímico o qual permite visualizar e detectar a morfologia de sequências de ácidos nucleicos específicos em células metafásicas e interfásicas (Pinkel et al., 1986; Lichter et al., 1988). A técnica é baseada na formação híbrida entre sequências ou regiões específicas presente nas células ou cromossomos de preparações citológicas , e sondas marcadas de DNA ou RNA. O híbrido formado pode ser detectado diretamente ao microscópio, ou após uma detecção imunocitoquímica com fluorocromos de anticorpos específicos (Pinkel et al., 1986).

A sensibilidade da técnica de FISH, ou seja, a visualização do sinal que indica que houve hibridização ou não, é basicamente determinada pelo tamanho da área alvo delineada pela sonda. Sequências menores que 1 Kb podem ser detectadas (Wiegant et al., 1991) e os quatro grupos de sondas de DNA disponíveis para FISH são: sequências de DNA repetitivas, bibliotecas de DNA (WCP), cópia única ou locus específicas e mais recentemente sondas subteloméricas.

As sondas de sequências repetitivas são adjacentes aos centrômeros dos cromossomos humanos e são úteis no diagnóstico de aneuploidias importantes (Kuo et al., 1991; Callen et al., 1992; Bischoff et al., 1994; Daniel et al., 1994) e na determinação do número de cópias de um cromossomo específico ou identificação da origem de cromossomos marcadores. Entretanto, com exceção da identificação de cromossomos dicêntricos, as sondas centroméricas não são úteis na identificação de anormalidades

cromossômicas estruturais. Para este propósito, foram desenvolvidas técnicas de *in situ* *suppression hybridization* (ISSH) e *whole chromosome painting* (WCPs), que utilizam clones com sequências homólogas ao longo de todo o cromossomo (Lichter et al., 1988).

A maioria das sondas disponíveis são originadas de clones de bibliotecas de DNA (Pinkel et al., 1988; Telenius et al., 1992), ou de ampliações de sequências de híbridos humanos-roedores por PCR (Lengauer et al., 1990; Lichter et al., 1990) e, são freqüentemente utilizadas na caracterização de translocações. FISH Multicolor com sondas de bibliotecas de DNA permitem a detecção de mais de um rearranjo cromossômico na mesma célula metafásica ou interfásica. Neste método a hibridização é feita com várias sondas marcadas com diferentes fluorocromos. Entretanto, o potencial da maioria das sondas WCPs é limitado. Para muitas aplicações citogenéticas, como a caracterização de rearranjos cromossômicos complexos ou *de novo* ou para a determinação de pontos de quebra cromossômicos, as sondas de cópia única podem ser mais informativas.

Sondas locus específicas ou de cópia única identificam pequenas regiões do genoma e aumentam a probabilidade de detecção e análise de pontos de quebra específicos (Jones et al., 1994; Flint et al., 1995). Estas sondas são essenciais para a determinação de várias síndromes de microdeleções e genes contíguos (Altherr et al., 1991; Kuwano et al., 1991; Driscoll et al., 1992; Breuning et al., 1993; Ewart et al., 1993; Ligon et al., 1997), translocações crípticas e inversões (Ledbetter, 1992; Fukushima et al., 1993) e translocações e inversões em doenças hematológicas (Tkachuck et al., 1990; Dauwerse et al., 1993). Entretanto, o número de sondas disponíveis para uma série de doenças ainda é muito limitado e cobre apenas uma pequena parte das regiões específicas do genoma humano.

Recentemente foram desenvolvidas um número de sondas subteloméricas que cobrem as extremidades de cada um dos cromossomos humanos, com exceção do braço curto dos cromossomos acrocêntricos, os quais não contém genes codificantes (Flint et al., 1995; NIH 1996; Kingsley et al., 1997). Knight et al. (1997) desenvolveram uma técnica que permite a análise simultânea de regiões subteloméricas de todos os cromossomos e a identificação de deleções, triplicações e rearranjos cromossômicos envolvendo esta regiões. Apesar do ainda pequeno número de publicações descrevendo rearranjos subteloméricos e utilização de sondas subteloméricas (Flint et al., 1995; Giraudeau et al., 1997; Knight et al., 1999) , está clara a capacidade de detecção de aberrações cromossômicas por este método.

Além da capacidade de detecção de rearranjos cromossômicos submicroscópicos em crianças com retardo mental e dismorfias, o aumento da sensibilidade de detecção de translocações teloméricas terá uma importante implicação na genética de câncer. Várias translocações observadas de forma consistente e não casual em leucemias, tais como 12p;21q em leucemia linfoblástica aguda, são difíceis de serem detectadas através dos métodos de citogenética convencionais (Romana et al., 1995). Nestes casos, a utilização de FISH com sondas subteloméricas, permite a definição do diagnóstico.

A técnica de FISH também tem sido utilizada como um método rápido de rastreamento para alterações cromossômicas numéricas e estruturais específicas em células interfásicas, principalmente em casos de diagnóstico pré-natal (Eiben et al., 1998; Eiben et al., 1999).

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Identificar alterações cromossômicas subteloméricas em uma amostra de pacientes com malformações congênitas múltiplas e retardo mental de etiologia desconhecida.

Objetivos específicos:

- (1) Identificar alterações cromossômicas que envolvem a região dos telômeros
- (2) Determinar a frequência de alterações cromossômicas que envolvem a região dos telômeros em uma amostra de pacientes com malformações múltiplas e retardo mental de etiologia desconhecida.
- (3) Investigar a contribuição de alterações cromossômicas envolvendo a região dos telômeros para síndromes de malformações congênitas múltiplas e retardo mental de etiologia desconhecida.
- (4) Caracterizar do ponto de vista molecular as regiões envolvidas em alterações cromossômicas subteloméricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altherr MR, Bengtsson U, Elder FF, Ledbetter DH, Wasmuth JJ, McDonald ME, Gusella JF, Greenberg F. (1991): Molecular confirmation of Wolf-Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4. *Am J Hum Genet*, 49:1235-1242.

Bass HW, Marshall WF, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ. (1997): Telomeres cluster de novo before the initiation of synapses: A three dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *Cell Biol*, 137: 5-18.

Bickmore WA & Bird AP. (1992): Use of restriction endonucleases to detect and isolate genes from mammalian cells. *Methods Enzymol*, 216:224-244.

Birch HG, Richardson SA, Baird D, Horobin G, Ilesley R. (1970): Mental subnormality in the community: a clinical and epidemiological study. Baltimore: Williams and Wilkins.

Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ, Shaffer LG. (1994): Estimates of aneuploidy using multicolour fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet*, 66(4): 237-243.

Blackburn EH. (1990): Telomeres: structure and synthesis. *J Bio Chem*, 265(11): 5919-5921.

Blomquist HK, Gustavson KH, Holmgren G. (1981): Mild mental retardation in children in a northern Swedish county. *J Mental Defic Res*, 17: 169-186.

Blouin JL, Christie DH, Gos A, Lynn A, Morris MA, Ledbetter DH, Chakravarti A, Antonarakis SE. (1995): A new dinucleotide repeats polymorphism at the telomere of chromosome 21q reveals a significant difference between male and female rates of recombination. *Am J Human Genet*, 57: 388-394.

Breuning MH, Dauwerse HG, Fugazza G, Saris JJ, Spruit L, Wijnen H, Tommerup N, van der Hagen CB, Imaizumi K, Kuroki Y. (1993): Rubinstein-Taybi syndrome caused by submicroscopic deletions within 16p13.3. *Am J Hum Genet*, 52:249-254.

Brock-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar MM, Nellist M, Gamble V, Harris PC, Sampson JR. (1994): Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease – a contiguous gene syndrome. *Nature Genetics*, 8:328-332.

Broman S, Nichols PL, Shaughnessy P, Kennedy W. (1987): Retardation in young children. A developmental study of cognitive deficit. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum.

Brown WR, Dobson MJ, MacKinnon P. (1990): Telomere cloning and mammalian chromosome analysis. *J Cell Sci*, 95(4): 521-526.

Bunday S, Thake A, Todd J. (1989): The recurrence risks for mild idiopathic mental retardation. *J Med Genet*, 26: 260-266.

Caccia N, Johnson JM, Robinson GE, Barna T. (1991): Impact of prenatal testing on maternal-fetal bonding: chorionic villus sampling versus amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol*, 165:1122-1125.

Callen DF, Eyre H, Yip MY, Freemantle J, Haan EA. (1992): Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am J Med Genet*, 43(4): 709-715.

Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM. (1992): Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet*, 29(5): 299-307.

Chevillard C, Le Paslier D, Passage E, Ougen P, Billault A, Boyer S, Mazan S, Bachelier JP, Vignal A, Cohen D. (1993): Relationship between Charcot-Marie-Tooth 1A and Smith-Magenis regions, snU3 may be a candidate gene for the Smith-Magenis syndrome. *Hum Mol Genet*, 2(8): 1235-1243.

Counter CM. (1996): The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutation Res* 366:45-63.

Craig JM & Bickmore WA. (1994): The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nature Genet*, 7:376-382.

Cremer T, Landegent J, Bruckner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Deville P, Pearson P, van der Ploeg M. (1986): Detection of chromosome aberrations in the human

interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet*, 74(4): 346-352.

Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. (1988): Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumour cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet*, 80(3): 235-246.

Daniel A, Malafiej P, Preece K, Chia N, Nelson J, Smith M. (1994): Identification of marker chromosomes in thirteen patients using FISH probing. *Am J Med Genet*, 53(1): 8-18.

Dauwerse JG, Wessels JW, Giles RH, Wiegant J, van der Reijden BA, Fugazza G, Jumelet EA, Smit E, Baas F, Raap AK, Hagemeyer A, Beverstock GC, van Ommen GJB, Breuning MH. (1993): Cloning the breakpoint cluster region of the inv(16) in acute nonlymphocytic leukemia M4 Eo. *Hum Mol Genet*, 2(10): 1527-1534.

Deville P, Thierry RF, Kievits T, Kolluri R, Hopman AH, Willard HF, Pearson PL, Cornelisse CJ. (1988): Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DNA probes. *Cancer Res*, 48(20): 5825-5830.

Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES. (1987): A genetic linkage map of the human genome. *Cell*, 51(2): 319-337.

Dobyns WB, Reiner O, Carozzo R, Ledbetter DH. (1993): Lissencephaly: a human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA*, 270:2838-2842.

Drillien CM, Jamenson S, Wilkinson EM. (1966): Studies in mental handicap. Part I: prevalence and distribution by clinical and severity of defects. *Arch Dis Childhood*, 41: 528-538.

Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. (1992): A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet*, 50(5): 924-933.

Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen J. (1998): A prospective comparative study on FISH of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat Diag*, 18:901-906.

Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen J. (1999): Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by FISH. *Fetal Diagn and Ther*, 14:193-197.

Einfeld SL. (1984): Clinical assessment of 4500 developmentally delayed individuals. *J Mental Defic Res*, 28: 129-142.

Elwood JH, Darragh PM. (1981): Severe mental handicap in Northern Ireland. *Mental Defic Res*, 25: 147-155.

Estabrooks LL, Lamb AN, Aylsworth AS, Callanan NP, Rao KW. (1994): Molecular characterisation of chromosome 4p deletions resulting in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Med Genet*, 31(2): 103-107.

Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. (1993): Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet*, 5(1): 11-16.

Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE (1995). The detection of subtelomeric domains. *Hum Mol Genet*, 6(8): 1305-1313.

Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ. (1997a) : Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet*, 6(8):1305-1313.

Flint J, Thomas K, Micklem G, Raynham H, Clark K, Doggett NA, King A, Higgs DR. (1997b): The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat Genet* , 15(3):252-257.

Fukushima Y, Hoovers J, Mannens M, Wakui K, Ohashi H, Ohmo T, Ueoka Y, Niikawa N. (1993): Detection of a cryptic paracentric inversion within band 11p13 in familial aneuridia by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*, 91(3): 205-209.

Ghaffari SR, Boyd E, JL Tolmiel, Yalnick JC, Trainer AH, Connor JM. (1998): A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet* , 35:225 – 233.

- Girardeau F, Aubert D, Young I, Horsley S, Knight S, Kearney L, Vergnaud G, Flint J. (1997): Molecular-cytogenetic detection of a deletion of 1p36.3. *J Med Genet*, 34:314-317.
- Griffin DK, Sanoudou D, Adamski E, McGiffert C, O'Brien P, Wienberg J, Ferguson-Smith MA (1998): Chromosome specific comparative genome hybridization for determining the origin of intrachromosomal duplications. *J Med Genet*, 35(1):37-41.
- Gustavson K-H, Hagberh B, Hagberg G, Sars K. (1977): Severe mental retardation in a Swedish county. II. Etiologic and pathogenic aspects of children born 1959-1970. *Neuropadiatrie*, 8: 293-304.
- Hagberg B, Hagberg G, Lewerth A, Lindberg U. (1981): Mild mental retardation in Swedish school children - II. Etiologic and pathogenetic aspects. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 70: 445-452.
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990): Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, 346:866-868.
- Hing AV, Helms C, Donis-Keller H. (1993): VNTR and microsatellite polymorphisms within the subtelomeric region of 7q. *Am J Hum Genet*, 53(2):509-517.
- Holmquist GP. (1992): Chromosome bands, their chromatin flavours, and their functional features. *Am J Hum Genet*, 51(1):17-37.
- Holt SE, Shay JW, Wright WE. (1996) : Refining the telomere-telomerase hypothesis of ageing and cancer. *Nature Biotechnology*, 14:836-839.

Horsley SW, Knight SJ, Nixon, Huson S, Fitchett M, Boone RA, Hilton-Jones D, Flint J, Kearney L. (1998): Del(18p) shown to be a cryptic translocation using a multiprobe FISH assay for subtelomeric chromosome rearrangements. *J Med Genet*, 35(9):722-726.

Houldsworth J & Chaganti RS (1994): Comparative genomic hybridization: an review. *Am. J Pathol*, 145(6):1253-60.

Ijdo JW, Lindsay EA, Wells RA, Baldini A. (1992): Multiple variants in subtelomeric regions of normal karyotypes. *Genomics* 14:1019-1025.

Jones C, Slijepcevic P, Marsh S, Baker E, Langdon WY, Richards RI, Tunnacliffe A. (1994): Physical linkage of the fragile site FRA11B and a Jacobsen syndrome chromosome deletion breakpoint in 11q23.3. *Hum Mol Genet*, 3(12):2123-2130.

Knight S, Horsley S, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DLN, Flint J, Kearney L. (1997): Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet*, 5:1-8.

Knight S, Regan R, Horsley S, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. (1999): Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*, 354(91): 1676-81.

Kuo WL, Tenjin H, Segraves R, Pinkel D, Golbus MS, Gray J. (1991): Detection of aneuploidy involving chromosomes 13,18, or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet*, 49(1):112-119.

Kuwano A, Ledbetter AS, Dobyns WB, Emanuel BS, Ledbetter DH. (1991): Detection of deletions and cryptic translocation in Miller-Dieker syndrome by in situ hybridization. *Am J Hum Genet*, 49(4):707-714.

Lahn BT, Ma N, Breg WR, Stratton R, Surti U, Page DC. (1994): Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nature Biotechnology*, 14: 836-839.

Lamb J, Harris PC, Lindenbaum RH, Reeders ST, Wilkie AOM, Buckle VJ, Barton NJ. (1989) : Detection of breakpoints in submicroscopic chromosomal translocation, illustrating an important mechanism for genetic disease. *Lancet*, 2:819-824.

Lamont MA & Dennis NR. (1988): Aetiology of mild mental retardation. *Arch Dis Childhood*, 63: 1032-1038.

Landsdorp PM, Verwoerd NP, Van de Rijke FM, Dragowska V, Little M-T, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. (1996): Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5:685-691.

Lapierre JM, Cacheux V, da Silva F, Collot N, Hervy N, Viss J, Tachdjian G. (1998): Comparative genomic hybridization: technical development and cytogenetics aspects for routine use in clinical laboratories. *Ann Genet*, 41(1):56-62.

Laxova R, Ridler MAC, Bowen-Bravery M. (1967): An etiological survey of the severely retarded Hertfordshire children who were born between January 1, 1965 and December 31, 1967. *Am J Med Genet*, 1: 75-86.

Ledbetter DH. (1992): Cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet*, 51:451-456.

Lengauer C, Riethman H, Cremer T. (1990): Painting of human chromosomes with probes generated from hybrid cell lines by PCR with Alu and L1 primers. *Hum Genet*, 86(1):1-6.

Lese CM & Ledbetter DH. (1998): The means to an end: exploring human telomeres. *J. Assoc Genet Techn*, 24(5): 165- 170.

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. (1988): Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet*, 80(3):224-234.

Lichter P, Ledbetter SA, Ledbetter DH, Ward DC. (1990): Fluorescence in situ hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6634-6638.

Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC. (1991): Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. *Anal Tech Appl*,8(19):24-25.

Ligon AH, Beaudet AL, Shaffer LG. (1997): Simultaneous, Multilocus FISH Analysis for Detection of Microdeletions in the Diagnostic Evaluation of Development Delay and Mental Retardation. *Am J Hum Genet*, 61:51-59.

Lüdecke HJ, Wagner MJ, Nardmann J, La Pillo B, Parrish JE, Willems PJ, Haan EA, Frydman M, Hamers GJH, Wells DE, Horsthemke B. (1995): Molecular dissection of a

contiguous gene syndrome: localization of the genes involved in the Langer-Giedion syndrome. *Hum Mol Genet*, 4(1):31-36.

Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzeta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA. (1991): DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1a. *Cell*, 66(2):219-232.

