

**Título:** Deleção na região do Síndrome de Wolf-Hirschhorn: do genótipo ao fenótipo

**Modalidade:** Artigo Científico

**Área:** Biomedicina – Citogenética e Genómica

**Filiação:** Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Aluna:** Mariana Carvalho Barreto

**Tutor:** Professora Doutora Isabel Maria Marques Carreira

**Co-tutor:** Professora Doutora Maria Joana Lima Barbosa de Melo

## **Abreviaturas**

ADPM – atraso de desenvolvimento psicomotor

AE – aborto espontâneo

ArrayCGH - *Array Comparative Genomic Hybridization*

DC – défice cognitivo

DNA – *desoxirribonucleic acid*

EEG - electroencefalograma

FISH – *Fluorescence In Situ Hybridization*

FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

IMG – interrupção médica da gravidez

LCG-FMUC - Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

MLPA - *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*

RCIU – restrição de crescimento intra-uterino

SNC- sistema nervoso central

TN – translucência da nuca

WHS – *Wolf-Hirschhorn syndrome*

WHSCR – *Wolf-Hirschhorn syndrome critical region*

## Resumo

**Introdução:** O Síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS) é caracterizado geneticamente por uma deleção terminal 4p16.3. A variabilidade clínica é atribuída ao tamanho das deleções e conseqüentemente aos genes envolvidos. Foram identificadas duas regiões críticas, a WHSCR1 e a WHSCR2. A deleção destas regiões é critério necessário para confirmar a existência do síndrome. O risco de recorrência familiar depende do mecanismo que originou a deleção. O cariótipo, FISH, MLPA e array-CGH são as ferramentas de análise utilizadas, sendo a última considerada de 1ª linha. Os objetivos deste estudo foram comparar a capacidade de diagnóstico destas técnicas, discutir a relação genótipo-fenótipo em 6 casos e avaliar a implicação do perfil genómico para o doente e para a família.

### **Material e métodos:**

**Material:** Foram selecionados 6 casos enviados ao Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC com deleções em 4p16.3 que incluem a região do WHS (3 em diagnóstico pré-natal e 3 seguidos na consulta de Genética do Hospital Pediátrico);

**Métodos:** Cariótipos (casos 1-4 e 6), FISH (casos 1-4 e 6), MLPA (casos 2,3 e 5) e array-CGH (2-6). As técnicas foram utilizadas consoante as especificidades dos casos em estudo. Os progenitores dos 6 casos foram igualmente estudados.

**Resultados:** A anomalia cromossómica do caso 1 foi detetada pelo cariótipo. Nos restantes casos o cariótipo foi normal. A deleção variou em tamanho de 0,28 Mb (caso 5) a maior que 5-10 Mb (caso 1). Não se observou nenhum gene comum aos 6

casos. A deleção envolveu as regiões críticas do WHS nos casos 1,2,3 e 6. Nos casos 1,3 a 6 a deleção é *de novo*, no caso 2 foi identificada uma t(4;7) de origem paterna. Nos casos 4 e 5 a deleção identificada é semelhante num dos progenitores.

**Discussão:** Os casos 4 e 5, apesar de possuírem algumas características fenotípicas deste síndrome, não possuem deleção de WHSCR1 ou WHSCR2, conseqüentemente não se pode considerar geneticamente estes casos como verdadeiros Wolf-Hirschhorn. A discussão focou-se nos genes que demonstraram ser responsáveis pelo fenótipo do WHS, não estando alguns localizados nas regiões críticas para este síndrome.

**Conclusão:** Os estudos de citogenética e genómica devem ser complementares na procura de um diagnóstico. Em casos com suspeita de Síndrome de Wolf-Hirschhorn o estudo não deve ser dirigido apenas para a pesquisa das regiões críticas. A interpretação da relação entre o genótipo e o fenótipo e do mecanismo que causa a deleção é importante para o aconselhamento genético.

## Abstract

**Background:** The Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) is a genetic disorder caused by the loss of genomic material of 4p16.3. The broad range of clinical manifestations of WHS can be attributed to the variability in 4p deletions' mechanism and genomic content. WHSCR1 and WHSCR2 have been described as critical regions for the syndrome and deletions in these regions are considered the molecular hallmark of WHS. Risks to family members depend on the mechanism of origin of the deletion. Conventional cytogenetic techniques, FISH, MLPA and array-CGH are the tools for WHS diagnosis being array-CGH the first-tier diagnostic test. The goals of this study were to compare the diagnosis capability of these techniques and to discuss the genotype-phenotype correlation of 6 cases. The study also focused on the implication of the genomic profile to the patient and his family.

### **Materials and Methods:**

Materials: 6 cases sent to the Laboratory of Cytogenetic and Genomics of FMUC with deletions in region 4p16.3, which comprises the WHS region (3 from prenatal testing and 3 followed in the genetics consultation of the Pediatrics Hospital);

Methods: Conventional karyotyping (cases 1-4 and 6), FISH (cases 1-4 and 6), MLPA (cases 2,3 and 5) and array-CGH (cases 2-6) used according to the specificities of each case. All the parents were also studied.

**Results:** The cytogenetic abnormality of case 1 was detected directly by conventional karyotyping. In the other cases the karyotype was normal. Deletion ranged in size from 0.28 Mb (case 5) to over 5-10 Mb (case 1). There was no gene in common for all cases. The deletion only included the critical regions in cases 1, 2, 3 and 6. The deletion was *de novo* in 1, 3 and 6 and in case 2 was identified a t(4;7) from paternal inheritance. In cases 4 and 5, the deletion was the same in one of the parents.

**Discussion:** The deletion in cases 4 and 5, despite having some characteristics in common with WHS, did not include the WHSCR1 or WHSCR2, there for these cases can not be classified as true Wolf-Hirschhorn. The discussion then focused on the genes that were associated in part with the Wolf-Hirschhorn syndrome, not necessarily located in the critical regions.

**Conclusion:** A combined diagnostic approach based on cytogenetics and genomics should be applied. The diagnosis of this syndrome should not be only based on the study of the critical regions. Understanding the genotype-phenotype correlation and the mechanism of origin of the deletion is very important to provide an efficient genetic counseling.

## **Palavras-chave/Keywords**

ArrayCGH

Citogenética convencional

Deleção 4p16.3

FISH

MLPA

Síndrome de Wolf-Hirschhorn

## **Introdução**

O síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS) é caracterizado por uma deleção terminal no braço curto do cromossoma 4 (4p16.3). A incidência do WHS ao nascimento é de 1:50 000 à razão de 2 meninos:1 menina.<sup>1</sup>

Este síndrome encontra-se associado a um conjunto de características fenotípicas bastante amplo (Tabela 1). O prognóstico destes casos está relacionado com o grau de severidade fenotípica.<sup>2</sup>

**Tabela 1** – Características fenotípicas do Síndrome de Wolf-Hirschhorn (adaptado de Battaglia A *et al*, 2002)<sup>1</sup>