Macina RA, Negorev DG, Spais C, Ruthig LA, Hu XL, Riethman HC. (1994): Sequence organization of the human chromosome 2q telomere. *Hum Mol Genet*, 3; 1847-1853.

McDonald AD. (1973): Severely retarded children in Quebec: prevalence, causes and care. *Am J Mental Defic*, 79: 205-215.

Melody C. (1996): *In Situ Hybridization. Laboratory Companion*. Chapman & Hall. Germany.

Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. (1989): Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(18): 7049-7053.

Moorhead PS, Nowel PC, Mellmann WJ, Battips DM, Hungerford DA. (1960): Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res*, 20:616.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. (1988): A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 6622-6626.

National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration. (1996): A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nature Genetics* 6(14):86-89.

Ohashi H, Ishikiryama S, Fukushima Y. (1993). New diagnostic method for Pallister-Killian syndrome: detection of *i*(12p) in interphase nuclei of buccal mucosa by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet*,45(91):123-128.

Ohashi H, Wakui K, Ogawa K, Okano T, Niikawa N, Fukushima Y. (1994): A stable acentric marker chromosome: possible existence of an intercalary ancient centromere at distal 8p. *Am J Hum Genet*, 55(6):1202-1208.

Pezzolo A, Gimelli G, Cohen A, Lavaggetto A, Romano C, Fogu G, Zuffardi O. (1993): Presence of telomeric and subtelomeric sequences at the fusion points of ring chromosomes indicates that the ring syndrome is caused by ring instability. *Hum Genet* 92:23-27.

Pinkel D, Straume T, Gray J. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad*, 83:2934-2938.

Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. (1988): Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(23):9138-9142.

Robinson WP, Bernasconi F, Mutirangura A, Ledbetter DH, Langlois S, Malcolm S, Morris MA, Schinzel AA. (1993): Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *Am J Hum Genet*, 53(3):740-751.

Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Maciintyre EA, Berger R, Bernard OA. (1995): High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 86(11): 4263-4269.

Rosenberg M, Hui L, Ma J, Nusbaum HC, Clark K, Robinson L, Dziadzio L, Swain PM, Keith T, Hudson TJ, Biesecker LG, Flint J. (1997): Characterisation of short tandem repeats from thirty-one human telomeres. *Genome Res.*, 7(9):917-923.

Rosenberg MJ, Vaske D, Killoran CE, Ning Y, Wargowski D, Hudgins L, Tiffit CJ, Meck J, Blancato JK, Rosenbaum K, Pauli RM, Weber J, Biesecker LG. (2000): Detection of chromosomal aberrations by a whole-genome microsatellite screen. *Am J Hum Genet* 66:419-427.

Rouyer F, Simmler M-C, Page DC, Weissenbach J. (1987): A sex chromosome rearrangement in a human XX male caused by Alu-Alu recombination. *Cell*, 51:417-425.

Rouyer F, de la Chapelle A, Andersson M, Weissenbach J. (1990): An interspersed repeated sequence specific for human subtelomeric regions. *EMBO J*, 9(2): 505-514.

Rutter M, Tizard J, Whitmore K. (1970): *Education, Health and Behaviour*. London: Longman.

Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G. (1992): The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosome pairing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:4913-4917.

Scheres JMJC. (1972): Human chromosome banding. *Lancet* I:172-174.

Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M. (1996): Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *Cell Biol*, 134: 1109-1125.

Schinzel A. (1984): Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man, 1st ed., de Gruyter, Berlin, New York.

Schinzel A. (1988): Microdeletion syndromes, balanced translocations, and gene mapping. *J Med Genet*, 25(7):454-462.

Schinzel A. (1994): Human Cytogenetics database. Oxford medical databases Series. Oxford University Press. Electronic Publishing. Oxford.

Schinzel A, Braegger CP, Brecevic L, Dutly F, Baumer A, Binkert F. (1997a): Interstitial deletion, del(4)(q12q21.1), owing to de novo unbalanced translocation in a 2 year old girls: further evidence that the piebald trait maps to proximal 4q12. *J Med Genet*, 34(8):692-695.

Schinzel A, Kotzot D, Brecevic L, Robinson WP, Dutly F, Dauwerse H, Binkert F, Baumer A, Ausserer B. (1997b): Trisomy first, translocation second, uniparental disomy and partial trisomy third: a new mechanism for complex chromosomal aneuploidy. *Eur J Hum Genet*, 5(5):308-314.

Schinzel A, Brecevic L, Dutly F, Baumer A, Binkert F, Largo RH. (1997c): Multiple congenital anomalies including the Rieger eye malformation in a boy with interstitial deletion of (4)(q25-q27) secondary to a balanced insertion in his normal father:evidence for haplotype insufficiency causing the Rieger malformation. *J Med Genet*, 34(12):1012-1014.

Speicher MR, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve-Grez H, Schhoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T. (1993): Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet*, 2(11):1907-1914.

Telenius H, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA; Nordenskjold M, Pfragner R, Ponder BA. (1992): Cytogenetics analysis by chromosome painting using DP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*, 4:257-263.

Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Clearly ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D. (1990): Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogeneous leukemia by in situ hybridization. *Science*, 250: 559-562.

Trask BJ. (1991): Fluorescence *in situ* hybridization:applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet*, 7(5):149-154.

Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW. (1993): Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by

fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet*, 52(5):854-865.

Weil D, Wang I, Dietrich A, Poustka A, Weissenbach J, Petit C. (1994): Highly homologous loci on the X and Y chromosomes are hot-spots for ectopic recombination's leading to XX maleness. *Nat Genet*, 7: 414-419.

Wiegant J, Galiart NJ, Raap AK, d'Azzo A. (1991): The gene encoding human protective protein (PPGB) is on chromosome 20. *Genomics* 10(2):345-349.

Wilkie AO, Higgs DR, Rack KA, Buckle VJ, Spurr NK, Fischel-Ghodsian N, Ceccherini I, Brown WR, Harris PC. (1991): Stable length polymorphism of up 260 Kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell*, 64(3): 595-606.

Wintle RF, Niggard TG, Herbrick JA, Kvaloy K, Cox DW. (1997): Genetic polymorphism and recombination in the subtelomeric region of chromosome 14q. *Genomics*, 40(3): 409-414.

Wong AC, Ning Y, Flint J, Clark K, Dumanski JP, Ledbetter DH, McDermid HE. (1997): Molecular characterization of a 130-Kb terminal microdeletion at 22q in a child with mild mental retardation. *Am J Hum Genet*, 60(1): 113-120.

Artigo 1. "Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformation syndromes".

Publicado na American Journal of Medical Genetics 82:249-253, 1999.

Terminal Deletion, del(1)(p36.3), Detected Through Screening for Terminal Deletions in Patients With Unclassified Malformation Syndromes

Mariluce Riegel,¹ Claudio Castellan,² Damina Balmer,¹ Lukrecija Brecevic,¹ and Albert Schinzel^{1,2*}

¹Institute of Medical Genetics, University of Zurich, Switzerland

²Genetic Counseling Service, Bozen, Italy

We report on a 4 year-old girl with a 1p36.3-pter deletion. Clinical findings included minor anomalies of face and distal limbs, patent ductus arteriosus, the Ebstein heart anomaly, and brain atrophy with seizures. Conventional GTG-banded chromosome analysis revealed a normal (46,XX) result. Subsequent analysis by fluorescent in situ hybridization (FISH) using distal probes demonstrated a deletion of 1p36.6-pter. Molecular investigations with microsatellite markers showed hemizygoty at three loci at 1p36.3 with loss of the paternal allele. The deletion of 1p36.3 is difficult to identify by banding alone; indeed, our patient represents the third reported case with a del(1)(p36.3) that was detected only after more detailed analysis. In all three cases the deletion was detected through screening of patients with multiple congenital anomalies/mental retardation syndromes suggestive of autosomal chromosome aberrations for subtelomeric submicroscopic deletions by means of FISH or microsatellite marker analysis. On the basis of these observations we highly recommend that FISH with a subtelomeric 1p probe be routinely performed in patients with similar facial phenotype, severe mental retardation and seizures, and a heart malformation, particularly the Ebstein anomaly. *Am. J. Med. Genet.* 82:249-253, 1999. © 1999 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: chromosome deletion 1p; fluorescent in situ hybridization (FISH); submicroscopic deletion

INTRODUCTION

Terminal deletion of 1p, especially of the segment 1p36.3-1pter, is difficult to detect from banded karyotypes. The first reports of 1p36 deletion, where no sub-band determination was performed, concerned patients in whom the aberrations were detected because of an unbalanced translocation [Gray et al., 1972; Hain et al., 1980; Steele et al., 1984; Yunis et al., 1981], mostly with acrocentrics leading to a chromosome complement with 45 chromosomes. Further cases involving breakpoints at 1p36.3 were detected through a more complex rearrangement [Reish et al., 1995] or through satellites on 1p [Blennow et al., 1996]. A recent study reported 14 cases of deletion of 1p36.6-1pter who were detected through prometaphase or metaphase chromosome examination [Shapira et al., 1997]. On the other hand, two further such aberrations were detected only through molecular marker screening for distal deletions in a series of patients with multiple congenital anomalies/mental retardation (MCA/MR) syndromes [Giraudeau et al., 1997; Kearney et al., 1998]. We report a similar observation, a terminal deletion of 1p detected through screening metaphases of patients with unclassified MCA/MR syndromes and normal results of banded chromosome examinations.

CLINICAL REPORT

The proposita, a 4 year-old girl, was the product of the fourth pregnancy of a 38 year-old healthy mother and her 37 year-old partner. The pedigree is unremarkable, consanguinity is unlikely. The durations of pregnancies and sexes and birth weights of the products of the other pregnancies were as follows: first 42 weeks, female, 2,700 g; second 41 3/7 weeks, male, 3,000 g; fifth term, male, 3,500 g. The third pregnancy terminated in a spontaneous abortion. The pregnancy with the proposita was marked by respiratory tract infections at weeks 3, 6, and 8. Fetal movements were noted from about 16 weeks onward and characterized as vivid. The mother worked as a housewife during gestation. No prenatal chromosome examination (for advanced maternal age) was carried out. Spontaneous

Contract grant sponsor: Swiss National Foundation; Contract grant number: 32-45604.95.

*Correspondence to: A. Schinzel, Institut für Medizinische Genetik, Universität Zürich, Rämistrasse 74, CH-8001 Zürich, Switzerland.

Received 26 May 1998; Accepted 7 October 1998

vertex delivery occurred at 41 weeks. The placenta was described as normal as was the amniotic fluid.

Birthweight was 2,650 g (-3 SD), and length was 48 cm (10th–25th centile). Muscular hypotonia and delayed motor and mental development were noted from the beginning. The first grand mal seizure was observed at age 2 months, and antiepileptic treatment was initiated after repeated seizures; thereafter, no grand mal seizures occurred under therapy; however, petit mal epilepsy continued to occur at frequent intervals. Cardiac examination disclosed Ebstein anomaly and patent ductus arteriosus (PDA), and cardiac surgery for the latter was performed at age 2 weeks.

At age 3 years 9 months, the following measurements were obtained: weight 15 kg (10th–25th centile), length 98 cm (10th centile), head circumference 47 cm (-2.1 SD), total hand length 10 cm (-2.3 SD), middle finger length 4.0 cm (-2.8 SD), total foot length 13.0 cm (-2.4 SD), ear length 4.8 cm; inner (2.7 cm) and outer (7.5cm) canthal distance were within percentiles.

At examination at age 4 years 1 month (Fig. 1a, b), the following findings were observed. The skull was brachycephalic, reminiscent of a “breech skull” although delivery was not from a breech position. Further abnormal findings: asymmetric face, prominent

forehead with high frontal hairline, synophrys, downward slanting palpebral fissures, inner epicanthic folds, broad and short nose with upturned nares; long and flat philtrum, narrow vermilion of the lips, small mouth with downturned corners, prominent lateral palatine ridges, right ear larger than the left and posteriorly rotated, neither ear misshapen; asymmetry of the thorax with the left side smaller than the right, scar from cardiovascular surgery, distinct thoracic kyphosis due to muscular hypotonia, normal female genitalia; small hands with transient transverse palmar crease on the right side, camptodactyly of both fifth fingers with shortness of the middle phalanx and only one flexion crease on the right side; small feet with short metatarsals of the second toes with broad terminal phalanges and nails. The proposita had no speech and was fully dependent on diapers.

Complementary Investigations

Magnetic resonance imaging of the brain disclosed brain atrophy with enlarged ventricles and subarachnoidal spaces, but no other abnormalities. Radiographs of lumbar and sacral vertebral column and pelvis were normal. Hand films revealed normal bones but severe

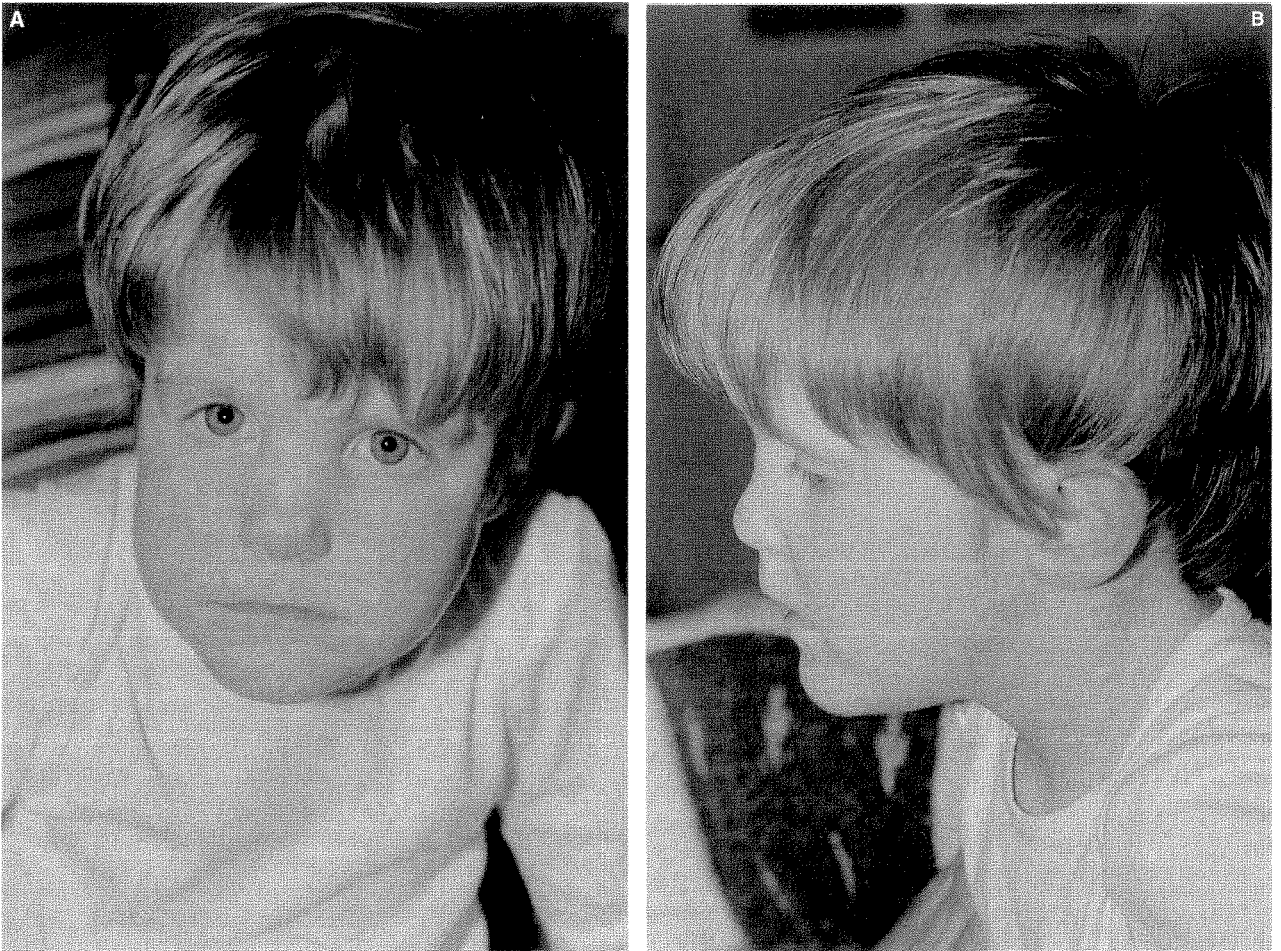


Fig. 1. Head of the proposita at age 4 years (a, b). Note prominent forehead, synophrys, epicanthic folds, flat, broad and short nose, and downturned corners of the mouth.

delay in carpal (9 months) and phalangeal (12 months) bone ages at a chronological age of 24 months.

METHODS AND RESULTS

Cytogenetic and FISH Investigations

A GTG-banded lymphocyte chromosome examination (performed at another laboratory) at a 400–600 band level, indicated no numerical or structural aberration. This result was confirmed by us from the inspection of three metaphases.