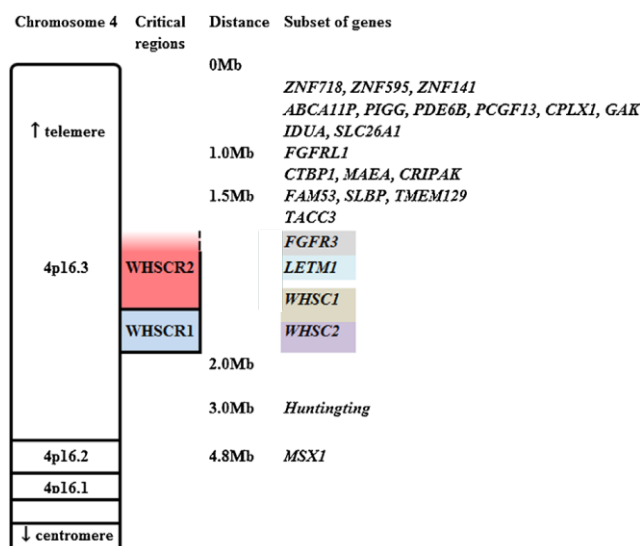
<b>Síndrome de Wolf-Hirschhorn</b>
<b>Atraso do neurodesenvolvimento (défice cognitivo)</b>
<b>Restrição de crescimento intrauterino e atraso de crescimento</b>
<b>Convulsões epiléticas e/ou anomalias do Sistema Nervoso Central</b>
<b>Fácies em capacete grego:</b> testa larga, vértice do nariz alto, glabella proeminente, sobranceiras arqueadas, micrognatia, hipertelorismo, olhos proeminentes, filtro curto, concavidade da boca para baixo
<b>Dificuldades de alimentação</b>
<b>Fenda palatina e lábio leporino</b>
<b>Anomalias orgânicas (cardíacas, renais, gastrointestinais, visão)</b>
<b>Infeções de repetição</b>

A grande variabilidade clínica pode ser atribuída ao tamanho das deleções e aos genes nela envolvidos<sup>3</sup>, ou ainda estar relacionada com as diferenças alélicas ou heranças multifatoriais.<sup>4,5-7</sup>

Na região 4p16.3 foram identificadas duas regiões críticas para o WHS situadas aproximadamente a 1,8 e 2 Mb da porção terminal do 4p.<sup>3</sup> (Figura 1). A região crítica mais proximal, designada por WHSCR1 tem 165 kb de tamanho e inclui o gene *WHSC2* e a porção terminal 3' do gene *WHSC1*. A região WHSCR2 foi posteriormente identificada, inclui o gene *LETM1* e a porção terminal 5' do gene *WHSC1* não tendo



ainda um limite distal bem definido.<sup>8</sup> A existência de deleção nestas regiões é considerada como o critério determinante para classificar um caso como tendo Síndrome de Wolf-Hirschhorn.<sup>9</sup>



**Figura 1** – Apresentação esquemática do mapa de genes da região terminal de 4p e das regiões críticas de WHS (WHSCR1 e WHSCR1) (esquema adaptado de Okamoto et al, 2013)<sup>8</sup>

Em aproximadamente 50-60% dos casos, o WHS é causado por deleções intersticiais ou terminais *de novo* na região 4p16, sendo que os derivativos desequilibrados a partir de translocações são responsáveis por cerca de 45%. Estas últimas podem ser *de novo* ou herdadas de um rearranjo equilibrado familiar (~15%). Em 1% dos casos foram identificados casos com alterações citogenéticas mais complexas tais como cromossoma 4 em anel, mosaicismo com deleção 4p ou um rearranjo com duplicação/deleção resultante de uma recombinação por inversão do cromossoma 4.<sup>6,10</sup> O risco de uma família ter novamente um filho com esta

cromossomopatia depende do mecanismo que originou a deleção, sendo esta informação relevante na oferta de diagnóstico pré-natal ao casal.<sup>1</sup>

As ferramentas de análise mais utilizadas são a análise do cariótipo, a pesquisa de regiões específicas por FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) ou pelo MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*). Nos últimos anos a avaliação por *Array Comparative Genomic Hybridization* (array-CGH) tem sido a tecnologia de diagnóstico de 1ª linha.<sup>11</sup>

O cariótipo de alta resolução identifica anomalias cromossômicas estruturais entre 5-10 Mb detetando cerca de 50-60% das deleções do WHS.<sup>4</sup> Nos casos em que o tamanho da deleção é inferior à capacidade de resolução do cariótipo, recorre-se ao FISH ou MLPA.<sup>12</sup>

O FISH é um teste dirigido<sup>13</sup> e deteta mais de 95% das deleções<sup>4</sup>, tem uma resolução até 150 kb e é um ótimo método para detecção de microarranjos.

O MLPA é uma análise semi-quantitativa, dirigida, rápida, que permite a identificação de rearranjos submicroscópicos (~100 pb) desequilibrados com uma boa relação custo-benefício.

O array-CGH deteta todas as deleções da região crítica do Síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHSCR).<sup>9</sup> Corresponde a um cariótipo molecular que permite a análise de todo o genoma com alta resolução para regiões específicas, como a do WHSCR, tendo como vantagens o facto de estudar todo o genoma num único teste laboratorial, não necessitar de células em divisão e de utilizar pequenas quantidades de DNA. Contudo

esta tecnologia não deteta alterações equilibradas<sup>13</sup> e o processo de validação é complexo.<sup>14</sup>

A maioria dos casos com diagnóstico pré-natal WHS está associada a grandes deleções 4p passíveis de serem identificadas por técnicas de citogenética convencional. O uso de técnicas de array-CGH aumentou a percentagem de deteção de cromossomopatias submicroscópicas.

Este trabalho tem como objetivos correlacionar a capacidade de diagnóstico de quatro técnicas (cariótipo, FISH, MLPA e ainda array-CGH) e caracterizar a nível citogenómico as alterações na região crítica do WHS em seis casos. Pretende-se ainda discutir a relação genótipo-fenótipo dos doentes e a implicação para o doente, para a família e gerações futuras da caracterização do seu perfil genómico.

## **Materiais e Métodos**

### Materiais

Foram selecionados 6 casos enviados ao Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC) em que foram identificadas deleções no braço curto do cromossoma 4 na região 4p16.3 que abrange em termos citogenéticos a região do WHS.

Os casos 1 a 3 referem-se a casos de diagnóstico pré-natal provenientes da Maternidade Bissaya Barreto. Os casos 4 a 6 são casos acompanhados no serviço de Genética Médica do Hospital Pediátrico Carmona da Mota. Foram estudados todos os progenitores, não havendo histórias de consanguinidade.

O caso 1 refere-se a um líquido amniótico solicitado por idade materna avançada e por antecedentes pessoais do casal de dois abortos espontâneos, não havendo dados ecográficos sobre o feto.

No caso 2 trata-se de um feto com 19 semanas de gestação com higroma cervical quístico à ecografia. O casal tinha antecedentes de 2 abortos espontâneos. O progenitor referiu o falecimento de uma irmã à nascença e que a sua mãe teria tido um aborto espontâneo e infertilidade, por motivo que desconhecia. O cariótipo do feto foi normal. Por agravamento do higroma quístico o casal solicitou a interrupção médica da gravidez (IMG).

O caso 3 diz respeito a uma IMG num feto com 19 semanas por identificação ecográfica de oligoâmnios e rins displásicos. Perante estes achados, conjuntamente com

a observação do feto após expulsão, foi feita uma colheita de pele do feto e solicitado o estudo das regiões subteloméricas por MLPA.

O caso 4 refere-se a uma menina com 10 anos com défice cognitivo sem nenhum dismorfismo, com um fácies semelhante ao da mãe. Era conhecido que a irmã de 4 anos tinha também um défice cognitivo.

O caso 5 era seguido nas consultas de Cardiologia e Pedopsiquiatria tendo sido enviado para a consulta de Genética por suspeita de Síndrome de Marfan. O jovem de 17 anos apresentava semelhanças faciais com o pai.

O caso 6 é um menino de 4 anos que foi encaminhado para a consulta de Genética por atraso global do desenvolvimento psicomotor e má progressão estato-ponderal.

As informações referentes à história clínica de cada caso, bem como fotos dos casos 1 e 2, foram gentilmente cedidas pelo serviço de Genética Médica do Hospital Pediátrico Carmona da Mota e utilizadas com a autorização do mesmo.

A tabela 2 pretende ser uma descrição clínica dos 6 casos estudados.

**Tabela 2.** Comparação das características clínicas observadas no WHS<sup>1</sup> e apresentação clínica dos casos 1 a 6.

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6
<b>Sexo</b>	F	M	M	F	M	M
<b>I/IG<sup>1</sup></b>	16s+3d	11s+2d	18s	10 anos	17 anos	4 anos
<b>Motivo para DPN</b>	Idade materna avançada (40 anos)	TN>p95 e onfolocelo	TN>p95, oligoâmnios, rins displásicos	NA	NA	NA
<b>IG no parto</b>	IMG às 19s	IMG às 16s	IMG às 19s	39s	38s	35s
<b>Tipo de parto</b>				eutócito	eutócito	cesariana
<b>Antropometria ao nascimento</b>	NA	NA	NA	P:p75;C:p75-90;PC:p50	P:p90;C:p50;PC:p75	P:p10;C:p10;P C:10
<b>Percentis</b>	NA	NA	NA	Aos 9 anos:P:p75-90;E:p75;PC:p75	Aos 11 anos: P:p90-95;E:p>95; PC:p50-75	Aos 15 e 18 meses: P,C,PC:p>5
<b>Antecedentes familiares</b>	Progenitora com antecedentes de 4G/1P (2AE)	Progenitora com antecedentes de 3G/1P (2AE)	Progenitora com antecedentes de 10G/1P (6AE, 1AP)	Irmão de 10 anos: normal Irmã de 4 anos: DC	Pai com dificuldade de linguagem	
<b>Neurodesenvolvimento</b>	NA	NA	NA	Dificuldades de aprendizagem no 1º ano de escolaridade, déficit cognitivo: escala WISC III	Marcha e fala aos 24 meses. Grande dificuldade na fala. Dificuldades de aprendizagem	ADPM global

<b>Fácies em capacete grego</b>						
<b>Glabela proeminente</b>	√	√	X	X	X	√
<b>Hipertelorismo ocular<sup>2</sup></b>	√	√	X	X	X	X
<b>Olhos com epicanto</b>	X	X	X	X	X	√
<b>Micrognatia</b>	√	√	X	X	X	√
<b>Orelhas anômalas<sup>3</sup></b>	X	√	√	X	√	√
<b>Assimetrias crânio-faciais</b>	√	X	X	X	√	X
<b>Microcefalia</b>	X	X	X	X	X	√
<b>RCIU/atraso de crescimento pós-natal</b>	√	√	√	X	X	√
<b>Hipotonia/déf. muscular</b>	NA	NA	NA	X	X	√
<b>Convulsões e anomalias EEG</b>	NA	NA	NA	X	Suspeita de epilepsia nunca comprovada (aos 2 anos)	X
<b>Dificuldades de alimentação</b>	NA	NA	NA	X	X	√
<b>Anomalias esqueléticas</b>	√	√	√	X	√	√

Anomalias cardíacas	X	√	X	X	√	√
Anomalias da visão	NA	NA	NA	√	X	√
Lábio leporino/Fenda palatina	X	√	X	X	X	X
Anomalias anatomia gênito-urinária	√	√	√	X	X	X
Outras malformações orgânicas <sup>4</sup>	√	√	√	X	X	X
Outros	X	Higroma cervical e dorsal	Higroma quístico cervical	X	Hábito Marfanóide	X

Os dados morfológicos dos casos 1-3 foram obtidos do estudo anátomo-patológico dos fetos;

**1**- idade no momento da colheita da amostra; **2**-distância entre os cantos internos dos olhos (variável consoante a idade gestacional); **3**- orelhas grandes ou de implantação baixa; **4**-anomalias estruturais do sistema nervoso central, anomalias do esófago, estômago, fígado, vesícula biliar, pâncreas, pulmões e aorta, **ADPM** – Atraso de desenvolvimento psicomotor, **AE** – aborto espontâneo, **AP** – aborto provocado, **C** – comprimento, **DC** – déficit cognitivo, **E** – estatura, **F** – feminino, **I** – Idade, **IG** – idade gestacional, **P** – peso, **M** – masculino, **PC** – perímetro cefálico; √ - característica presente, X – característica ausente



## Métodos

**Cariótipo** – As metafases foram obtidas a partir de culturas sincronizadas de linfócitos de sangue periférico, a partir de culturas de células de biópsia do trofoblasto, biópsia de pele ou de líquido amniótico seguindo os procedimentos de rotina do LCG-FMUC.<sup>16</sup> Os cromossomas com bandas CTG foram examinados com um nível de resolução de 550 a 700 bandas.<sup>17</sup> Em cada doente foram examinadas 10 a 15 metafases.

**FISH** – Em metafases obtidas para o estudo do cariótipo e segundo os protocolos de rotina<sup>16</sup>, foram aplicadas sondas para a região subtelomérica 4p (D4S3359, Totalvision) e para a região crítica do WHS (*WHSC1*, Poseidon, Kreatech – posições nucleotídicas: 1,952,799-1,983,934). No caso 2, por estarem envolvidas alterações dos cromossomas 4 e 7 devido a translocação paterna, foram ainda utilizadas as sondas VIJyRM2185 (Vysis, Abbott Molecular – posições nucleotídicas: 93,166-162,450) para a região 7p22.3 e sonda controlo VIJyRM2000 (Vysis, Abbott Molecular) para 7q36.3.

**MLPA** – Nos casos 3 e 4 foi realizada a análise semiquantitativa com sondas para as regiões subteloméricas presentes nos painéis de sondas P036-E1 e P070-B1 (MRC-Holland). No caso 5 o kit de MLPA utilizado foi o painel com sondas intersticiais para a região 4p16.3 (P373-A1 - MRC-Holland). Os procedimentos foram feitos segundo as instruções do fabricante.

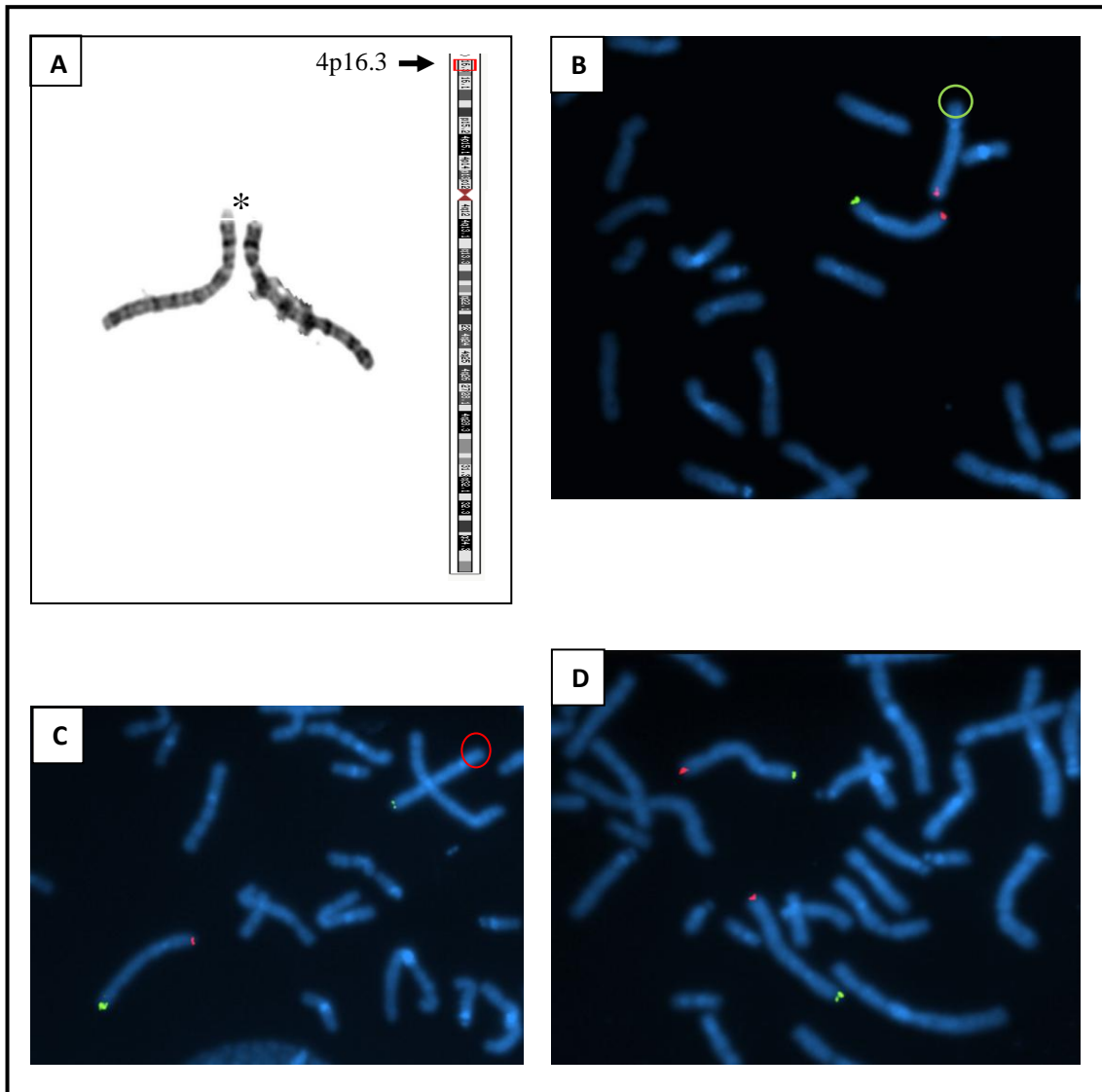
**Array-CGH** – com formato Agilent 60mer oligonucleotide-array, configuração 4x180K (resolução média ~ 60 Kb). Construção do genoma: Human genome 19, GRCh37; Software de análise: Agilent Genomic Workbench Lite Edition 6.0; Controlo: hibridização em *loop* com outros dois doentes do mesmo sexo.