Since the *proposita* had a pattern of findings common to autosomal chromosome aberrations, particularly the combination of microcephaly, seizures, severe mental retardation, heart defect, and minor anomalies of facies and distal limbs, it was decided to include her in a fluorescent in situ hybridization (FISH) study aimed at the detection of submicroscopic structural chromosome aberrations. The screening was carried out using telomeric and subtelomeric probes from all autosomal telomeres except for the short arms of acrocentrics, thus a total of 41 probes. The cosmids, P1 and PAC telomere-specific clones, were obtained from MRC (Medical Research Council, Oxford, UK) and ATTC (Rockville, Md.). Purified DNA from clones was labeled with either biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim, Germany) or digoxigenin-11-dUTP (Boehringer, Mannheim) by nick

translation. The Oncor probes were applied according to standard protocols (Oncor® Inc., Gaithersburg, Md.). FITC avidin and rhodamine antidigoxigenin were used to detect biotin and digoxigenin labeled probes, respectively. Analysis was performed using a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope, and images were recorded by Photometrics CCD KAF1400 camera (Photometrics, Tucson, Ariz.), controlled with Smart Capture imaging software (Vysis, Inc., Downers Grove, Ill.).

Metaphase FISH examination with the midisatellite probe D1Z2, which maps to 1p36 (Oncor), disclosed only one signal on one of the two chromosomes 1 (Fig. 2). The finding was confirmed also in interphases, where only one signal could be detected. Metaphase FISH examinations were not possible in the parents due to poor conditions of the samples.

Unfortunately, it was not possible to obtain a second blood sample either from the *proposita* or from her parents. Thus, the investigation of a possible unbalanced translocation, familial or *de novo*, leading to a duplication-deletion was carried out by examining all telomeres and subtelomeric regions for a signal from another telomere on 1p. FISH probes from subtelomeric regions of all other chromosome arms (except for the short arms of acrocentrics) revealed two signals on the two homologous chromosomes at the appropriate positions. Hybridization with the "All Human Telomeres"

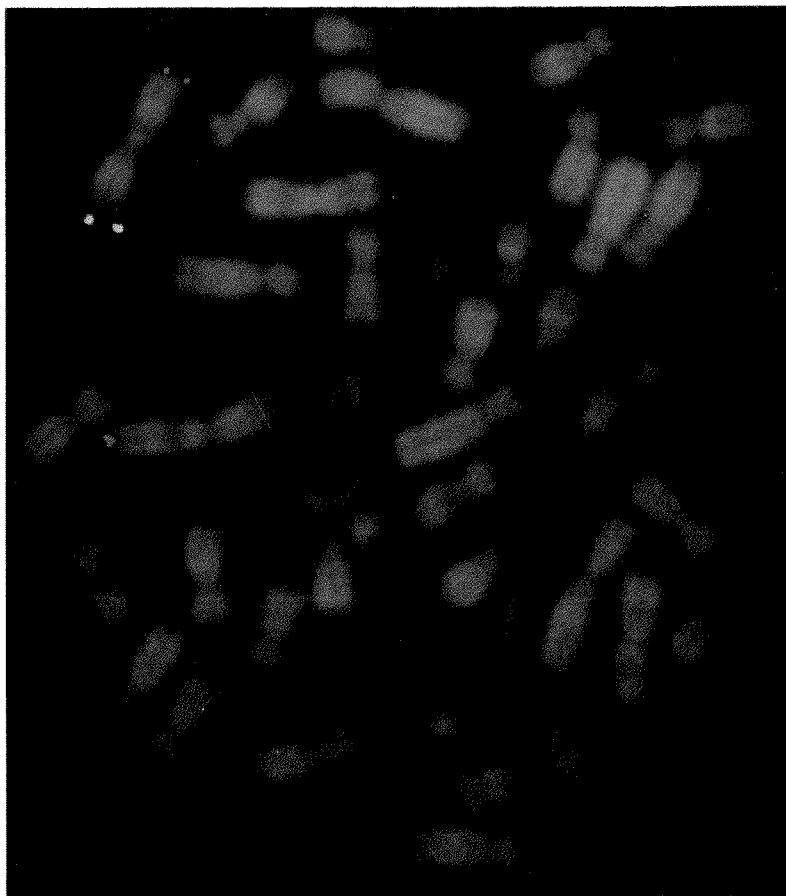


Fig. 2. FISH with the midisatellite probe D1Z2 mapping to 1p36.3 (Oncor) and probe Tel1q mapping to 1q44-qter (Oncor) of a metaphase of the *proposita*. Both homologues show the 1qter signal (red) while the 1p36.3 signal (green) is present on only one (the undeleted) homologue.

probe (Oncor) disclosed signals on the telomeres of both homologues of all chromosomes including signals on both ends of the chromosomes 1 in the proposita. Thus, we concluded that a de novo deletion had presumably occurred in the proposita and was responsible for her abnormal phenotype.

Owing to the abnormal FISH result, we reexamined three GTG-banded metaphases and were still unable to detect the 1p deletion. Further spreads were prepared from cells stored in fixative, and the chromosomes 1 were checked blindly from six banded metaphases, with an equal number of controls. The investigator correctly distinguished between case and control chromosomes in all but one instance: he correctly identified 5/6 partial karyotypes of the patient and 6/6 from controls and missed the deletion in 1/6 karyotypes from the patient. However, this was done with the knowledge of a deletion in distal 1p, and it is far from clear that the deletion would have been picked up without specific attention to this chromosome arm.

Molecular Investigations

DNA samples from the proposita and both of her parents were investigated with microsatellite markers mapping to 1pter-1p36.

Methods. Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells by standard methods. Microsatellite markers mapping to the deletion region were tested. All primers were obtained from Research Genetics. Between 200 and 500 ng of DNA was amplified in a total volume of 25 μ l. Polymerase chain reaction was performed with 35 cycles of 30 sec at 94°C, 45 sec at 55 to 60°C for primer annealing, and 1 min 20 sec at 72°C for the extension. The reaction product was mixed with an equal volume of urea loading buffer (42% urea, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromphenol blue, 0.1% 0.5M EDTA) and loaded onto a 0.4-mm thick 6% polyacrylamide/50% urea gel. Visualisation was done by silver staining.

The results of microsatellite marker analysis are presented in Table I and in Fig. 3. The informative markers D1S243, D1S468, and D1S2145 showed absence of the paternal allele, indicating a deletion in the pater-

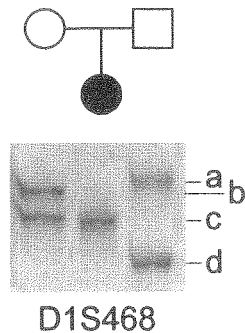


Fig. 3. Results of microsatellite marker analysis for D1S468 in the proposita and her parents showing absence of a paternal allele.

nal homologue; markers D1S214 and D1S548 were not informative for a deletion, and marker D1S508 was informative for biparental inheritance. Thus, the deletion of 1p36.3-1pter was confirmed and shown to have involved the paternal homologue. The breakpoint could be determined within a 5.5-cM interval between markers D1S2145 and D1S508.

DISCUSSION

Flint et al. [1995] reported the first study in which a series of patients with normal or near-normal phenotype but mental retardation and normal banded karyotype was investigated for submicroscopic subtelomeric deletions using microsatellite markers in the vicinity of the telomeres. In a total of 99 patients three deletions were detected, two of which concerned 22qter and one 13qter. In another report Giraudeau et al. [1997] presented a patient, with a 1p36.3 deletion primarily investigated with hypervariable polymorphic probes and secondarily confirmed with FISH, within a series of patients with idiopathic mental retardation. A further patient was mentioned in an abstract [Kearney et al., 1998]. While the other aberrations found in these series were mostly deletions of different chromosomes, the patient presented in our report is already the third with a 1p36.3 deletion. This is not too surprising in that the 1p36.3 deletion is very difficult to detect, at least from GTG-banded metaphases, because of the mostly light (interband) GTG staining property of the distal 1p. This is why the first reported patients with distal 1p deletions all had more complex and thus more easily detectable aberrations [Blennow et al., 1996; Gray et al., 1972; Hain et al., 1980; Reish et al., 1995; Steele et al., 1984; Yunis et al., 1981]. Only recently was a series of patients with simple de novo deletions described who were detected through good quality chromosome preparations in the routine cytogenetic laboratory [Shapira et al., 1997]. The deletions were molecularly defined, and about half of them were, on the molecular level, even smaller than that in the proposita of this report. A recent molecular study on 19 patients found a correlation between size of the deletion and severity of the phenotypic alteration and allowed for critical regions to be defined [Shapira et al., 1998].

Retrospectively, it is unlikely that we would have

TABLE I. Results of Microsatellite Examination for Chromosome 1p36.1-1pter in the Proposita and Her Parents*

Locus	Appr. distance (cM)	Alleles	Location
D1S243	1pter	d,ad,bc	
D1S468	6.2	c,bc,ad	1p36.3
D1S2145	12.9	b,bc,ac	
D1S214	13.7	c [?] ,ac,bc	1p36.3
D1S548	18.4	a [?] ,aa,aa	
D1S508	18.4	ab,bc,ab	
D1S1615	22.9	ac,ab,ac	
D1S160	23.0	ab,bc,aa	
D1S450	24.0	bc,ab,cc	1p36.3-p36.1
D1S2749	56.8	aa,ab,ab	
D1S211	73.2	cd,ac,bd	
FGR		ab,bb,aa	1p36.2-p36.1

*The alleles are given in the order: patient, mother, father. The markers showing paternal deletion are given in bold. Allele designations (a to d) are arbitrary.

detected this deletion from banded karyotypes performed in our laboratory, and reexamination of banded karyotypes in the other two cases came to the same conclusion [Giraudeau et al., 1997; Kearney et al., 1998]. In general, this result and those from the two previous studies [Flint et al., 1995; Giraudeau et al., 1997; Knight et al., 1997] show that examination for subtelomeric deletions is useful in patients with mental retardation with or without associated malformation syndromes, and that the 1pter region would deserve priority in such investigations for two reasons: firstly because of the difficulty in clearly determining small 1pter deletions from GTG-banded karyotypes, and secondly because of the relatively nonspecific associated pattern of phenotypic anomalies, which makes it difficult to recognize such patients on clinical grounds.

As mentioned above, the clinical pattern of deletion of 1p36.3-pter is not highly specific. Shapira et al. [1997] compared the findings in their 14 cases with those from five previous observations. Features present in at least 50% of these patients as well as four further patients [Blennow et al., 1996; Faivre et al., 1998; Giraudeau et al., 1997; Kearney et al., 1998] include growth and mental retardation, seizures, behavioral disturbances, vision impairment, large anterior fontanelle, asymmetric and low-set ears with thickened helices, deep-set eyes, flat nasal bridge, pointed chin, and fifth ray clinodactyly. Less frequent but more specific findings are cardiomyopathy and cleft lip/cleft palate. While the latter finding is rather frequent in autosomal chromosome aberrations, the former is exceedingly rare. Furthermore, the Ebstein heart anomaly, which was present in our *proposita* but in general is a very rare finding in chromosome aberrations, was observed in a second case with 1p36.3 deletion, a prenatally detected fetus [Faivre et al., 1998]. Patients with double segmental aneuploidy due to unbalanced segregation of a familial translocation or to a *de novo* more complex rearrangement were excluded because of the mostly unknown impact of the concomitant autosomal imbalance on the phenotype [Blennow et al., 1996; Giraudeau et al., 1997; Shapira et al., 1997].

On the basis of the data presented, we recommend that a specific search for 1p36.3 deletions, both from banded karyotypes and by FISH with a subtelomeric 1p probe, should be considered in patients showing the following combination of clinical findings (but not necessarily the full pattern): growth retardation; microcephaly; severe mental retardation with seizures; brain

atrophy at neuroradiologic examinations; a mildly abnormal face, especially containing the minor anomalies listed above; and, facultatively, although as especially strong criteria, cleft lip and palate, the Ebstein heart anomaly and cardiomyopathy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the parents of the *proposita* for their cooperation.

REFERENCES

- Blennow E, Bui TH, Wallin A, Kogner P. 1996. Monosomy 1p36.31-33-pter due to a paternal reciprocal translocation: prognostic significance of FISH analysis. *Am J Med Genet* 65:60-67.
- Faivre L, Morichon N, Viot G, Martinovic J, Pinson MP, Raclin V, Ederly P, Dumez Y, Munnich A, Vekemans M. 1998. Prenatal diagnosis of a chromosome 1p36 deletion. *Eur J Hum Genet* 6(suppl 1):99 [P2.123].
- Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-139.
- Giraudeau F, Aubert D, Young I, Horsley S, Knight S, Kearney L, Vergnaud G, Flint J. 1997. Molecular-cytogenetic detection of a deletion of 1p36.3. *J Med Genet*. 34:314-317.
- Gray JE, Syrett JE, Ritchie KM, Elliott WD. 1972. An interstitial translocation: chromosome no. 1p to 4. *Lancet* 2:92-93.
- Hain D, Leversha M, Campbell N, Daniel A, Barr PA, Rogers JG. 1980. The ascertainment and implications of an unbalanced translocation in the neonate. Familial 1:15 translocation. *Aust Paediatr J* 16:196-200.
- Kearney L, Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Flint J. 1998. Human subtelomeric probes: application in practice. *Eur J Hum Genet* 6(suppl 1):23-24 [PL07].
- Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy JLN, Flint J, Kearney L. 1997. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet* 5:1-8.
- Reish O, Berry SA, Hirsch B. 1995. Partial monosomy of chromosome 1p36.3: characterization of the critical region and delineation of a syndrome. *Am J Med Genet* 59:467-475.
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FFB, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG. 1997. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 61:642-650.
- Shapira SK, Wu YQ, Hellstedt HA, Starkey DE, Bedell JA, Chedrawi A, Tharp B, Anderson AE, Littman TA, Lewis RA, Kirkland JL, Stal S, Schlesinger AE, Brown FR, Bacino CA, May KM, Coleman KB, Fernhoff PM, McPherson DJ, Shaffer LG. 1998. Chromosome 1p deletion syndrome: new clinical findings and phenotype-genotype correlations. American Society of Human Genetics, 48 Annual Meeting. *Am J Hum Genet Supplement* to 63:A33.
- Steele MW, Wenger SL, Geweke LO, Golden WL. 1984. The level of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) activity in a patient with a 1p terminal deletion suggests that the gene locus is not distal to sub-band p36.3 on chromosome 1. *Clin Genet* 25:59-62.
- Yunis E, Quintero L, Leibovici M. 1981. Monosomy 1pter. *Hum Genet* 56:279-282.

Versão em português do artigo 1: "Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformation syndromes".

Deleção terminal, del(1)(p36.3), detectada através de um screening para deleções terminais em pacientes com síndromes de malformações não classificadas

Mariuce Riegel¹, Claudio Castellan², Damina Balmer¹, Albert Schinzel^{1,2}

¹ Instituto de Genética Médica da Universidade de Zurique, Suíça

² Serviço de Aconselhamento Genético, Bozen, Itália

* Correspondências para: A. Schinzel, Instituto de Genética Médica da Universidade de Zurique, Raemistrasse 74, CH-8001, Suíça.

Resumo

Descrevemos uma paciente de 4 anos de idade com uma deleção 1p36.3-pter. Os achados clínicos incluem anomalias menores de face e membros, persistência do ducto arterioso, anomalia cardíaca de Ebstein e atrofia de cérebro com convulsões. A análise cromossômica pelo método de bandeamento GTG revelou um resultado (46,XX) normal. Subsequente análise pelo método de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) utilizando-se sondas distais para o cromossomo 1, demonstrou a presença de uma deleção 1p36.3-pter. A investigação molecular com marcadores de DNA microsatelitados demonstrou hemizigosidade de três loci em 1p36.3 com perda do alelo paterno. A deleção 1p36.3 é difícil de se identificar apenas pelo método de bandas convencionais. Além disto, nosso paciente é o terceiro caso relatado com uma del(1)(p36.3) que foi detectado apenas após uma análise citogenética mais detalhada. Em todos os três casos a deleção foi detectada através de um screening de pacientes com síndromes de anomalias congênitas múltiplas/retardo mental compatíveis com aberrações cromossômicas autossômicas. Estas síndromes sugerem investigações para deleções submicroscópicas subteloméricas através de FISH e análise de DNA com marcadores microsatelitados. Com base nestas observações recomendamos que o método de FISH utilizando sondas teloméricas de 1p seja utilizado como teste de rotina em pacientes com similar fenótipo facial, retardo mental severo e convulsões, e uma malformação cardíaca, particularmente a anomalia de Ebstein.

Palavras chaves: deleção cromossômica 1p; hibridização *in situ* por fluorescência (FISH); deleção submicroscópica.

Introdução

A deleção terminal do cromossomo 1p, especialmente do segmento 1p36.3-1pter, é de difícil detecção através do cariótipo por bandeamento. Os primeiros casos publicados de deleção 1p36, sem determinação de subbandas, referem pacientes nos quais as aberrações cromossômicas foram detectadas devido a translocações desbalanceadas [Gray et al., 1972; Hain et al., 1980; Steele et al., 1984; Yunis et al., 1981]. A maioria destas envolvendo cromossomos acrocêntricos, levando a um complemento cromossômico com 45 cromossomos. Outros casos envolvendo o ponto de quebra em 1p36.3 foram detectados através de rearranjos cromossômicos mais complexos [Reish et al., 1995] ou através de marcadores de 1p [Blennow et al., 1996]. Um estudo recente relata 14 casos de deleção 1p36.3-1pter que foram detectados através da análise de cromossomos prometafásicos e metafásicos [Shapira et al., 1997]. Por outro lado, outras duas deleções foram detectadas apenas através de um screening molecular para deleções distais em uma série de pacientes com síndromes de anomalias congênitas múltiplas/retardo mental (MCA/MR) [Girardeau et al., 1997; Kearney et al., 1998]. Descrevemos uma observação similar. Uma deleção terminal 1p detectada através de um screening de pacientes com síndromes MCA/MR não classificadas, e exame de cariótipo com bandas com resultado normal.