## Resultados

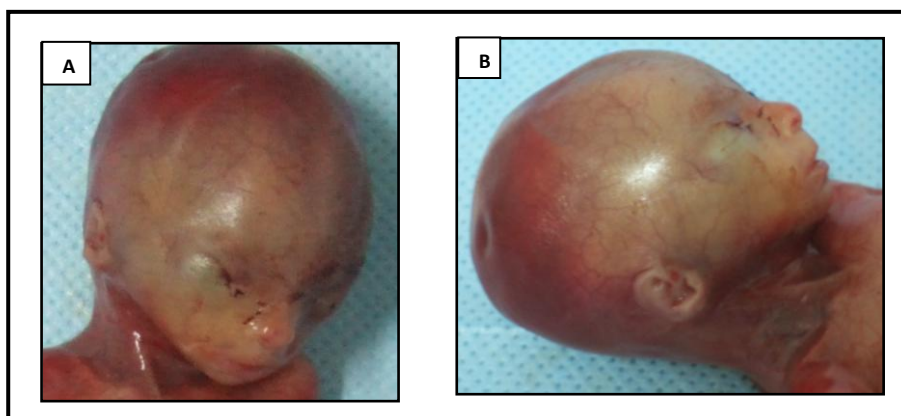
### Caso 1

A cultura de células do líquido amniótico revelou um cariótipo com deleção terminal 4p confirmada (Figura 2-A) por FISH com sondas para a região subtelomérica do braço curto do cromossoma 4 e sondas para a região crítica do WHS (Figura 2- B e C). O estudo do cariótipo e análise por FISH dos progenitores utilizando a sonda 4p(D4S3359) revelou a integridade da região 4p16.3, concluindo-se que a deleção no feto era *de novo* (Figura 2-D). O cariótipo final do feto foi 46,XX,del(4)(p16.1).ish del(4)(p16.3)(WHSC1-,D4S3359-).

Após ser informado do resultado, o casal optou pela IMG realizada às 19 semanas. A análise do feto após expulsão detetou restrição do crescimento, o que confirmou a restrição de crescimento intra-uterino (RCIU), bem como um quadro polimalformativo (Figura 3- A e B). Não foi possível caracterizar a deleção por array-CGH por não haver amostra suficiente do feto.



**Figura 2** – Resultados obtidos pelas técnicas de citogenética convencional e FISH do caso 1: **A**- ideograma do cromossoma 4 em comparação com par do cromossoma 4 com a deleção terminal em 4p16.3 (\*); **B**- Imagem de FISH com deleção da região 4pter identificada através da sonda para o locus **D4S3359** (círculo verde); **C** – Imagem de FISH com deleção da região crítica WHS identificada através da sonda para o locus **WHSC1** (círculo vermelho); **D** – Imagem de FISH representativa da integridade das regiões subteloômicas do cromossoma 4 dos progenitores.

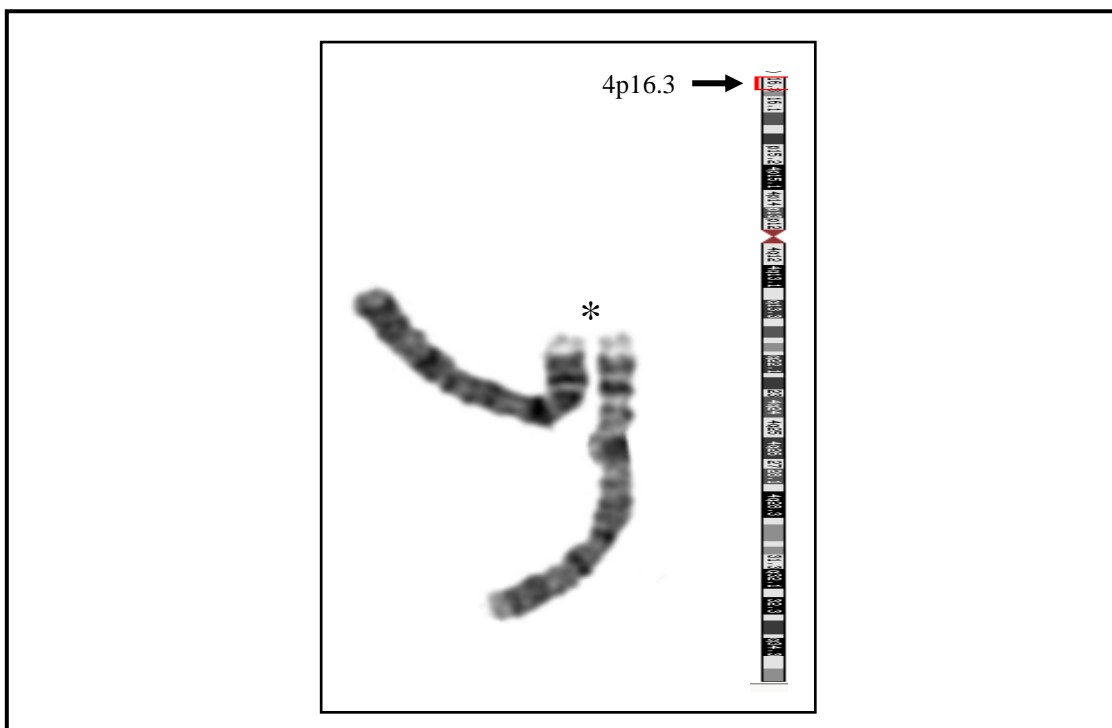


**Figura 3 – Caso 1.** Fotos tiradas da autópsia do feto (IMG às 19 semanas) com características do fácies em capacete grego (testa larga, glabella proeminente, hipertelorismo, micrognatia)

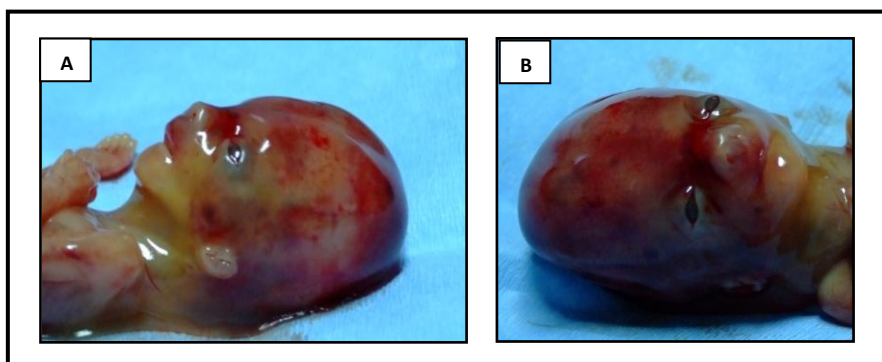
## Caso 2

Feto com higroma cervical identificado na ecografia do 1º trimestre com resultado de cariótipo pré-natal normal (Figura 4). O higroma sofreu um agravamento e o casal solicitou a IMG às 16 semanas. Foi feita uma autópsia e descrito um crescimento inferior ao esperado para a idade gestacional e um conjunto de malformações associadas ao higroma quístico (Figura 5- A e B). O DNA do feto foi analisado por array-CGH tendo sido detetada uma deleção de 3,8 Mb na região de 4p16.3 e uma duplicação em 7p22.3 (Figura 6- A1,A2 e B1,B2). Ambos os resultados foram confirmados por FISH (Figura 7- A e B). O estudo por FISH da progenitora revelou um resultado normal (ish 4p16.3(WHSC1x2)). O FISH no progenitor masculino revelou a presença de uma translocação recíproca críptica entre as regiões subteloméricas dos cromossomas 4(p16.3) e 7(p22.3) (Figura 7- C e D). O feto herdou,

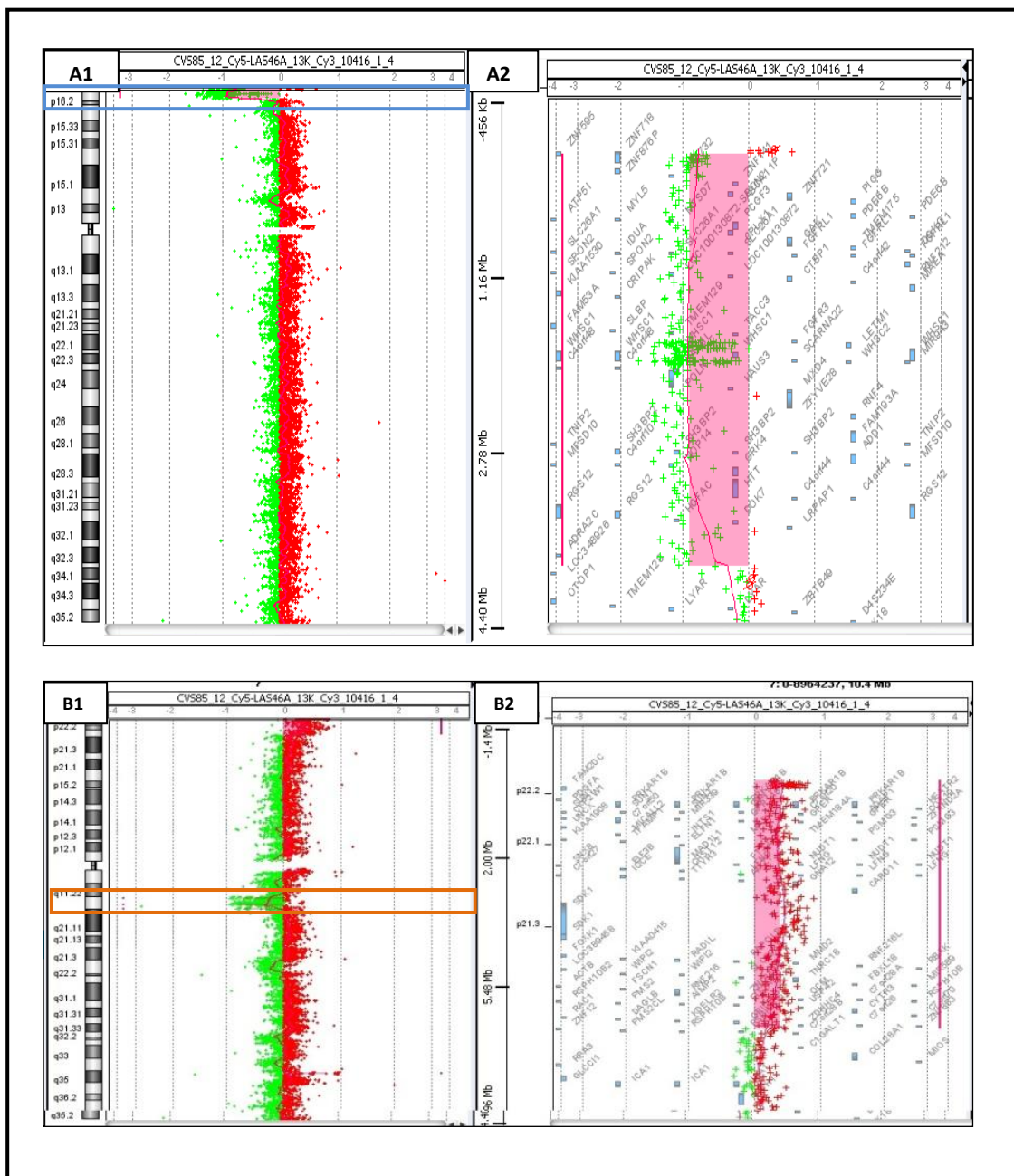
por segregação adjacente na gametogênese paterna, um cromossoma 4 derivativo com monossomia da região terminal do 4p16.3 e trissomia da região terminal 7p22.3p22.1, sendo o seu cariótipo molecular  $\text{arr}[\text{hg}19] \text{4p16.3}(71,522-3,872,380)\times 1,7\text{p}22.3\text{p}22.1(13,420-6,737,261)\times 3$ . A deleção do cromossoma 4 envolvia 67 genes (7 genes reportados no OMIM Genetic Morbid Map) (Tabela 3).