Caso clínico

FM, 4 anos de idade, foi produto de quarta gestação de mãe e pai saudáveis, com 38 anos e 37 anos, respectivamente. O pedigree da família não apresenta considerações importantes, sem relato de consangüinidade. A duração da gestação, sexo e peso ao nascer do produto das outras gestações foram os seguintes: primeira com 42 semanas, feminino, 2,700 g; segunda com 41 3/7 semanas, masculino, 3,000 g. A terceira gestação foi interrompida por um aborto espontâneo. A gestação da paciente foi marcada por infecção no trato respiratório a 3,6 e 8 semanas. Movimentos fetais foram notados com cerca de 16 semanas e caracterizados como ativo. A mãe trabalhava como dona de casa durante a gestação. Não foi realizado exame cromossômico pré-natal (devido a idade materna avançada). Parto normal, apresentação cefálica ocorreu a 41 semanas de gestação. Placenta e líquido amniótico foram descritos como normais.

Peso ao nascimento foi de 2,650 g (-3 DP), comprimento foi de 48 cm (10th-25th centil). Hipotonia muscular, atraso de desenvolvimento motor e retardo mental foram observados desde o início. O primeiro evento de convulsão foi observado aos 2 meses de idade e um tratamento anti epilepsia foi iniciado após repetidas convulsões; depois disso, nenhuma convulsão ocorreu sob terapia; entretanto, pequenos eventos de epilepsia continuaram a ocorrer à freqüentes intervalos. O exame cardíaco mostrou anomalia de Ebstein e persistência do ducto arterioso. Foi realizada cirurgia cardíaca aos 2 meses de idade.

Aos 3 anos e 9 meses as seguintes medidas foram obtidas: peso de 15 kg (10th-25th centil), altura de 98 cm (10th centil), perímetro cefálico de 47 cm (-2.1 DP), comprimento total da mão de 10 cm (-2.3 DP), comprimento do dedo médio de 4 cm (-2.8

DP), comprimento total do pé de 13 cm (-2.4 DP), comprimento da orelha de 4.8 cm; distância intercantal interna ou externa dos olhos (7.5cm) dentro dos percentis.

Aos 4 anos de idade e 1 mês (Fig. 1a, b), os seguintes achados foram observados. Crânio braquicéfalo, lembrando o formato usualmente observado quando o bebê nasce em posição pélvica, ainda que o parto não tenha se dado nessa posição. Outros achados anormais: assimetria de face, fronte proeminente com alta linha do cabelo frontal, sinofre, fissuras palpebrais para baixo, epicanto, nariz largo e curto com abas invertidas, filtro longo e achatado, lábios finos, boca pequena com cantos invertidos para baixo, processos palatinos laterais proeminentes, orelha direita mais larga do que a esquerda com rotação posterior, assimetria do tórax com lado esquerdo menor do que o direito, cicatriz de cirurgia cardiovascular, sifose torácica devido a hipotonia muscular, genitália feminina normal, mãos pequenas com prega palmar transversa de transição do lado direito, campodactilia de ambos 5º dedos com encurtamento da falange mediana e apenas uma flexão da dobra do lado direito; pés pequenos com metatarsos curtos do segundo dedo com falange terminal e unhas largas. A paciente não fala e foi completamente dependente de fraldas.

Investigações complementares

A imagem de ressonância magnética do cérebro mostrou atrofia cerebral com alargamento dos ventrículos e espaços subaracnoidais, mas sem anormalidades. Radiografia da coluna vertebral lombar e sacral, e pélvis foram normais. Mãos com ossos normais mas atraso severo de idade óssea de carpos (9 meses) e falanges (12 meses) na idade cronológica de 24 meses.

Métodos e resultados

Investigação citogenética e FISH

A análise cromossômica de cultura de linfócitos através de bandeamento GTG (realizada em outro laboratório; 400-600 nível de resolução), não mostrou alteração cromossômica numérica ou estrutural. Este resultado foi confirmado em nosso laboratório pela inspeção de três metáfases.

Devido ao padrão de dismorfias da paciente (particularmente a combinação de microcefalia, convulsões, retardo mental severo, defeito cardíaco e anomalias menores de face e membros), compatíveis com uma aberração cromossômica autossômica, esta foi incluída em um estudo utilizando-se o método de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). O objetivo do estudo foi a detecção de aberrações cromossômicas estruturais submicroscópicas. O screening foi realizado utilizando-se sondas de DNA teloméricas e subteloméricas para todos os cromossomos, com exceção do braço curto dos cromossomos acrocêntricos, portanto, um total de 41 sondas de DNA. Os clones de DNA específicos (telômeros) de cosmídeos, P1 e PAC, foram obtidos do MRC (Medical Research Council, Oxford, UK) e ATCC (Rockville, Md.). O DNA purificado dos clones foi marcado com biotina 16-dUTP (Boehringer, Mannheim, Germany) ou digoxigenina-11-dUTP (Boehringer, Mannheim) por *nick translation*. As sondas de DNA foram aplicadas conforme protocolo padrão (Oncor Inc., Gaithersburg, Md.). Avidina FITC e rodamina antidigoxigenina foram utilizados para detectar as sondas marcadas com biotina e digoxigenina, respectivamente. A análise de FISH foi realizada em um microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan. As imagens foram capturadas por uma câmera CCD KAF1400 (Photometrics, Tucson, Ariz., U.S.A.), controlada com um *software* de imagem Smart Capture (Vysis, Inc., Downers Grove, Ill.).

A investigação das metáfases pelo método de FISH com a sonda D1Z2, que mapeia a região 1p36, mostrou apenas um sinal em um dos cromossomos 1 da paciente (Fig. 2). Este achado foi também confirmado pela realização de FISH em interfases, onde apenas um sinal pode ser detectado em cada interfase. A análise por FISH não foi realizada nos pais devido a pobre qualidade das amostras.

Infelizmente, não foi possível obter-se uma segunda amostra de sangue da paciente e dos seus pais. Sendo assim, a investigação de uma possível translocação desbalanceada, familiar ou *de novo*, levando a uma duplicação-deleção, foi realizada examinando-se todas as regiões teloméricas e subteloméricas dos outros cromossomos. Sondas de DNA da região subtelomérica de todos os outros cromossomos (com exceção do braço curto dos cromossomos acrocêntricos) mostraram dois sinais normais nos dois cromossomos homólogos na posição apropriada. A hibridização com sonda de DNA de "todos os telômeros humanos" (Oncor) mostrou sinais nos telômeros de ambos homólogos em todos os cromossomos, incluindo sinais em ambos os cromossomos 1 da paciente. Desta maneira, concluímos que uma deleção *de novo* tinha presumivelmente ocorrido nos cromossomos da paciente e que foi responsável pelo seu fenótipo anormal.

Considerando o resultado anormal do FISH, analisamos novamente 3 metáfases coradas pelo método GTG e mesmo assim não detectamos a deleção 1p. Lâminas adicionais de células estocadas em fixador foram preparadas. Os cromossomos 1 de 6 metáfases foram analisados em teste cego, com um igual número de metáfases controles. O investigador corretamente distinguiu entre os cromossomos dos casos e controles: 5/6 cariótipos parciais do paciente e 6/6 do controle, e falhou na detecção da deleção de 1/6 cariótipos do paciente. Entretanto, esta identificação foi feita com o conhecimento prévio da existência da deleção distal 1p, e muito provavelmente a deleção não teria sido

detectada sem a atenção específica dada ao cromossomo 1 durante a re-investigação das bandas GTG.

Investigação molecular

Amostras de DNA da paciente e de seus pais foram investigadas com marcadores microsateletados mapeando a região 1pter-1p36.

Métodos: O DNA genômico foi extraído de células de sangue periférico utilizando-se técnica padrão para extração de DNA. Marcadores microsateletados específicos para a região deletada foram testados. Todos os *primers* foram obtidos de Research Genetics, Huntsville, AL, U.S.A. Entre 200 e 500 *ng* de DNA foram amplificados em um volume total de 25 *ul*. A Reação em cadeia da polimerase foi realizada com 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C -60°C para anelamento dos *primers*, e 1 min durante 20 segundos a 72°C para extensão. Os produtos das reações foram misturados em igual volume de tampão de uréia (42% uréia, 0,1% xileno cianol, 0,1% azul de bromfenol, 0,1% 0,5M EDTA) e separados em gel 0.4 mm, 6% poliacrilamida/50% uréia. A visualização foi feita por coloração de prata.

Os resultados da análise de marcadores microsateletados são apresentados na Tabela I e na Fig. 3. Os marcadores informativos D1S243, D1S468 e D1S2145 mostraram ausência do alelo paterno, indicando uma deleção do homólogo paterno; os marcadores D1S214 e D1S548 não foram informativos para a deleção, e o marcador D1S508 foi informativo para herança biparental. Sendo assim, a deleção de 1p36.3-1pter foi confirmada e mostrou o envolvimento do homólogo paterno. O ponto de quebra foi determinado dentro de um intervalo de 5.5-cM entre os marcadores D1S2145 e D1S508.

Discussão

Flint et al. [1995] relataram o primeiro estudo no qual uma série de pacientes com fenótipo normal ou quase normal mas com retardo mental foram investigados por deleções submicroscópicas subteloméricas. Os pacientes apresentavam um cariótipo de bandas GTG normal, e foram investigados com marcadores de DNA da região dos telômeros. Em um total de 99 pacientes, três deleções foram detectadas, duas das quais no cromossomo 22qter, e uma no cromossomo 13qter.

Giraudeau et al. [1997] ao investigarem uma série de pacientes com retardo mental, relataram uma paciente com deleção 1p36.3. Primeiramente foi feita uma investigação com sondas polimórficas hipervariáveis e em seguida análise por FISH.

O paciente relatado no presente trabalho é o terceiro com uma deleção 1p36.3. A deleção 1p36.3 é muito difícil de ser detectada, pelo menos através do método de bandas GTG. Isto se deve ao fato de que a deleção envolve uma região distal do cromossomo que não é intensamente corada através de bandeamento GTG.

Os primeiros pacientes relatados com uma deleção distal 1p apresentavam aberrações mais complexas e por isso mais fácil de serem detectáveis [Blennow et al., 1996; Gray et al., 1972; Hain et al., 1980; Reisch et al., 1995; Steele et al., 1984; Yunis et al., 1981]. Apenas recentemente foi relatado uma série de pacientes com deleções *de novo* que foram detectadas em preparações cromossômicas de boa qualidade em um laboratório de citogenética de rotina [Shapira et al., 1997]. As deleções foram molecularmente definidas, e cerca da metade, eram ainda menores do que a descrita no presente trabalho. Um recente estudo molecular em 19 pacientes encontrou uma

correlação entre o tamanho da deleção e a severidade da alteração fenotípica, permitindo a definição de regiões críticas [Shapira et al., 1998].

Retrospectivamente, provavelmente não teria sido possível detectar a deleção do cromossomo 1p em nosso paciente através das bandas GTG. A re-análise de cariótipos em outros dois casos relatados também levam a mesma conclusão [Girardeau et al., 1997; Kearney et al., 1998].

Os resultados da nossa investigação e de outros dois estudos prévios [Flint et al., 1995; Girardeau et al., 1997; Knight et al., 1997) mostram que a investigação de deleções subteloméricas é importante em pacientes com retardo mental, com ou sem síndromes de malformações associadas. E ainda, que a região 1pter deve ser investigada prioritariamente por duas razões: primeiramente devido a dificuldade em determinar-se claramente deleções 1pter pelo método de bandeamento GTG. Em seguida, devido ao padrão de anomalias relativamente não específicas associadas ao fenótipo dos casos com deleções 1p, as quais tomam difícil o reconhecimento destes pacientes clinicamente.

Como mencionamos anteriormente, a clínica da deleção 1p36.3-pter, não é altamente específica. Shapira et al [1997] compararam os achados clínicos de 14 casos com observações prévias de outros 5 casos. As características presentes em pelo menos 50% destes pacientes, bem como em outros 4 pacientes relatados [Blennow et al., 1996, Faivre et al., 1998; Girardeau et al., 1997; Kearney et al., 1998], incluem retardo mental e de crescimento, convulsões, distúrbios de comportamento, visão prejudicada, fontanela anterior larga, orelhas com implantação baixa e assimétricas, olhos profundos, ponte nasal baixa, queixo pontudo e clinodactilia do quinto dedo. Achados menos frequentes, mas mais específicos, incluem cardiomiopatia e lábio e palato fendidos. Estes últimos são

mais freqüentes em aberrações cromossômicas envolvendo autossomos, enquanto os achados descritos previamente são mais raros. Além disso, a anomalia cardíaca de Ebstein presente em nosso paciente mas em geral um achado muito raro, foi observado em um segundo caso com deleção 1p36.3, detectado pré-natalmente [Faivre et al., 1998]. Pacientes com duplo segmento aneuplóide devido a segregação desbalanceada de uma translocação familiar ou devido a uma alteração cromossômica *de novo* mais complexa foram excluídos. Isso devido ao fato de que na maioria se desconhecer o impacto de uma alteração autossômica concomitante para o fenótipo [Blennow et al., 1996; Giraudeau et al., 1997; Shapira et al., 1997].

Com base nos dados apresentados, recomendamos que uma investigação específica para deleção 1p36.3 deva ser considerada em pacientes com os seguintes achados clínicos (mas não necessariamente com padrão completo): retardo de crescimento, microcefalia, retardo mental severo com convulsões, atrofia do cérebro no exame neuroradiológico; uma face moderadamente anormal; e, facultativamente, embora como um forte critério, lábios e palato fendidos, anomalia de Ebstein e cardiomiopatia.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos pais da paciente pela sua colaboração.

Referências bibliográficas

Blennow E, Bui TH, Wallin A, Kogner P. 1006. Monosomy 1p36.31-33pter due to a paternal reciprocal translocation: prognostic significance of FISH analysis. 1996. *Am J Med Genet* 65:60-67.

Fraive L, Morichon N, Viot G, Martinovic J, Pinson MP, Raclin V, Edery P, Dumez Y, Munnich A, Vekemans M. 1998. Prenatal diagnosis of a chromosome 1p36 deletion. *Eur J Hum Genet* 6(suppl 1):99 [P2.123].

Flint J, wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9: 132-139.

Giraudeau F, Aubert D, Young I, Horsley S, Knight S, Kearney L, Vergnaud G, Flint J. 1997. Molecular-cytogenetic detection of a deletion of 1p36.3. *J Med Genet* 34:314-317.

Gray JE, Syrett JE, Ritchie KM, Elliott WD. 1972. An interstitial translocation: chromosome n° 1p to 4. *Lancet* 2:92-93.

Hain D, Leversha M, Campbell N, Daniel A, Barr PA, Rogers JG. 1980. The ascertainment and implications of an unbalanced translocation in the neonate. Familial 1:15 translocation. *Aust Paediatr J* 16:196-200.

Kearney L, Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Flint J. 1998. Human subtelomeric probes: application in practice. *Eur J Hum Genet* 6 (suppl 1):23-24 [PL07].

Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy JLN, Flint J, Kearney L. 1997. development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet* 5:1-8.

Reish O, Berry SAA, Hirsch B. 1995. Partial monosomy of chromosome 1p36.3: characterization of the critical region and delineation of a syndrome. *Am J Med Genet* 59:467-475.

Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FFB, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG. 1997. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular chracterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 61:642-650.

Shapira SK, Wu YQ, Hellstedt HA, Starkey DE, Bedell JA, Chedrawi A, Tharp B, Anderson AE, Littman TA, Lewis RA, Kirkland JL, Stal S, Schlesinger AE, Brown FR, Bacino CA, May KM, Coleman KB, Fernhoff PM, McPherson DJ, Shaffer LG. 1998. Chromosome 1p deletion syndrome: new clinical finding and phenotype-genotype correlations. American Society of Human Genetics, 48 Annual Meeting. *Am J Hum Genet Supplement* to 63:A33.

Steele MW, Wenger SL, Geweke LO, Golden WL. 1984. The level of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) activity in a patient with a 1p terminal deletion suggests that the gene locus is not distal to sub-band p36.3 on chromosome 1. *Clin Genet* 25:59-62.

Yunis E, Quintero L, Leibovici M. 1981. Monosomy 1pter. *Hum Genet* 56:279-282.

As Figuras e a Tabela foram publicadas na versão do artigo em inglês (páginas 41 a 45)

Fig.1 Paciente aos 4 anos de idade (a,b). Observa-se testa proeminente, sinofre, epicanto, nariz curto, largo e achatado e cantos da boca para baixo. (página 42).

Fig.2 FISH com a sonda D1Z2 da região 1p36.3 e sonda tel1q da região 1q44-qter em uma metáfase da paciente. Ambos homólogos mostram um sinal (vermelho) enquanto o sinal de 1p36.3 (verde) está presente apenas em um (cromossomo com a deleção) dos homólogos. (página 43).

Fig. 3 Resultado da análise de DNA com marcadores microsatelitados na paciente e nos seus pais. Marcador D1S468 mostra ausência do alelo paterno. (página 44).

Tabela I Resultado da investigação de DNA com marcadores para a região do cromossomo 1p36.1-1pter na paciente e nos seus pais. (página 44).

Artigo 2 " Submicroscopic terminal deletions and duplications in patients with unclassified malformation syndromes". Para ser submetido no American Journal of Medical Genetics.