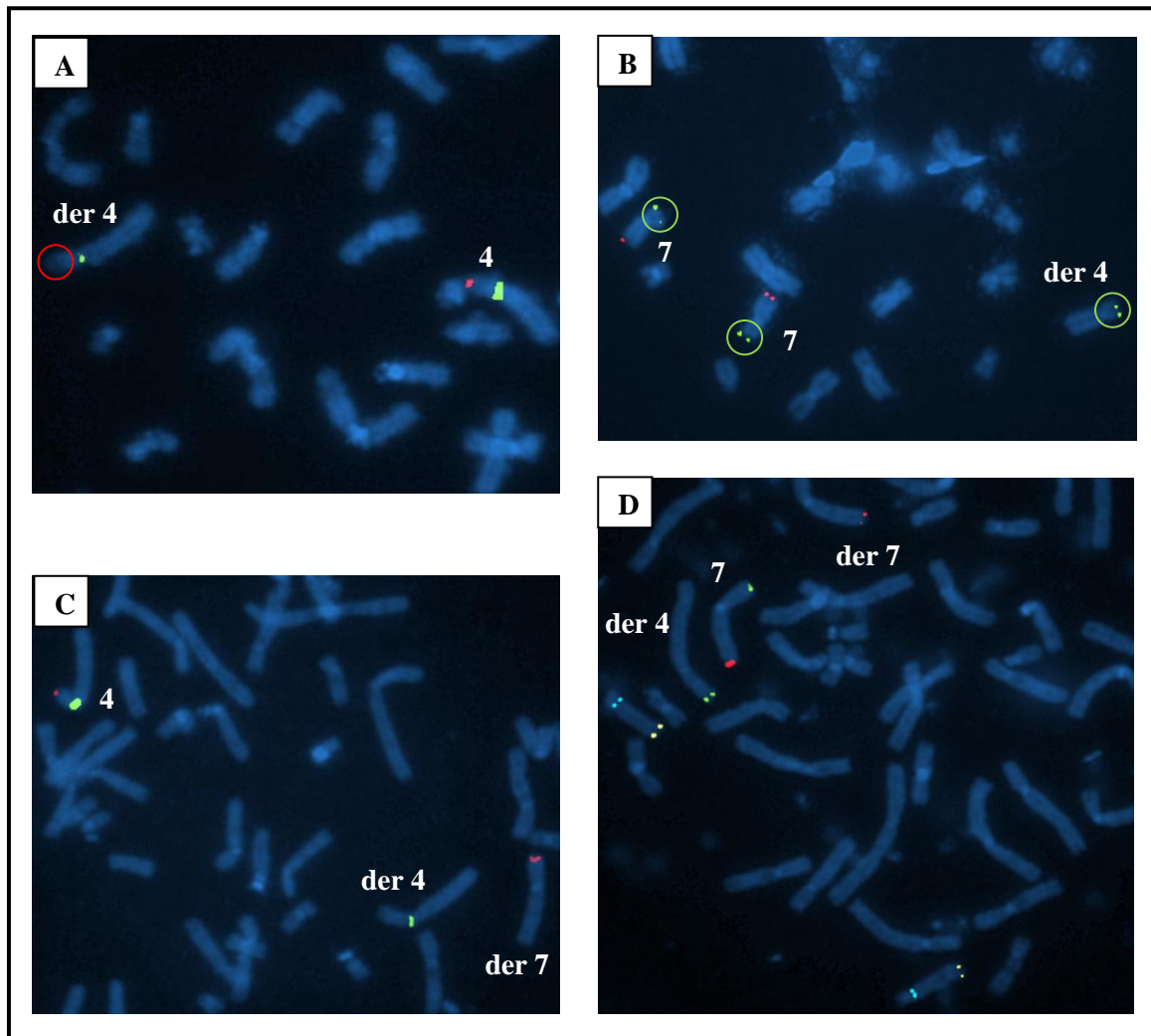
**Figura 4** - ideograma do cromossoma 4 identificando a região do WHS em comparação com par do cromossoma 4 aparentemente sem a deleção terminal em 4p16.3, por citogenética convencional (\*)



**Figura 5** – Caso 2 (IMG às 16 semanas): Feto com características do fácies em capacete grego (testa larga, hipertelorismo, concavidade da boca para baixo e micrognatia)



**Figura 6 – Resultados do caso 2 obtidos por array-CGH: A1 – perfil de array-CGH para o cromossoma 4 com a região deletada assinalada a azul; A2 – conteúdo génico da deleção; B1 – perfil de array-CGH para o cromossoma 7 demonstrando a trissomia da região do cromossoma 7 a cor-de-laranja; B2 – conteúdo génico da trissomia.**



**Figura 7 – Resultados obtidos por FISH (caso 2)**

Legenda: **A**- Deleção da região crítica WHS identificada através da sonda para o locus **WHSC1** (círculo vermelho); **B** – FISH demonstrando a trissomia 7p22.3 identificada através da sonda para o locus **VIJyRM2185** (círculos verdes); **C** e **D** – Imagens de FISH da amostra do progenitor revelando a presença de uma translocação recíproca entre as regiões 4p16.3 e 7q22.3, respectivamente através das sondas para os loci **WHSC1** (**C**) e **VIJyRM2185** (**D**)



### Caso 3

IMG de feto com 19 semanas após a identificação de anomalias durante a ecografia, apesar de o cariótipo ter sido normal. A autópsia revelou um feto com RCIU e várias malformações. O casal tinha também antecedentes de uma IMG por feto com trissomia 21, bem como 6 abortos espontâneos. Foi feita a colheita de uma amostra de pele durante a autópsia para a pesquisa das regiões subteloméricas. A análise por MLPA revelou uma deleção na região 4p16.3 (figura 8- A e B). Este resultado foi confirmado por FISH com sondas específicas para a região subtelomérica 4p (D4S3359, Totalvision) e para a região do WHS (*WHSC1*), abrangendo a região crítica deste síndrome. Ambos os progenitores foram estudados por FISH com sondas para a mesma região, tendo o resultado de ambos sido normal, ish 4p16.3(WHSC1x2), indicando que a anomalia do feto era *de novo*. O resultado do array-CGH confirmou uma deleção de 3,6 Mb englobando 65 genes (7 genes reportados no OMIM Genetic Morbid Map): arr4p16.3(72,447-3,673,709)x1. (Tabela 3).

A	Gene	Chr pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Ratio
	TNFRSF4 probe 2269-L01761	01p	130	01-001.1 TNFRSF4	1	Normal (1)
	KIAA1720 probe 2392-L02149	01q	306	01-247.1 KIAA1720	2	Normal (1.03)
	ACP1 probe 2274-L08758	02p	137	02-000.3 ACP1	3	Normal (1)
	CAPN10 probe 1742-L01308	02q	314	02-241.3 CAPN10	4	Normal (0.96)
	CHL1 probe 1721-L01329	03p	144	03-000.3 CHL1	5	Normal (1.07)
	BDH probe 2013-L02052	3q	322	03-198.8 BDH	6	Normal (0.96)
	FLJ20265 probe 2005-L02047	04p	151	04-000.5 FLJ20265	7	LOH (0.53)
	TRIML2 probe 7046-L06655	4q	330	04-189.3 TRIML2	8	Normal (1.11)
	PDCD6 probe 1723-L01327	05p	158	05-000.4 PDCD6	9	Normal (0.99)
	GNB2L1 probe 3319-L02737	05q	338	05-180.6 GNB2L1	10	Normal (0.99)
	IRF4 probe 1724-L02048	06p	165	06-000.3 IRF4	11	Normal (0.99)
	PSMB1 probe 1746-L01304	06q	346	06-170.8 PSMB1	12	Normal (0.97)

B	Gene	Chr pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Ratio
	TNFRSF18 probe 2270-L1762	01p36.3	306	01-001.0 TNFRSF18	1	Normal (0.94)
	SH3BP5L probe 4084-L3605	01q44	132	01-247.1 SH3BP5L	2	Normal (1.1)
	ACP1 probe 2709-L2856	02p25	315	02-000.3 ACP1	3	Normal (1)
	ATG4B probe 2781-L3168	02q37.2	139	02-236.3 ATG4B	4	Normal (1.06)
	CHL1 probe 2896-L2363	03p26.1	323	03-000.3 CHL1	5	Normal (0.99)
	KIAA0226 probe 2690-L2842	03q29	145	03-198.8 KIAA0226	6	Normal (1.03)
	PIGG probe 14440-L16146	04p16.3	329	04-000.5 PIGG	7	LOH (0.54)
	FRG1 probe 2691-L2843	04q35	152	04-191.1 FRG1	8	Normal (0.84)
	LOC133957 probe 2791-L2233	05p15.33	337	05-000.3 LOC133957	9	Normal (0.97)
	GNB2L1 probe 2790-L2232	05q35.3	160	05-180.6 GNB2L1	10	Normal (0.97)
	IRF4 probe 4077-L3462	06p25-p23	346	06-000.3 IRF4	11	Normal (0.97)
	TBP probe 2694-L2844	06q27	166	06-170.7 TBP	12	Normal (1.08)

**Figura 8 – Resultados do caso 4 obtidos pela técnica de MLPA: A** –deleção pelo painel de sondas P036-B1 para o gene *FLJ20265* localizado em 4p16.3; **B** –deleção pelo painel de sondas P070-B1 para o gene *PIGG* localizado em 4p16.3.

#### Caso 4

Menina de 10 anos de idade com déficit cognitivo (DC) e dificuldades de aprendizagem, com cariótipo realizado que obteve um resultado normal. O estudo por MLPA das regiões subteloméricas revelou uma deleção na braço curto do cromossoma 4 (4p16.3) (figura 9- A e B) que foi confirmada por FISH através da utilização de uma sonda subtelomérica para a mesma região (*locus* D4S3359, ToTelvysion). De modo a verificar se a deleção abrangia a WHSCR, foi utilizada uma sonda de FISH específica

que revelou um resultado normal (imagens não apresentadas). Foi realizado o estudo dos progenitores através da análise da mesma região por MLPA tendo sido o resultado da mãe normal (mlpa4psubtel(P036,P070)x2) e o do pai com apenas uma cópia da região 4p16.3 (mlpa4psubtel(P036,P070)x1). O estudo por MLPA a uma amostra de DNA da irmã do caso index revelou também a existência da mesma deleção. O resultado do estudo do caso 4 é 46,XX.ish del(4)(p16.3)(D4S3359-,WHSC1+).mlpa 4psubtel(P036,P070)x1 pat. Para melhor definir os pontos de quebra foi realizado um array-CGH que comprovou a existência de uma deleção 0,6 Mb envolvendo 12 genes (2 genes reportados no OMIM Genetic Morbid Map): arr 4p16.3(72,447-683,874)x1 (Tabela 3).

<b>A</b>	Gene	Chr pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Mãe	Pai	Irmã	Caso 4
	TNFRSF4 probe 2269-L01761	01p	130	01-001.1 TNFRSF4	1	Normal (1,17)	Normal (0,91)	Normal (0,93)	Normal (0,95)
	KIAA1720 probe 2392-L02149	01q	306	01-247.1 KIAA1720	2	Normal (1,04)	Normal (0,96)	Normal (1,01)	Normal (0,98)
	ACP1 probe 2274-L08758	02p	137	02-000.3 ACP1	3	Normal (1,22)	Normal (0,99)	Normal (0,97)	Normal (0,87)
	CAPN10 probe 1742-L01308	02q	314	02-241.3 CAPN10	4	Normal (1,1)	Normal (1,07)	Normal (1,01)	Normal (1,06)
	CHL1 probe 1721-L01329	03p	144	03-000.3 CHL1	5	Normal (1,07)	Normal (1,08)	Normal (1,03)	Normal (1,09)
	BDH probe 2013-L02052	3q	322	03-198.8 BDH	6	Normal (0,9)	Normal (1,09)	Normal (1,08)	Normal (1,1)
	FLJ20265 probe 2005-L02047	04p	151	04-000.5 FLJ20265	7	Normal (0,95)	LOH (0,54)	LOH (0,56)	LOH (0,53)
	TRIML2 probe 7046-L06655	4q	330	04-189.3 TRIML2	8	Normal (1,1)	Normal (0,96)	Normal (0,94)	Normal (1,09)
	PDCD6 probe 1723-L01327	05p	158	05-000.4 PDCD6	9	Normal (1,06)	Normal (1,06)	Normal (1)	Normal (1,05)
	GNB2L1 probe 3319-L02737	05q	338	05-180.6 GNB2L1	10	Normal (1,12)	Normal (1)	Normal (0,94)	Normal (0,95)
	IRF4 probe 1724-L02048	06p	165	06-000.3 IRF4	11	Normal (0,94)	Normal (0,95)	Normal (0,95)	Normal (0,97)
	PSMB1 probe 1746-L01304	06q	346	06-170.8 PSMB1	12	Normal (1,04)	Normal (1)	Normal (0,93)	Normal (0,97)

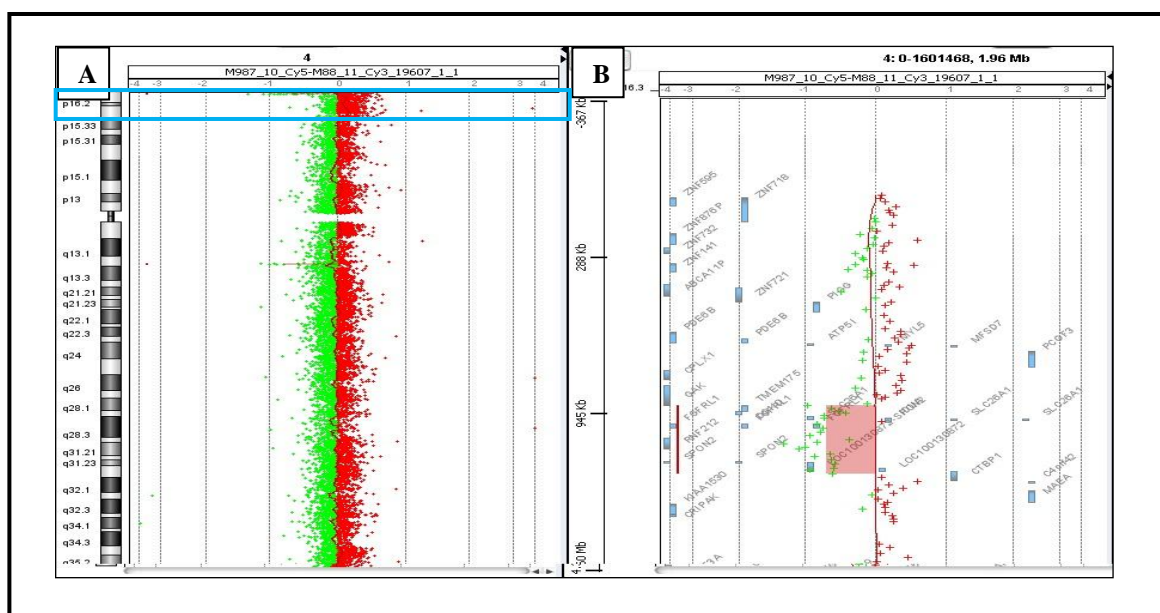
<b>B</b>	Gene	Chr pos	Length (nt)	MV36	Recommended Order	Mãe	Pai	Irmã	Caso 4
	TNFRSF18 probe 2270-L1762	01p36.3	306	1-001.0 TNFRSF18	1	Normal (0,98)	Normal (1,03)	Normal (0,96)	Normal (1,11)
	SH3BP5L probe 4084-L3605	01q44	132	01-247.1 SH3BP5L	2	Normal (1,02)	Normal (1,07)	Normal (1,04)	Normal (1,09)
	ACP1 probe 2709-L2856	02p25	315	02-000.3 ACP1	3	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (1)	Normal (1,09)
	ATG4B probe 2781-L3168	02q37.2	139	02-236.3 ATG4B	4	Normal (1)	Normal (1,01)	Normal (1)	Normal (1,09)
	CHL1 probe 2896-L2363	03p26.1	323	03-000.3 CHL1	5	Normal (1,03)	Normal (1,03)	Normal (0,94)	Normal (0,98)
	KIAA0226 probe 2690-L2842	03q29	145	03-198.8 KIAA0226	6	Normal (1,01)	Normal (0,98)	Normal (1)	Normal (1,03)
	PIGG probe 14440-L16146	04p16.3	329	04-000.5 PIGG	7	Normal (1,04)	LOH (0,53)	LOH (0,56)	LOH (0,54)
	FRG1 probe 2691-L2843	04q35	152	04-191.1 FRG1	8	Normal (0,94)	Normal (1)	Normal (0,95)	Normal (0,94)
	LOC133957 probe 2791-L2233	05p15.33	337	5-000.3 LOC133957	9	Normal (0,9)	Normal (0,95)	Normal (0,91)	Normal (0,99)
	GNB2L1 probe 2790-L2232	05q35.3	160	05-180.6 GNB2L1	10	Normal (1,03)	Normal (0,99)	Normal (1,01)	Normal (0,97)
	IRF4 probe 4077-L3462	06p25-p23	346	06-000.3 IRF4	11	Normal (0,94)	Normal (1)	Normal (0,92)	Normal (0,97)
	TBP probe 2694-L2844	06q27	166	06-170.7 TBP	12	Normal (1,02)	Normal (1,03)	Normal (1,01)	Normal (0,97)

**Figura 9 – Resultados do caso 4 obtidos por técnica de MLPA**

**A** –deleção pelo painel de sondas P036-B1 para o gene *FLJ20265* localizado em 4p16.3; **B** –deleção pelo painel de sondas P070-B1 para o gene *PIGG* localizado em 4p16.3.