Submicroscopic terminal deletions and duplications in patients with unclassified malformation syndromes

Riegel M¹, Giugliani^{1,2}R, Schinzel A³

¹ Service of Medical Genetics, Clinical Hospital, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

² Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³Institute of Medical Genetics, University of Zurich, Switzerland

*Correspondence to: M. Riegel, Service of Medical Genetics, Clinical Hospital, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. FAX: :+55-51-316-8010. E-mail: mriegel@hcpa.ufrgs.br

Summary

It has recently been shown that unbalanced submicroscopic subtelomeric chromosomal rearrangements may be a significant cause of unexplained moderate to severe mental retardation with and without phenotypic abnormalities. For the purpose to elucidate in which group of patients and with which technique such examinations would be most beneficial, we investigated 102 patients with mental retardation combined with a pattern of dysmorphic features with or without major malformations and growth retardation in whom conventional GTG-banded chromosome analysis had shown a normal karyotype. Using fluorescence in situ hybridisation (FISH) with probes mapping to 41 subtelomeric regions, we found 2 aberrations which, following further family investigations, had to be considered as variants with no influence on the phenotype. The significant aberrations included 1 de novo deletion (1p) and 2 de novo duplications (8p, 9p). We conclude that: depending on the selection criteria, investigation of patients with unexplained mental retardation and a pattern of minor anomalies will show submicroscopic unbalanced rearrangements which explain the phenotype in 3-8 percent, that the percentage of aberrations will be much higher if there is more than one affected member in a family, and that FISH examinations are superior to molecular marker analysis because they are able to detect duplications as well as deletions and the combination of the latter. Such examinations should be included into the diagnostic workup of patients with unexplained mental retardation and physical abnormalities if a careful banded chromosome examination yields a normal result and a thorough clinical examination does not lead to an etiologic genetic classification.

Key words: terminal deletions; terminal duplications, subtle/submicroscopic chromosome abnormalities; fluorescence in situ hybridization (FISH); unclassified malformations syndromes

Introduction

Two types of observations gave some evidence that there might exist subterminal submicroscopic deletions affecting the phenotype in a more or less specific way. One is that patients with two classical patterns of minor and major anomalies and developmental delay in some instances did not show the expected deletion: a 4p16.3 deletion in Pitt-Rogers-Danks or Wolf-Hirschhorn syndrome (See e.g. Herens et al., 1997) and a 17p13.3 deletion in Miller-Dieker syndrome or lissencephaly and multiple minor anomalies. In these cases with normal banded karyotypes, fluorescence in situ hybridisation (FISH) studies usually allow to demonstrate a submicroscopic deletion. The other observation stems from patients with variable patterns of mostly only minor anomalies and developmental delay who carried an unbalanced chromosome rearrangement (mostly an unbalanced translocation) with a tiny terminal deletion or duplication which was detected only because it occurred in the context of a more complex. The most characteristic example for the latter is terminal deletions of 1p which initially were detected almost exclusively in cases with more complex aberrations (see Riegel et al. 1999).

Flint et al. (1995) were the first to examine a series of 99 patients with mental retardation of unknown cause with a set of subtelomeric probes. Using microsatellite markers mapping to 28 subtelomeric regions, the authors detected 3 aberrations; they concluded an incidence of 6 % of submicroscopic aberrations, deletions and duplications, familial and de novo if probes from 41 subtelomeric regions (all human chromosome arms

except for the short arms of the acrocentrics) would be applied for such investigations. Indeed, two further studies, one (Slavotinek et al. 1999) using microsatellite markers, the other (Knight et al. 1999) using FISH probes, found incidences of submicroscopic subtelomeric rearrangements of 7.5 and 7.4/0.5 percent, respectively in 27 and 466(284/182) patients, respectively (the two numbers in the latter study refer to patients with moderate to severe versus mild developmental delay). In the latter study, almost half of the aberrations were due to a parental balanced rearrangement, and it has been shown that the incidence of such hidden aberrations is higher if the studies are confined to instances of two family members with developmental delay and a pattern of anomalies compatible with an unbalanced chromosome aberration.

The high incidences of aberrations detected gives evidence that submicroscopic unbalanced chromosome aberrations involving the chromosomes ends are a major cause of malformation syndromes and unclassified and etiologically unclear syndromic or non-syndromic mental handicap. More recently, sets of probes both for microsatellite examinations (Flint et al., 1995; Rosenberg et al., 1997) and fluorescence in situ hybridization (FISH) (NIH & IMMC, 1996; Knight et al., 1997) became available with the purpose to test such patients who have the clinical phenotype of a chromosome aberration, but their conventional banded karyotype is normal. It has been argued (Knight et al. 1999) that it should become the standard of care to test patients with unexplained mental retardation with or without pattern of anomalies with such molecular markers.

We here report the results of examinations with subtelomeric FISH probes in 102 probands with developmental delay and dysmorphic patterns performed with the purpose to ascertain the rate and nature of aberrations found at such an examination.

Methods

Clinical evaluation of the patients

Files from the genetic and dysmorphologic clinics were studied from patients with unrecognized patterns of minor and major anomalies and developmental delay in whom cytogenetic examination had revealed a normal banded karyotype. All patients had already been dysmorphologically investigated. Criteria to include a patient into the study were developmental delay of at least mild to moderate degree and a pattern of at least 5 distinct dysmorphic features. Most patients in addition had pre- and/or postnatal growth retardation, and many had major organ malformations; however, presence of one or both of these two criteria was not required as a mandatory finding. The families of these patients were invited to a consultation during which a further clinical examination was performed with the purpose to rule out a recognizable syndrome, and the study was explained to the parents. If the family consented to the examination, heparinized and EDTA blood was obtained from the proband and both parents.

105 probands were included into the study, but three were excluded thereafter.

Cytogenetic and FISH investigations

Metaphase chromosome spreads were obtained from PHA stimulated lymphocyte cultures from the patient and both parents by standard methods. GTG banded chromosome preparations were examined. A FISH protocol using a complete set of probes, most at known distance of 100-300 Kb from the end of each chromosome arm, was applied. This permitted the evaluation of 41 telomeric regions, excluding the short arms of the acrocentric chromosomes and, in male patients, the long arm of the Y. Purified

DNA from clones (Medical Research Council, Oxford, UK) was labelled with either biotin-16-dUTP (Bio Nick Labelling System; Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD, U.S.A.) or digoxigenin-11-dUTP (Boehringer, Mannheim, Germany). Fluorescein isothiocyanate conjugated avidin and rhodamine conjugated antidigoxigenin (Vector Laboratories, Burlingame CA, U.S.A.) were used to detect biotin and digoxigenin labelled probes, respectively. Slides were mounted in an antifade solution (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame CA) and counterstained with DAPI.

All the probes from the subtelomeric-specific clones were tested in control samples before they were used in the samples from the patients. At least 15 metaphase cells were examined for each hybridization. The hybridised metaphases were examined with a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope. FISH images were recorded by a CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, U.S.A.). Imaging software (Vysis, Inc, Downers Grove, IL., U.S.A.) was also used to convert the DAPI image into G banded metaphases for the identification of the chromosomes.

After having obtained an abnormal FISH result, we performed the FISH experiment again with samples from the patient and her/his parents with the specific probes with which the abnormal results were obtained. In all of these cases could the abnormal result in the patient be confirmed, and it could be determined whether the aberration had resulted from a familial rearrangement or it had occurred *de novo*.

Molecular analysis

White blood cell DNA was extracted by standard procedures from whole blood samples of the probands and their parents. Analysis of parental origin of the

rearrangements was carried out using microsatellite primers purchased from Research Genetics, Huntsville, AL, U.S.A. Between 200 and 500 *ng* of DNA were amplified in a total volume of 25 *ul*. The microsatellite markers were used in polymerase chain reactions (PCR) consisting of 35 cycles of: denaturation for 30 sec at 94°C, 45 sec at 55°C to 60°C for primer annealing and primer extension at 72°C for 1 min. The PCR products were mixed with an equal volume of urea loading buffer (42% urea, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromphenol blue, 0.1% 0.5M EDTA) and separated on 6% polyacrylamide/50% urea gel. Visualization was done by silver staining.

Results

General

Chromosome analysis from blood lymphocyte culture preparations from the 105 had revealed normal karyotypes by G-banding at least once prior to a re-examination at/or referral to this study. In two of the patients in whom the initial interpretation of the karyotype was normal, we found an *de novo* interstitial deletion at re-examination: one del(7)(q34) and one del(8)(p11.2-p21). In a third patient a balanced 4q;13q translocation transmitted from the healthy mother was newly detected. These 3 patients were excluded from further investigations, and hence the final number of probands was 102. Two patients could not be investigated with the complete set of probes because there was not enough material available for examination. Submicroscopic terminal rearrangements were identified in six of the individuals with unclassified malformation syndromes. Three of them at subsequent parental examination turned out to be variants without phenotypic effect. Three patients had *de novo* rearrangements including one deletion and two duplications (Table 1).

Specific

1. Aberrations with phenotypic effects

1.1. Deletions *de novo*

Case 1, deletion of 1p36.3: Data were already published (Riegel et al., 1999).

1.2. Duplications *de novo*

Case 2, duplication of 8p23.3: Girl born after 38 weeks gestation weighing 3.08kg, length 49cm. Cardiac defect, developmental delay (sits at 15 months, walks at 4 years) and behaviour disorder, especially autoaggressivity. At examinations at 7 months and 4 years of age, length/height, weight and OFC were below the 3rd percentile. Clinical features included narrow prominent forehead, deep-set eyes, upslanting palpebral fissures, long nasal septum, delayed dentition, small and prominent ears, umbilical hernia, sacral dimple, narrow fingers with hypoplastic terminal phalanges, small feet with broad halluces and hypoplastic nails and epilepsy controlled by treatment after repeated seizures. FISH analysis with a subtelomeric 8p probe showed either a distinctly broader signal or two separate signals in all analysed metaphases (Fig. 1) as well as, in all interphase nuclei. FISH analysis in both parents revealed signals of usual sizes and intensities. The results were confirmed in the patient in a fibroblast culture. Investigation of the family with more than one dozen microsatellite markers mapping to 8p23 did not detect an informative constellation to define parental origin. Thus, an interchromatid exchange resulting in a small terminal duplication was assumed.

Case 3, duplication of 9p24.3: 4 year-old girl born at term of a normal pregnancy, birthweight 3.2kg, length 45cm. Physical examination disclosed psychomotor retardation: sits with 12 months, starts walking at 17 months of age. Hypertelorism, upslanting

palpebral fissures, long eyelashes, broad nasal bridge, divergent squint. FISH with the subtelomeric 9p probe showed a distinctly broader signal or two separate signals in all 15 analysed metaphases (Fig. 2) and in interphase nuclei. Both parents showed normal signals. It was not possible to obtain a skin biopsy to analyse fibroblasts. Investigation of the family with more than 1 dozen microsatellite markers mapping to 9p24 failed to detect a constellation of results informative of the parental origin. Thus, an interchromatid exchange resulting in a small terminal duplication was assumed.

2. Familial duplications and deletions without phenotypic effect

Case 4, deletion of a segment of Xp22.33 in a 2 1/2 year-old girl. Uneventful pregnancy of 38 weeks, birthweight 3.2kg, length 48cm. Delayed development, muscular hypotonia, but normal growth. High forehead, inner epicanthic folds, strabismus, clinodactyly of little fingers; perimembranous ventricular septal defect. FISH examination with the Xp subtelomeric probe disclosed a signal on one of the X chromosomes only. The child's mother showed the same finding. These results were confirmed in interphase cells, where only one signal could be detected. The absence of one signal probable is due to a length polymorphism since the Xp/Yp clone used for the investigation of these patients detects length polymorphisms.

Case 5 and her brother (case 6), duplication or triplication of a segment within 3q29. The proband is a 6 year-old girl, her brother aged 2 months at examination. Both showed microcephaly, downslanting palpebral fissures, cleft palate and cleft lip, and moderate MR. The girl also had a low and narrow forehead, prominent and dysmorphic ears and tetralogy of Fallot. The boy, in addition, had a right inguinal hernia and right cryptorchidism, a left dysplastic ear, right renal agenesis, hypoplastic finger and toenails

and a convergent squint. The FISH examination of both sibs with the subterminal 3q probe showed a distinctly broader signals on the long arm of the chromosome 3. The mother and the healthy sister showed the same FISH pattern as in the 2 affected sibs. Interphase FISH analysis confirmed the results.

Microsatellite markers mapping to the presumably terminal deleted or duplicated regions were used in order to determine the parental origin of the affected chromosome in cases 1,2,3 and to further investigated the subtelomeric polymorphisms (cases 4,5 and 6). The results of microsatellite marker analysis from the case 1 [del(1)(p36.3-pter)] showed hemizyosity at three loci at 1p36.3 with loss of the paternal allele. More than a dozen microsatellite markers were tested to investigated the origin of the duplications in cases 2 (dup8pter) and 3 (dup9pter). The markers were not informative for duplication on both cases. The subtelomeric polymorphisms of cases 4 [del(X)(pter)], 5 [dup(3)(q29)] and 6 [dup(3)(q29)] were not confirmed through the microsatellite marker analysis. No one of the dozen markers used was informative.

Discussion

It was obvious since the introduction of chromosome banding that conventional cytogenetics will miss many subtle chromosome aberrations, especially those localised close to the telomeres. Evidence for this was, e.g., that with improvement of banding, e.g. prometaphase banding, the number of small deletions and duplications increased markedly. On the other hand, there were cases of clinically well-known malformation syndromes due to autosomal deletions in whom banded chromosome examination failed to detect the expected deletion, e.g. in 4p- (Wolf-Hirschhorn) syndrome. Furthermore, terminal small deletions with a relatively non-specific phenotype were picked up through

more complex aberrations, mostly translocations. A good example is the terminal 1p deletion: the first half dozen cases were detected only through more complex rearrangements (Blennow et al., 1996; Gray et al., 1972; Hain et al., 1980; Reisch et al., 1995; Steele et al., 1984; Yunis et al., 1981). Only recently was a series of patients with simple de novo deletions described who were detected through good quality chromosome preparations in the routine cytogenetic laboratory (Shapira et al., 1997). Another example is Miller-Dieker syndrome due to a 17p13.3 deletion: the first (familial) cases were detected through unbalanced translocations. Only knowing the clinical phenotype, some aberrations could be detected through specific attention to the 17p segment, but other could not.

With the aim of testing the hypothesis that submicroscopic subterminal rearrangements with unspecific phenotype, mostly mental retardation, should exist, Flint et al. (1995) investigated a series of patients with unexplained mental retardation and normal banded karyotypes for submicroscopic subtelomeric deletions using VNTR polymorphism analysis. In a total of 99 patients, three deletions were detected, two of which involving 22qter and one 13qter. Since these authors tested only half of all telomeres, they estimated that as much as 6% of unexplained mental retardation might be caused by cryptic telomeric rearrangements.

After the investigation of Flint et al., two further series of patients investigated in a similar way were reported. Slavotinek et al. (1999) examined 27 patients with microsatellite markers from 41 chromosome ends. They found 2 aberrations. Knight et al (1999) reported the results of investigations in 466 children with unexplained mental retardation using FISH with sub-telomeric probes. The authors found that subtle chromosomal abnormalities occur with a frequency of 7.4% in children with moderate to

severe mental retardation and 0.5% in children with mild retardation. The abnormalities have an estimated population prevalence of 2.1 per 10,000 and were familial in almost half of the cases.

Prompted by the findings by Flint et al. (1995) and the later series, recently several single case reports of patients were reported whose karyotypes by conventional cytogenetics were considered to be normal, but in whom testing for submicroscopic subterminal rearrangements revealed a cryptic subtelomeric rearrangements which cause their phenotypes (Ghaffari et al., 1998; Carolina e al., 1999; Elliot et al., 1999; Joyce et al., 1999; Riegel et al., 1999). Furthermore, a number of families were reported in whom at least 2 members were affected with a MCA/MR syndrome due to unbalanced transmission of a submicroscopic familial reciprocal translocation which was detected through telomeric FISH or microsatellite marker screening (see Kleefstra et al. 2000). Just recently it was proposed to extent such a search to the entire genome using 400 microsatellites in selected cases where no subtelomeric anomaly is found, and indeed a recent series found 2 aberrations among 11 polymalformed children (Rosenberg et al. 2000).

The aim of the present investigation was to find out the incidence of subterminal submicroscopic rearrangements in patients with unexplained mental retardation who in addition showed further findings characteristic for visible chromosome aberrations, namely patterns of dysmorphic findings, malformations and growth retardation.

In a serie of initially 105 patients, 41 probes were applied. The patients who already had a previous chromosome examination with a normal result were all re-investigated. No unbalanced terminal rearrangement was found at these examinations, but two small interstitial deletions which had escaped the previous examinations were detected, and

these 2 patients were excluded from the series. In addition, one maternally inherited balanced 4;13 translocation was newly detected. Therefore, this patient was excluded from the series as well. Furthermore, patients with the clinical suspicion of a terminal deletion which could not be found at conventional banded examinations were also excluded since in them FISH only with the probes mapping to the segment in question would have been applied. By this approach, at least 2 terminal deletions were found during the study period, one involving 5p and the other 18q.

Noteworthy in our series are several points: one is that no familial rearrangement was found. In fact, however, one family was selected for examination in whom at least 2 affected patients with the phenotype of a chromosome aberration showed normal banded karyotypes. Unfortunately, the family refrained from participation at the point. One year later, the spouse of the healthy brother of the 2 handicapped siblings gave birth to another multimalformed newborn, and at this occasion, an investigation with FISH probes of all telomeres disclosed a balanced 17;19 translocation in the brother and unbalanced segregation with duplication of terminal 19q and deletion of terminal 17q in the newborn as well as, secondarily, in the 2 probands. Would the family have participated, the mother of the affected newborn could have been offered prenatal diagnosis in this pregnancy.

The second interesting finding is that the series contained two instances of de novo duplications (of 8pter and 9pter). The observations that in a high proportion of both metaphase and interphase cells there were 2 signals clearly separated from each other by a non-fluorescent segment, the confirmation by a second probe in both and in fibroblasts in one case, and the de novo occurrence make it likely that the phenotype of the patients is caused by the rearrangement and thus that we are not dealing with a fluorescing variant. It is surprising that no other such duplications were reported in the much larger

series of Knight et al. (1999). The other duplication (of part of 3q29) obviously concerned a familial variant without phenotypic effects since it was also present in the healthy mother and sister of the 2 probands. The small total number of "positive" cases could be caused by the decision of not including patients with suspicion of a specific terminal deletion even if invisible at conventional banded examination. Since for later practical purposes it would be superior in such cases to specifically test single telomeres rather than to screen them all.

The conclusions from the series reported in this investigation can be seen as follows:

1. Screening of patients with unexplained mental retardation with additional phenotypic anomalies is an effective way to detect submicroscopic subterminal rearrangements. If the results are compared to the results of other medical genetic tests, e.g. chromosome examinations in patients with phenotype such as Down syndrome or Turner syndrome, investigations in couples with repeated spontaneous abortions, testing for the fragile X mutation etc., the yield of abnormal results, of about 5%, is not lower than in the latter. It is especially high in instances with more than one affected family member. For the purpose of genetic counseling and prevention of recurrence, these familial cases are also by far the most important group to be screened with subtelomeric probes. In fact, if the phenotype is classical for a chromosome aberration and the result with subtelomeric probes is negative, one could consider to extent the study to markers covering the entire genome within useful distances (see Rosenberg et al., 2000). However, regarding the amount of work and ressources for each case, strict selection would be required for such an approach unless the study could be automatized in the future.

2. An initial clinical examination of the patient by an experienced clinical geneticist would save costs since the examination could be performed more specifically, e.g. only with the probe for 4p16.3 if the patient's phenotype resembles Wolf-Hirschhorn or Pitt-Rogers-Danks syndrome.

3. Application of FISH probes has the advantage over microsatellite markers as it detects small duplications as well and the disadvantage that it cannot give information about the parental origin in de novo rearrangements. Since the majority of small duplications arise by interchromatid exchange, it is mostly the deletions whose origin can be demonstrated by marker analysis, and the vast majority of most of them are paternal in origin.

4. An yet unanswered question is whether testing of patients with unexplained mental retardation with otherwise normal phenotype is as effective as if additional phenotypic abnormalities and/or growth retardation are present as well. Further studies, using the same selection criteria, are necessary to answer this question.

5. Finally, the matter arises which method (FISH probes, microsatellites markers or CGH) is most effective with respect to cost versus yield. Our series show that all deletions can be detected by both aforementioned methods while the pure duplications (without reciprocal deletion) cannot. CGH right now is not sensitive enough, but further technical developments could potentially increase the sensitivity. If this could be achieved, CGH would have the great advantage of covering the entire genome and not only the telomeres, and it could become the method of choice.

Acknowledgements

We are grateful to the patients, their families and physicians for their valuable cooperation. This study was supported by the Swiss National Foundation (grant No. 32-56051.98).

References

- Blennow E, Bui TH, Wallin A, Kogner P. 1996. Monosomy 1p36.31-33.pter due to a paternal reciprocal translocation: prognostic significance of FISH analysis. *Am J Med Genet* , 65:60-67.
- Carolina I, Waters JJ, Morton J, Davidson EV. 1999. Multi-subtelomeric screening: experience with clinical audit. *J Med Genet* , 36(Suppl. 1):15[SP11].
- Elliot H, Kingston H, Kerr B, Gaunt L. 1999. Sub-telomeric chromosome deletions: the Manchester experiences and dilemmas. *J Med Genet*, 36(Suppl. 1):15[SP10].
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* , 9(2):132-40.
- Ghaffari SR, Boyd E, Tolmie JL, Crow YJ, Trainer AH, Connor JM. 1998. A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet* , 35(3):225-33.
- Gray JE, Syrett JE, Ritchie KM, Elliot WD. 1972. An interstitial translocation: chromosome n^o 1p to 4. *Lancet* 2:92-93.
- Hain D, Leverscha M, Campbell N, Daniel A, Barr PA, Rogers JG. 1980. The ascertainment and implications of an unbalanced translocation in the neonate. Familial 1:15 translocation. *Aust Paediatr*, 16:196-200.

Herens C, Jamar M, Alvarez-Gonzalez ML, Lesenfants S, Lombet J, Bonnivert J, Koulischer L, Verloes A. 1997. Private multiple congenital anomaly syndromes may result from unbalanced subtle translocations: $t(2q;4p)$ explains the Lambotte syndrome. *Am J Med Genet* 73:127-131.

Joyce C, Hart HH, Fisher AM, Browne CE. 1999. Use of subtelomeric FISH probes to detect abnormalities in patients with idiopathic mental retardation and characterise rearrangements at the limit of cytogenetic resolution. *J Med Genet*, 36(Suppl. 1):15[SP5].

Kleefstra T, van de Zande G, Merkx G, Mieloo H, Hoovers JMN, Smeets D. 2000. Identification of an unbalanced cryptic translocation between the chromosomes 8 and 13 in two sisters with mild mental retardation accompanied by mild dysmorphic features. *Eur J Hum Genet* 8:637-340.

Knight S, Horsley S, Regan R, Lawrie NM, Maher FJ, Cardy DLN, Flint J, Kearney L. 1997. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet*, 5:1-8.

Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. 1999. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*, 13:354-81.

National Institute of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration. Ning Y, Roschke A, Smith ACM, Macha M, Precht K, Riethman H, Ledbetter DH & Flint J, Horsley

SW, Regan R, Kearney L, Knight S, Svaloy K, Brown WRA. 1996. A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet* , 14:86-89.

Reisch O, Berry SA, Hirsch B. 1995. Partial monosomy of chromosome 1p36.3: characterization of the critical region and delineation of a syndrome. *Am J Med Genet* , 59:467-475.

Riegel M, Castellan C, Balmer D, Brecevic L, Schinzel A. 1999. Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformation syndromes. *Am J Med Genet*, 82:249-253.

Rosenberg M, Hui L, Ma J, Nusbaum HC, Clark K, Robinson L, Dziadzio L, Swain PM, Keith T, Hudson TJ, Biesecker LG, Flint J. 1997. Characterization of short tandem repeats from thirty-one human telomeres. *Genome Research*, 7(9):917-923.

Rosenberg MJ, Vaske D, Killoran CE, Ning Y, Wargowski D, Hudgins L, Tiffit CJ, Meck J, Blancato JK, Rosenbaum K, Pauli RM, Weber J, Biesecker LG. 2000. Detection of chromosomal aberrations by a whole-genome microsatellite screen. *Am J Hum Genet* 66:419-427.

Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FFB, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG. 1997. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet*, 61:642-650.

Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C, Clayton-Smith J, Kingston H, Campbell RH, Flint J, Donnai D, Biesecker L. 1999. Screening for submicroscopic rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J. Med. Genet.*, 36(5):405-11.

Steele MW, Wenger SL, Geweke LO, Golden WL. 1984. The level of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PDG) activity in a patient with a 1p terminal deletion suggests that the gene locus is not distal to sub-band p36.3 on chromosome 1. *Clin Genet*, 25:59-62.

Yunis E, Quintero L, Leibovic M. 1981. Monosomy 1pter. *Hum Genet*, 56:279-282.

Table 1. Occurrence and origin of the rearrangements by the FISH assay with subtelomeric probes.

case	age	FISH analysis	occurrence	parental origin of the rearrangement
1	4y	46,XX,del(1)(p36.3)*	d.n.	paternal
2	4y	46,XX,dup(8)(pter)	d.n.	ni
3	4y	46,XX,dup(9)(pter)	d.n.	ni
4	2 y6m	46,XX,del(X)(pter)	familial	maternal
5	6y	46,XX,dup(3)(q29)	familial	maternal
6	2m	46,XY,dup(3)(q29)	familial	maternal

*previously reported (Riegel et al., 1999)

d.n. = de novo

ni= results of microsatellite markers were not informative

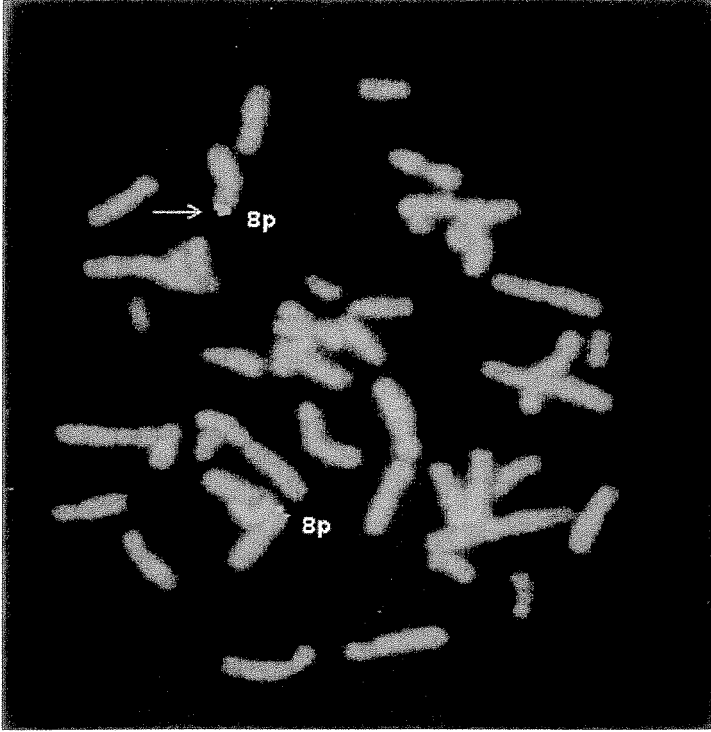


Figure 1. FISH with subtelomeric probe 8p23.3 of case 2. The set indicates a distinctly broader signal on one of the homologues of the patient.

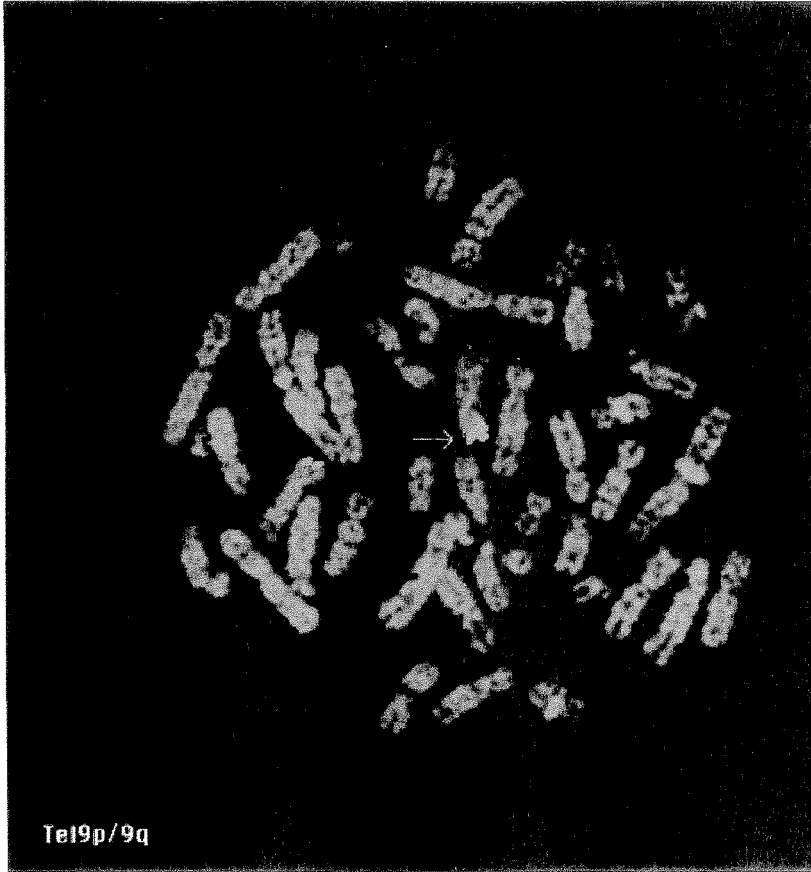


Figure 2. FISH with the subtelomeric 9p (green) and 9q (red) probes of case 3. The set indicates a distinctly broader signal on one of the chromosomes 9 of the patient.

Versão em português do artigo 2 " Submicroscopic terminal deletions and duplications in patients with unclassified malformation syndromes".

Deleções e duplicações terminais submicroscópicas em pacientes com síndromes malformativas não classificadas

Riegel M^{1*}, Giugliani R^{1,2}, Schinzel A³

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul Brasil.

² Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Instituto de Genética Médica, Universidade de Zurique, Suíça

* Correspondências para: Mariluce Riegel, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. FAX: +55-51-316-8010. E-mail: mriegel@hcpa.ufrgs.br

Palavras chaves: deleções terminais; duplicações terminais, anormalidades cromossômicas submicroscópicas; hibridização in situ por fluorescência (FISH); síndromes de malformações não classificadas.

Introdução

Duas importantes observações levaram à evidência de que deveriam existir deleções submicroscópicas afetando o fenótipo de uma maneira mais ou menos específica. Uma delas é que pacientes com dois padrões clássicos de anomalias maiores e menores e atraso de desenvolvimento, em alguns casos, não mostravam a deleção esperada. É o caso da deleção 4p16.3 nas síndromes de Pitt-Rogers-Danks ou Wolf-Hirschhorn (Herens et al., 1997) e da deleção 17p13.3 na síndrome de Miller-Dieker (ou lissencefalia e múltiplas anomalias menores). Nestes casos, em que o cariótipo com bandas era normal, estudos com FISH geralmente demonstravam a existência de uma deleção submicroscópica. A outra observação baseava-se na existência de pacientes com padrões variáveis de anomalias menores e atraso de desenvolvimento, que eram portadores de alterações cromossômicas desbalanceadas. A maioria apresentava translocações desbalanceadas com deleção ou duplicação de um segmento muito pequeno, as quais foram detectadas apenas porque eram decorrentes de um rearranjo cromossômico mais complexo. O exemplo mais característico destes casos é a deleção terminal do cromossomo 1p, o qual inicialmente era detectada quase que exclusivamente em casos com aberrações mais complexas (Riegel et al., 1999).

Flint et al. (1995) foram os primeiros a investigar uma série de pacientes com retardo mental de causa desconhecida com um conjunto de sondas subteloméricas. A

utilização de marcadores microsateletados específicos para 28 regiões subteloméricas, permitiu a detecção de 3 alterações. Os autores concluíram que com a utilização de 41 sondas subteloméricas (para todas as extremidades cromossômicas, com exceção do braço curto dos cromossomos acrocêntricos e do braço longo do cromossomos Y), a incidência de alterações submicroscópicas, deleções e duplicações (familiares ou de novo) seria de 6%.

Dois outros estudos encontraram incidências de alterações subteloméricas de 7,5% (Slavotinek et al., 1999) e 7.4%/0.5% (Knight et al., 1999), em 27 e 466 (284/182) pacientes, respectivamente. (os dois números do último estudo referem-se a pacientes com atraso de desenvolvimento moderado a severo versus atraso de desenvolvimento leve). Knight et al (1999), relataram que aproximadamente metade das alterações encontradas na amostra estudada, eram devido a rearranjos familiares balanceados. Concluíram também que a proporção de alterações seria maior se as investigações fossem limitadas a famílias com dois membros afetados apresentando retardo de desenvolvimento e um padrão de anomalias compatíveis com uma alteração cromossômica desbalanceada.

A alta incidência de alterações detectadas evidencia que as alterações cromossômicas submicroscópicas envolvendo as extremidades cromossômicas, são uma causa importante de síndromes de malformações e retardo mental não classificadas geneticamente e etiologicamente não esclarecidas. Recentemente, um grupo de sondas de DNA foi desenvolvido para investigações em pacientes que apresentam um fenótipo clínico sugestivo de uma alteração cromossômica, mas que têm um cariótipo com bandeamento convencional normal. Este grupo de sondas pode ser utilizado tanto pelo método de análise de marcadores microsateletados (Flint et al., 1995; Rosenberg et al.,

1997), como por FISH (NIH & IMMC, 1996; Knight et al., 1997). Knight et al (1999) propõem que seja padronizada a utilização desses marcadores moleculares para a investigação de pacientes com retardo mental de causa desconhecida com ou sem anomalias menores.

Relatamos neste trabalho os resultados de exames realizados em 102 pacientes com atraso de desenvolvimento e dismorfias, utilizando-se o método de FISH com sondas subteloméricas. Objetivamos determinar a taxa e a origem de alterações cromossômicas encontradas neste grupo.

Métodos

Avaliação clínica dos pacientes

A seleção da amostra foi feita primeiramente através de um levantamento das fichas clínicas (com dados genéticos e de dismorfologia) de pacientes com um padrão de anomalias maiores e menores e atraso de desenvolvimento, que apresentavam um cariótipo com bandas com resultado normal. Foram excluídos da amostra aqueles pacientes que possuíam cariótipo com resultado alterado. Todos os pacientes já haviam sido investigados do ponto de vista de malformação. Os critérios utilizados para incluir os pacientes na amostra foram atraso de desenvolvimento de grau leve a moderado e presença de pelo menos 5 características dismórficas distintas. Além disso, a maioria dos pacientes apresentava um retardo de crescimento pré e/ou pós-natal, e muitos apresentavam malformações maiores de órgãos. Entretanto, nenhum destes últimos critérios foi considerado como um achado obrigatório. Os familiares destes pacientes foram convidados para uma consulta durante a qual exames clínicos adicionais foram

realizados com o intuito de descartar o reconhecimento de uma síndrome genética e a proposta da investigação foi à família. Se a família consentisse em prosseguir com as investigações, realizávamos uma coleta de sangue periférico do paciente e de seus pais. Foram incluídos neste estudo 105 pacientes, sendo 3 posteriormente excluídos.

Investigações citogenéticas e FISH

Cromossomos metafásicos do paciente e de ambos os pais foram obtidos por cultura de linfócitos através de protocolo padrão. Preparações cromossômicas com bandas GTG foram analisadas. O método de FISH foi aplicado utilizando-se um conjunto de sondas, a maioria com distâncias conhecidas entre 100-300 Kb da extremidade de cada braço cromossômico, permitindo a avaliação de 41 regiões teloméricas. Excluindo-se o braço curto dos cromossomos acrocêntricos e, em pacientes do sexo masculino, o braço longo do cromossomo Y. O DNA purificado obtido dos clones (Medical Research Council, Oxford, UK), foi marcado com biotina-16-dUTP (Bio Nick Labelling System; Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg MD, U.S.A) ou digoxigenina-11-dUTP (Boehringer, Mannheim, Germany). Fluoresceína-avidina conjugado e rodamina-antidigoxigenina conjugado (Vector Laboratories, Burlingame CA, U.S.A.) foram usados para a detecção de sondas marcadas com biotina e digoxigenina, respectivamente. As lâminas foram montadas em solução de antifade (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame CA) e coradas com DAPI.

Todas as sondas subteloméricas-específicas obtidas dos clones foram testadas em amostras controles antes de serem utilizadas nas amostras de pacientes. Pelo menos 15 células metafásicas foram examinadas em cada hibridização. As metáfases hibridizadas foram examinadas em um microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan. As

imagens de FISH foram capturadas por uma câmera CCD (Photometrics, Tucson, AZ, U.S.A.). Um *software* de imagem (Vysis, Inc, Downers Grove, IL., U.S.A.) foi utilizado para converter a imagem obtida pela coloração com DAPI em bandas G para a identificação dos cromossomos.

Na obtenção de um resultado anormal por FISH, ou seja, na detecção de uma alteração cromossômica, realizamos o experimento novamente nas amostras do paciente e de seus pais. Utilizamos neste experimento a mesma sonda específica com a qual os resultados anormais tinham sido obtidos anteriormente. Em todos estes casos, o resultado anormal do exame do paciente foi confirmado, tendo sido possível determinar se a alteração cromossômica foi resultado de um rearranjo familiar ou ocorreu *de novo*.

Análise Molecular

O DNA genômico foi extraído de células de sangue periférico dos pacientes e de seus pais, utilizando-se técnica padrão para extração de DNA. A análise da origem parental das alterações foi realizada com marcadores microsatelitados (Research Genetics, Huntsville, AL, U.S.A.). Entre 200 e 500 *ng* de DNA foram amplificados em um volume total de 25 μ l. Os marcadores microsatelitados foram utilizados em reações em cadeia da polimerase (PCR) com 35 ciclos de: denaturação por 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C-60°C para anelamento dos primers, e 1 min a 72°C para a extensão. Os produtos das reações foram misturados em igual volume de tampão (42% uréia, 0,1% xileno cianol, 0,1% azul de bromfenol, 0,1% 0,5M EDTA) e separados em gel de 0.4 mm, 6% poliacrilamida/50% uréia). A visualização foi feita por coloração com prata.

Resultados

Gerais

A análise cromossômica de preparações obtidas através de cultura de linfócitos de 105 pacientes, revelou um cariótipo de bandas G normal pelo menos uma vez antes da reavaliação para este estudo. Em dois dos pacientes em que a interpretação inicial do cariótipo havia sido normal, encontramos uma deleção intersticial *de novo* (del(7)(q34) e del(8)(p11.2-p21) quando realizamos o exame de cariótipo pela segunda vez. Em um terceiro paciente detectamos uma translocação balanceada (4q;13q) transmitida pela sua mãe. Estes três pacientes foram excluídos do estudo. Conseqüentemente, investigamos um total de 102 pacientes. Em dois destes pacientes não foi possível uma investigação citogenética com todas as sondas porque não havia material celular suficiente para análise. Alterações terminais submicroscópicas foram identificadas em 6 indivíduos com síndromes de malformação não classificadas. Três destas, após investigação citogenética dos pais, foram classificadas como variantes sem efeito fenotípico. Três pacientes tinham alterações cromossômicas *de novo*, incluindo uma deleção e duas duplicações (Tabela I).

Específicos

1. Alterações com efeito fenotípico

Deleções de novo

Caso 1, deleção do cromossomo 1p36.3: Dados já publicados (Riegel et al., 1999)

Duplicações de novo

Caso 2, duplicação do cromossomo 8p23.3: Paciente do sexo feminino nascida após 38 semanas de gestação. Peso 3.08 Kg, comprimento de 49 cm. Defeito cardíaco, atraso de desenvolvimento (sentou aos 15 meses, andou aos 4 anos de idade) e distúrbio de comportamento, especialmente autoagressividade. Ao exame físico aos 7 meses e aos 4 anos de idade, comprimento/altura, peso e perímetro cefálico abaixo do terceiro percentil. Os achados clínicos incluem fronte estreita e proeminente, olhos fundos, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, orifício septo nasal longo, dentição atrasada, orelhas pequenas e proeminentes, hérnia umbilical, orifício sacral, dedos estreitos com falanges terminais hipoplásticas, pés pequenos com halux largos e unhas hipoplásticas e epilepsia controlada por tratamento após repetidas convulsões. A análise por FISH com uma sonda subtelomérica de 8p mostrou sinais intensos de hibridização ou dois sinais separados nas cromátides de um dos cromossomos 8, em todas as metáfases analisadas (Fig. 1), bem como, em todos os núcleos interfásicos. Análise por FISH das células de seus pais revelou um padrão de sinais de tamanho e intensidade normais. Os resultados foram confirmados em cultura de fibroblastos da paciente. A investigação da família com uma série de mais de doze marcadores microsatelitados (específicos para a região 8p23), não detectou uma constelação informativa para a origem parental da alteração. Neste caso, a

ocorrência de uma troca intercromatídica resultando em uma pequena duplicação terminal foi assumida.

Caso 3, duplicação do cromossomo 9p24.3: Paciente do sexo feminino, 4 anos de idade, nascida a termo de uma gestação normal, pesando 3.200 g e medindo 45 cm. Apresentava retardo psicomotor: tendo sentado aos 12 meses e começado a caminhar com 17 meses de idade. Ao exame foi detectado hipertelorismo, fissuras palpebrais inclinadas para cima, cílios longos, ponte nasal larga e estrabismo. FISH com sonda subtelomérica de 9p mostrou sinais intensos ou dois sinais separados nas cromátides em todas as 15 metáfases analisadas (Fig. 2) e núcleos interfásicos. Investigação por FISH das células de ambos os pais mostrou sinais normais. Não foi possível obter uma biópsia de pele da paciente para realizar o exame em fibroblastos. A investigação da família com uma série de mais de doze marcadores microsatelitados (específicos para a região 9p24), não permitiu detectar uma constelação de resultados informativa para a determinação da origem parental da alteração. Sendo assim, uma troca intercromatídica resultando em uma pequena duplicação terminal foi assumida.

Deleções e duplicações familiares sem efeito fenotípico

Caso 4: deleção de um segmento de Xp22.33 em uma paciente do sexo feminino com 2 anos e 6 meses de idade. Produto de gestação de 38 semanas, peso ao nascimento de 3.200 g, comprimento de 48 cm. Atraso de desenvolvimento, hipotonia muscular mas crescimento normal. Fronte alta, epicanto, estrabismo, clinodactilia dos pequenos dedos, defeito de septo ventricular perimembranoso. A análise por FISH com a sonda subtelomérica do cromossomo Xp, evidenciou um sinal apenas em um dos cromossomos X. A análise em células da mãe da paciente mostrou o mesmo achado.

Estes resultados foram confirmados em células interfásicas, onde apenas um sinal pode ser detectado. A ausência de um dos sinais provavelmente é devido a um polimorfismo de comprimento nesta região, já que o clone Xp/Yp utilizado na investigação destes pacientes detecta polimorfismos de comprimento.

Caso 5 e seu irmão (caso 6), duplicação ou triplicação de um segmento dentro da região 3q29. Paciente do sexo feminino com 6 anos de idade e seu irmão com 2 meses de idade ao exame. Ambos mostravam microcefalia, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, palato e lábios fendidos e retardo mental moderado. Além destes achados, o caso 5 também apresentava fronte baixa e estreita, orelhas dismórficas e proeminentes e Tetralogia de Fallot. O caso 6 apresentava hérnia inguinal e criptorquidismo a direita, orelha esquerda dismórfica, agenesia renal direita, dedos e unhas dos pés hipoplásticos e estrabismo. A análise por FISH em ambos os irmãos com uma sonda subterminal da região 3q mostrou sinais intensos de hibridização no braço longo do cromossomo 3. As análises por FISH das metáfases da mãe e da irmã normal dos pacientes, mostraram os mesmos padrões de hibridização evidenciados no exame dos afetados. FISH em células interfásicas confirmou os resultados.

Marcadores microsatelitados específicos para a suposta região deletada ou duplicada foram utilizados com a finalidade de se determinar a origem parental do cromossomo afetado (nos casos 1,2 e 3). E, nos casos 4,5 e 6, para adicionais investigações dos polimorfismos subteloméricos. Os resultados destas análises no caso 1 [del(1)(p36.3-pter)] mostraram hemizigossidade de três locis em 1p36.3, com perda do alelo paterno. Nos casos 2 [dup(8)(pter)] e 3 [dup(9)(pter)] os marcadores não foram informativos para a duplicação em ambos os casos. Os polimorfismos subteloméricos dos

casos 4[del(X)(pter)], 5 [dup(3)(q29)] e 6 [dup(3)(q29)] não foram confirmados através da análise de marcadores. Nenhum dos marcadores utilizados foram informativos.

Discussão

Desde a introdução do bandeamento cromossômico, era evidente que os métodos de citogenética convencional não teriam capacidade para detectar várias das alterações cromossômicas, especialmente aquelas envolvendo a região dos telômeros. Uma das evidências foi o fato de que com o aperfeiçoamento de métodos de bandeamento, por exemplo, bandeamento em cromossomos prometafásicos, o número de pequenas deleções e duplicações detectadas aumentou consideravelmente. Por outro lado, haviam casos de síndromes de malformações bem conhecidas clinicamente nos quais o exame cromossômico não detectava a deleção esperada (ex., Síndrome de Wolf-Hirschhorn, 4p). Além disto, pequenas deleções terminais com um fenótipo relativamente não específico, eram detectadas em um contexto de alterações mais complexas, em sua maioria translocações. Um exemplo é a deleção terminal 1p. Os primeiros casos foram detectados apenas através de alterações mais complexas, mais fáceis de serem detectáveis [Blennow et al., 1996; Gray et al., 1972; Hain et al., 1980; Reisch et al., 1995; Steele et al., 1984; Yunis et al., 1981]. Apenas recentemente foi relatado uma série de pacientes com deleções *de novo* as quais foram detectadas em preparações cromossômicas de boa qualidade em um laboratório de citogenética de rotina [Shapira et al., 1997]. Um outro exemplo é a síndrome de Miller-Dieker, devido a uma deleção na região 17p13.3. Os primeiros casos (familiares) foram detectados através de translocações desbalanceadas. A partir do fenótipo clínico, algumas alterações puderam ser detectadas através da investigação específica do segmento em 17p. De outra maneira, estas alterações não eram detectadas.

Flint et al (1995) investigaram uma série de pacientes com retardo mental de causa desconhecida e um cariótipo de bandas GTG normal, utilizando o método de análise de polimorfismos por VNTR. Os autores testaram a hipótese de que rearranjos submicroscópicos subterminais levando a fenótipos não específicos, principalmente retardo mental, deveriam existir. Em um total de 99 pacientes, três deleções foram detectadas, duas das quais no cromossomo 22qter, e uma no cromossomo 13qter. Desde que estes autores testaram apenas a metade de todos os telômeros, estimaram que mais de 6% dos casos de retardo mental de causa desconhecida deveriam ser causados por alterações cromossômicas muito sutis.

Outras duas séries de pacientes foram investigados em publicações similares. Slavotenik et al (1999), examinaram 27 pacientes com marcadores microsateletados de 41 extremidades cromossômicas. Encontraram 2 alterações. Knight et al (1999) relataram os resultados de investigações em 466 crianças com retardo mental, utilizando o método de FISH com sondas subteloméricas. Os autores detectaram que anormalidades cromossômicas submicroscópicas ocorrem com uma frequência de 7,4% em crianças com retardo mental moderado a severo, e em 0,5% daquelas com retardo mental leve. As anormalidades têm uma prevalência estimada na população de 2.1 por 10.000, e foram familiares em quase metade dos casos.

Após aos achados de Flint et al (1995) e dos estudos acima citados, vários relatos de casos de pacientes com alterações subteloméricas foram publicados (Ghaffari et al., 1998; Carolina e al., 1999; Elliot et al., 1999; Joyce et al., 1999; Riegel et al., 1999). O cariótipo destes pacientes era normal, mas testes para detecção de rearranjos subterminais subteloméricos, mostraram alterações cromossômicas subteloméricas que explicavam o fenótipo destes pacientes. Além destes, um número de famílias foram

relatadas, nas quais pelo menos 2 membros eram afetados com síndromes de MCA/MR devido à transmissão desbalanceada de translocações recíprocas submicroscópicas. Estas foram detectadas através de um rastreamento em que o método de FISH com sondas teloméricas e marcadores microsateletados foram utilizados. Recentemente foi proposto que estas investigações se estendam ao genoma inteiro, utilizando-se 400 microsátélites em casos nos quais alterações subteloméricas não tenham sido encontradas. Rosenberg et al (2000) relataram 2 alterações encontradas em uma série de 11 crianças polimalformadas.

O objetivo do presente trabalho foi encontrar a incidência de rearranjos submicroscópicos subterminais em pacientes com retardo mental de origem desconhecida e que mostravam achados característicos indicativos de cromossomopatias. Isto é, padrão de achados dismórficos, malformações e retardo de crescimento.

Em uma série inicial de 105 pacientes, 41 sondas subteloméricas foram utilizadas para investigação das regiões subteloméricas. Todos os pacientes que já tinham realizado o exame de cariótipo, cujo resultado era normal, foram re-investigados. Nenhum rearranjo terminal desbalanceado foi encontrado nestas investigações, mas duas deleções intersticiais que escaparam a detecção no exame anterior foram detectadas. Os dois pacientes portadores destas alterações foram excluídos da série. Adicionalmente, uma translocação balanceada de origem materna envolvendo os cromossomos 4 e 13 foi detectada, e este paciente também foi excluído do estudo. Além disto, pacientes com uma suspeita clínica de deleções terminais, as quais não foram detectadas pelo método de bandeamento convencional, não foram selecionados para o estudo, considerando-se que nestes casos o método de FISH com sondas para os segmentos específicos poderiam ser

utilizadas. Utilizando-se esta estratégia, pelo menos duas deleções terminais foram encontradas durante o período de realização deste estudo. Uma envolvendo o braço curto do cromossomo 5 e outra o braço longo do cromossomo 18.

Existem vários pontos a serem considerados em nosso estudo. Um deles é que não foram encontradas rearranjos familiares. De fato, uma família na qual 2 pacientes afetados com o fenótipo indicativo de alteração cromossômica e cariótipo de bandas normal, foi selecionada para as investigações. Entretanto, naquele período a família não concordou em participar do estudo. Um ano depois, a esposa de um irmão clinicamente normal dos 2 irmãos afetados, gerou um outro recém nascido malformado. Nesta ocasião, uma investigação pelo método de FISH com sondas subteloméricas, detectou uma translocação balanceada entre os cromossomos 17 e 19 no irmão normal. No recém nascido bem como nos dois irmãos afetados, foi detectada uma segregação desbalanceada com duplicação terminal 19q e deleção terminal 17q. Se a família tivesse concordado anteriormente com as investigações, um diagnóstico prenatal poderia ter sido oferecido.

O segundo achado interessante é que encontramos nesta série de pacientes investigados, duas duplicações *de novo* (8pter e 9pter). As observações de que uma alta proporção de células metafásicas e interfásicas em ambos os casos mostraram 2 sinais claramente separados por um segmento não fluorescente, a confirmação do diagnóstico em fibroblastos em um dos casos, e a origem *de novo* das alterações, sugerem que o fenótipo dos pacientes tenha sido causado pelo rearranjo cromossômico e que, portanto, não estamos observando uma variação de fluorescência pela técnica empregada. É surpreendente que nenhuma destas duplicações tenha sido relatada em uma série de pacientes muito maior investigada por Knight et al. (1999). A outra duplicação envolvendo

parte da região 3q29, demonstra claramente uma variante familiar sem efeito fenotípico, uma vez que foi encontrada também na mãe e em uma irmã clinicamente normais dos dois pacientes.

O pequeno número total relativamente pequeno de casos „positivos“ que encontramos, poderia explicar-se pela estratégia de não incluir pacientes com suspeita de deleções terminais, ainda que com cariótipo normal. Consideramos que nestes casos, seria mais prático e aconselhável, aplicar testes únicos com sondas subteloméricas do que investigar todos os telômeros.

As conclusões obtidas através da investigação desta série de pacientes relatados foram:

1. O rastreamento de pacientes com retardo mental de origem desconhecida e anomalias fenotípicas, é uma maneira eficaz de detectar rearranjos subterminais submicroscópicos. Se os resultados forem comparados aos resultados de outros testes genéticos, como por exemplo, investigação cromossômica em pacientes com síndromes de Down ou Turner, investigações em casais com abortamentos de repetição, testes para Sítio Frágil e etc, os cerca de 5% de resultados anormais, não estão abaixo dos observados nesses casos, sendo especialmente alto nos casos em que há mais de um membro afetado na família. Para o aconselhamento genético e prevenção de recorrência, os casos familiares são o grupo mais importante para rastreamento com sondas subteloméricas. De fato, se o fenótipo é clássico de uma alteração cromossômica e o resultado com sondas subteloméricas for negativo, poderia-se considerar estender o estudo com marcadores do genoma inteiro (Rosenberg et al., 2000). Entretanto, considerando a quantidade de trabalho e os custos para investigar cada caso, uma seleção estrita deve ser requerida na

utilização desta estratégia, a menos que o estudo possa ser futuramente automatizado.

2. Uma avaliação clínica inicial do paciente por um geneticista experiente poderia evitar custos, já que o exame poderia ser mais específico. Por exemplo, incluir apenas com uma sonda para a região 4p16.3 se o fenótipo do paciente assemelha-se as síndromes de Wolf-Hirschhorn ou Pitt-Rogers-Danks.

3. A utilização de sondas para FISH têm a vantagem sobre os marcadores satelitados, de que detectam pequenas duplicações, mas tem a desvantagem de não fornecer informações sobre a origem parental nas alterações *de novo*.

4. Uma questão que ainda não foi respondida é se testar pacientes com retardo mental de causa desconhecida e fenótipo normal é tão eficaz quanto testar pacientes com retardo mental e anormalidades fenotípicas adicionais e/ou retardo de crescimento. Estudos adicionais, utilizando os mesmos critérios de seleção, são necessários para definir esta questão.

5. Finalmente, a questão se apresenta qual o método (FISH, marcadores VNTR ou microsateletados, ou CGH) é mais eficaz considerando os custos *versus* resultados. Nossa investigação mostra que todas as deleções podem ser detectadas pelos dois primeiros métodos mencionados, enquanto que duplicações puras (sem deleção recíproca) não podem. No momento, CGH não é um método suficientemente sensível, mas o aperfeiçoamento da técnica poderia potencialmente aumentar a sensibilidade do teste. Neste caso, CGH teria a grande vantagem de investigar o genoma inteiro e não apenas as regiões dos telômeros, e poderia ser o método de escolha.

Agradecimentos

Agradecemos aos pacientes, seus familiares e médicos pela valiosa colaboração. Este estudo teve o apoio financeiro da Fundação Nacional Suíça (No. 32-56051.98).

Referências

Blennow E, Bui TH, Wallin A, Kogner P. 1996. Monosomy 1p36.31-33(pter due to a paternal reciprocal translocation: prognostic significance of FISH analysis. 1996. *Am J Med Genet* , 65:60-67.

Carolina I, Waters JJ, Morton J, Davidson EV. 1999. Multi-subtelomeric screening: experience with clinical audit. *J Med Genet* , 36(Suppl. 1):15[SP11].

Elliot H, Kingston H, Kerr B, Gaunt L. 1999. Sub-telomeric chromosome deletions: the Manchester experiences and dilemmas. *J Med Genet*, 36(Suppl. 1):15[SP10].

Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* , 9(2):132-40.

Ghaffari SR, Boyd E, Tolmie JL, Crow YJ, Trainer AH, Connor JM. 1998. A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet* , 35(3):225-33.

Gray JE, Syrett JE, Ritchie KM, Elliot WD. 1972. An interstitial translocation: chromosome n^o 1p to 4. *Lancet* 2:92-93.

Hain D, Leverscha M, Campbell N, Daniel A, Barr PA, Rogers JG. 1980. The ascertainment and implications of an unbalanced translocation in the neonate. Familial 1:15 translocation. *Aust Paediatr*, 16:196-200.

Herens C, Jamar M, Alvarez-Gonzalez ML, Lesenfants S, Lombet J, Bonnivert J, Koulischer L, Verloes A. 1997. Private multiple congenital anomaly syndromes may result from unbalanced subtle translocations: t(2q;4p) explains the Lambotte syndrome. *Am J Med Genet* 73:127-131.

Joyce C, Hart HH, Fisher AM, Browne CE. 1999. Use of subtelomeric FISH probes to detect abnormalities in patients with idiopathic mental retardation and characterise rearrangements at the limit of cytogenetic resolution. *J Med Genet*, 36(Suppl. 1):15[SP5].

Kleefstra T, van de Zande G, Merx G, Mieloo H, Hoovers JMN, Smeets D. 2000. Identification of an unbalanced cryptic translocation between the chromosomes 8 and 13 in two sisters with mild mental retardation accompanied by mild dysmorphic features. *Eur J Hum Genet*, 8:337-340.

Knight S, Horsley S, Regan R, Lawrie NM, Maher FJ, Cardy DLN, Flint J, Kearney L. 1997. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet*, 5:1-8.

Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. 1999. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*, 13:354-81.

National Institute of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration. Ning Y, Roschke A, Smith ACM, Macha M, Precht K, Riethman H, Ledbetter DH & Flint J, Horsley SW, Regan R, Kearney L, Knight S, Svaloy K, Brown WRA. 1996. A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet* , 14:86-89.

Reisch O, Berry SA, Hirsch B. 1995. Partial monosomy of chromosome 1p36.3: characterization of the critical region and delineation of a syndrome. *Am J Med Genet* , 59:467-475.

Riegel M, Castellan C, Balmer D, Brecevic L, Schinzel A. 1999. Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformation syndromes. *Am J Med Genet*, 82:249-253.

Rosenberg M, Hui L, Ma J, Nusbaum HC, Clark K, Robinson L, Dziadzio L, Swain PM, Keith T, Hudson TJ, Biesecker LG, Flint J. 1997. Characterization of short tandem repeats from thirty-one human telomeres. *Genome Research*, 7(9):917-923.

Rosenberg MJ, Vaske D, Killoran CE, Ning Y, Wargowski D, Hudgins L, Tiftt CJ, Meck J, Blancato JK, Rosenbaum K, Pauli RM, Weber J, Biesecker LG. 2000. Detection of chromosomal aberrations by a whole-genomae microsatellite screen. *Am J Hum Genet* 66:419-427.

Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FFB, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG. 1997. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet*, 61:642-650.

Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C, Clayton-Smith J, Kingston H, Campbell RH, Flint J, Donnai D, Biesecker L. 1999. Screening for submicroscopic rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J. Med. Genet.*, 36(5):405-11.

Steele MW, Wenger SL, Geweke LO, Golden WL. 1984. The level of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PDG) activity in a patient with a 1p terminal deletion suggests that the gene locus is not distal to sub-band p36.3 on chromosome 1. *Clin Genet*, 25:59-62.

Yunis E, Quintero L, Leibovic M. 1981. Monosomy 1pter. *Hum Genet*, 56:279-282.

Table 1. Ocorrência e origem das alterações cromossômicas pelo método de FISH com sondas subteloméricas.

Caso	idade (em anos)	FISH	ocorrência	origem
1	4	46,XX,del(1)(p36.3)*	d.n.	paterna
2	4	46,XX,dup(8)(pter)	d.n.	ni
3	4	46,XX,dup(9)(pter)	d.n.	ni
4	2 1/2	46,XX,del(X)(pter)	familiar	materna
5	6	46,XX,dup(3)(q29)	familiar	materna
6	2m	46,XY,dup(3)(q29)	familiar	materna

* publicado por Riegel et al., 1999

d.n. = de novo

ni= resultados da análise dos marcadores microsatelitados não informativo

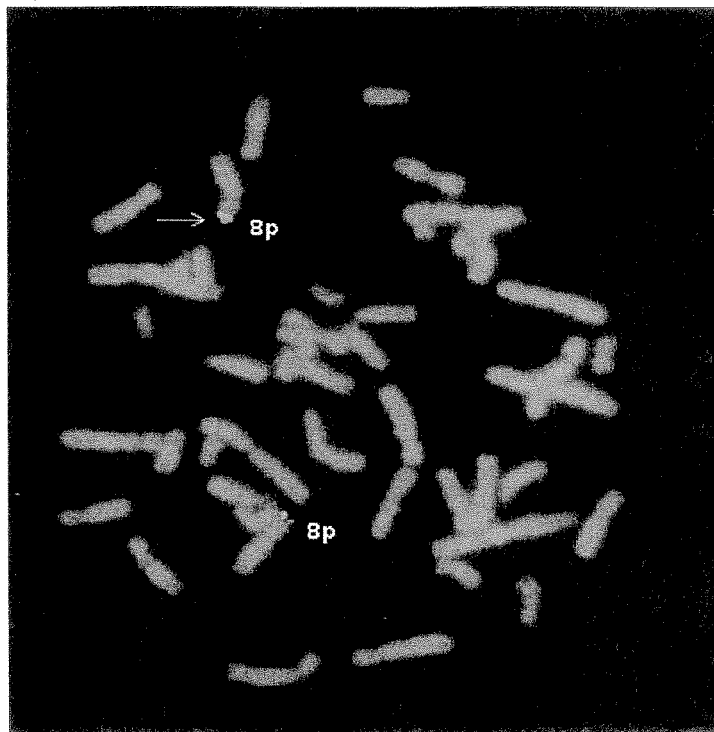


Figura 1. FISH com sonda subtelomérica 8p23.3 do caso 2. A flecha indica o sinal intenso de hibridização em um dos homólogos da paciente.

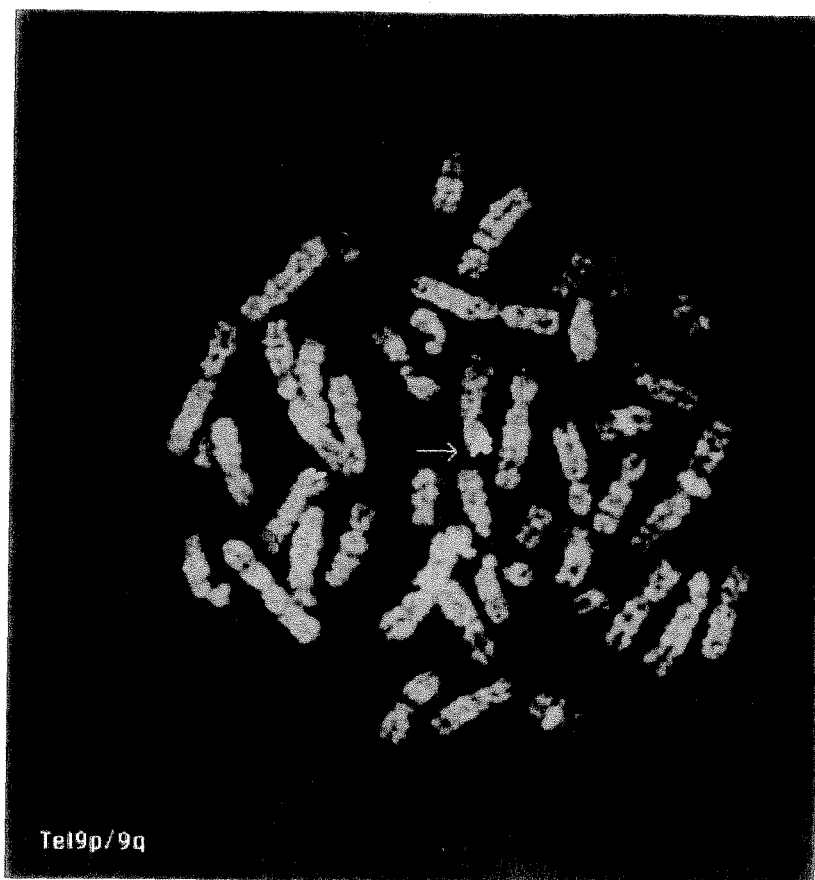


Figura 2. FISH com sondas subteloméricas 9p (verde) e 9q(vermelho) do caso 3. A flecha indica o sinal intenso de hibridização em um dos cromossomos 9 da paciente, indicando duplicação da região.

Anexo I

Consentimento Livre e Esclarecido

I - Justificativa e objetivos da pesquisa:

Você está sendo convidado a participar de um estudo que consiste em uma análise de material genético de suas células (cromossomos). Esta análise é capaz de detectar anormalidades no material genético contido nos cromossomos.

A partir desta avaliação o estudo tem como objetivo identificar alterações do material genético de pacientes afetados por doença genética, visando uma melhor compreensão desta doença para uma definição mais precisa das estratégias de tratamento e para o estabelecimento de um prognóstico.

II - Procedimentos que serão utilizados:

Para a realização desta análise necessitaremos de uma amostra de sangue venoso (10 ml), cujo procedimento não acarretará em prejuízos ao senhor (a), podendo no máximo ocorrer um pequeno hematoma no local da coleta. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins deste projeto de pesquisa.

III - Benefícios que se podem obter e procedimentos alternativos que podem ser vantajosos para os indivíduos estudados:

Os resultados deste trabalho proporcionarão o desenvolvimento de um método rápido de detecção de alterações cromossômicas. Os indivíduos participantes terão ao seu dispor um aconselhamento genético pelo qual os pacientes e familiares com alteração do seu material genético serão informados dos procedimentos a serem realizados após os resultados do exame.

Pelo presente Consentimento Informado, declaro que fui informado de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa. Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;

- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;

- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações que eu considerar privadas.

Os Pesquisadores Responsáveis por este Projeto de Pesquisa são a bióloga Mariluce Riegel (fone: 316.8423) e Dr. Roberto Giugliani, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética da (o) Hospital de Clínicas de Porto Alegre de atenção à saúde

Data: ___/___/___.

() concordo em participar do presente projeto e com o armazenamento de material genético (DNA) para posterior análise

() concordo em participar do presente projeto e não concordo com o armazenamento de material genético (DNA) para posterior análise

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário:

Nome e assinatura do Responsável Legal, quando for caso:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

ANEXO II

Outros artigos publicados (1999-2000) pela autora e colaboradores durante o período de realização do presente trabalho.

1. Riegel M, Kozlov SV, Kinteer J, Hintsch G, Cinelli P, Schinzel A, Sonderegger P. Mapping of the human gene encoding the neuronal multidomain serine protease neurotrypsin to chromosome 4q25. *Cytogenetic Cell Genet*, 84:107-108, 1999.
2. Acherman S, Largo R, Riegel M, Schinzel A. Short stature, myopia, severe developmental delay, and peculiar facial dysmorphisms in two brothers: a new syndrome? *Am J Med Genet*, 86:486-491, 1999.
3. Riegel M, Baumer A, Wisser J, Acherman J, Schinzel A. Prenatal diagnosis of mosaicism for a del(22)(q13). *Prenat Diagn*, 20:76-79, 2000.
4. Rothlisberger B, Chrzanowska K, Balmer D, Riegel M, Schinzel A. A supernumerary marker chromosome originating from two different regions of chromosome 18. *J Med Genet*, 37:121-124, 2000.
5. Kotzot D, Martinez M, Bagci G, Basaran S, Baumer A, Binkert F, Brecevic L, Castellan C, Chrzanowska K, Luleci G, Miny P, Riegel M, Schuffernhauer S, Seidel H, Schinzel A. Parental origin and mechanisms of formation of cytogenetically recognisable de novo direct and inverted duplications. *J Med Genet*, 37(4):281-286, 2000.

6. Blau N, Cherer-Oppliger T, Baumer A, Riegel M, Matasovic A, Schinzel A, Jaeken J, Thony B. Isolated central form of tetrahydrobiopterin deficiency associated with hemizygoty on chromosome 11q and a mutant allele of PTPS. *Human Mutation* 16:54-60, 2000.
7. Moreira LMA & Riegel M. Two sibs with duplication of 4q31-qter due to 3;1 meiotic disjunction and mild phenotype. *Genetic Counseling*, 11(3): 249-259, 2000.
8. Zimmermann-Bar U, Stallmach T, Riegel M, Wiedmann U, Fauchere J-C, Binkert F, Kotzot D. Wolf-Hirschhorn syndrome due to a 3:1 segregation of a maternal balanced t(4;150(p16.3;q11) translocation. *Prenatal Diagnosis*, 20: 847-850, 2000.
9. Riegel M, Baumer A, Piram A, Ortolan D, Peres LC, Pina-Neto JM. De novo unbalanced t(11q;21q) leading a partial monosomy 21pter-q22.2 and 11q24-qter in a patient initially diagnosed as monosomy. *in press Genetic Counseling*, 2000.
10. Fokstuen S, Vrticka K, Riegel M, Silva Vinzent, Baumer A, Schinzel A. Velofacial hypoplasia (Sedlackova syndrome) - a variant of velocardiofacial (Shprintzen) syndrome and part of the phenotypical spectrum of del 22q11.2. *in press Eur J of Ped*, 2000.