### Caso 5

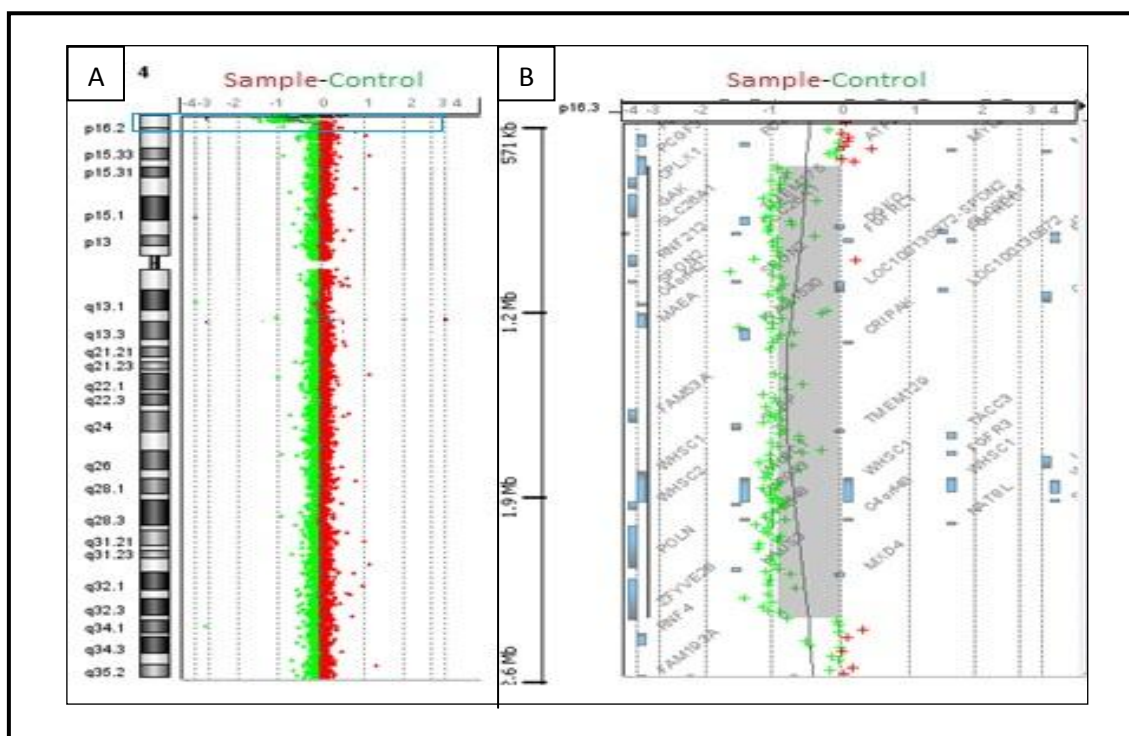
Rapaz de 17 anos com estatura elevada, défice cognitivo, assimetria facial e dismorfismos múltiplos. O resultado da análise por array-CGH mostrou uma deleção com 0,28 Mb terminal em 4p (figura 10- A e B) que, após estudo dos progenitores, mostrou ser de origem paterna: arr 4p16.3(927,780-1,214,915)x1 pat. A deleção é distal à região crítica do WHS (Figura 10), envolve 10 genes (2 reportados no OMIM Genetic Morbid Map) (Tabela 2) e foi confirmada por MLPA tanto no filho como no pai.



**Figura 10 – Resultados do caso 5 obtidos por array-CGH: A – perfil de array-CGH para o cromossoma 4 com a região deletada assinalada a azul; B – conteúdo génico da deleção;**

### Caso 6

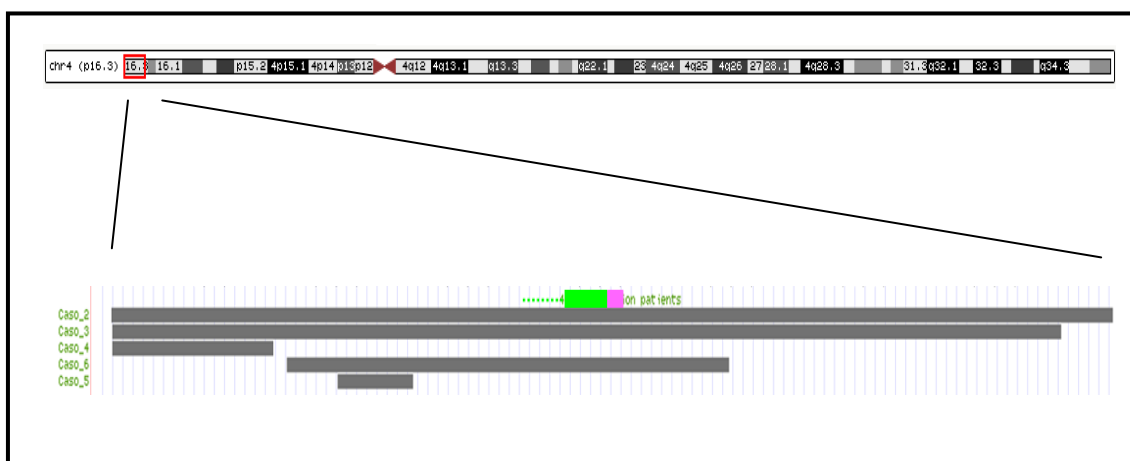
Menino de 4 anos com atraso de desenvolvimento psicomotor global. Durante a gravidez deste menino houve registo de uma RCIU que levou ao pedido de realização de um cariótipo pré-natal que obteve um resultado normal. Este menino foi encaminhado para o serviço de Genética Médica quando tinha 15 meses. A análise por array-CGH mostrou uma deleção de 1,7 Mb que envolvia 34 genes (5 reportados no OMIM Genetic Morbid Map) (Tabela 3) na região crítica do WHS: arr4p16.3(737,721-2,416,211)x1 (Figura 11). Esta deleção foi confirmada por FISH. Ambos os progenitores foram estudados por FISH com sondas para a mesma região tendo o resultado sido normal, o que demonstra que a deleção foi *de novo*.



**Figura 11 – Resultados do array-CGH no caso 6:** A – perfil de array-CGH para o cromossoma 4 com a região deletada assinalada a azul; B – conteúdo génico da deleção;

Com os resultados obtidos com array-CGH foi construído um esquema de genes a partir do *UCSC Genome Browser* onde é possível visualizar a região deletada nos casos 2-6, permitindo identificar quais os genes deletados em cada caso e avaliar quais aqueles que são comuns entre os casos (Figuras 12 e 13). Não existe nenhum gene que esteja envolvido na deleção de todos os casos, existindo contudo alguns comuns a mais do que um caso.

Na tabela 3 são comparados os resultados obtidos nos 5 casos de estudo estudados por array-CGH, onde é possível determinar com precisão os pontos de quebra.

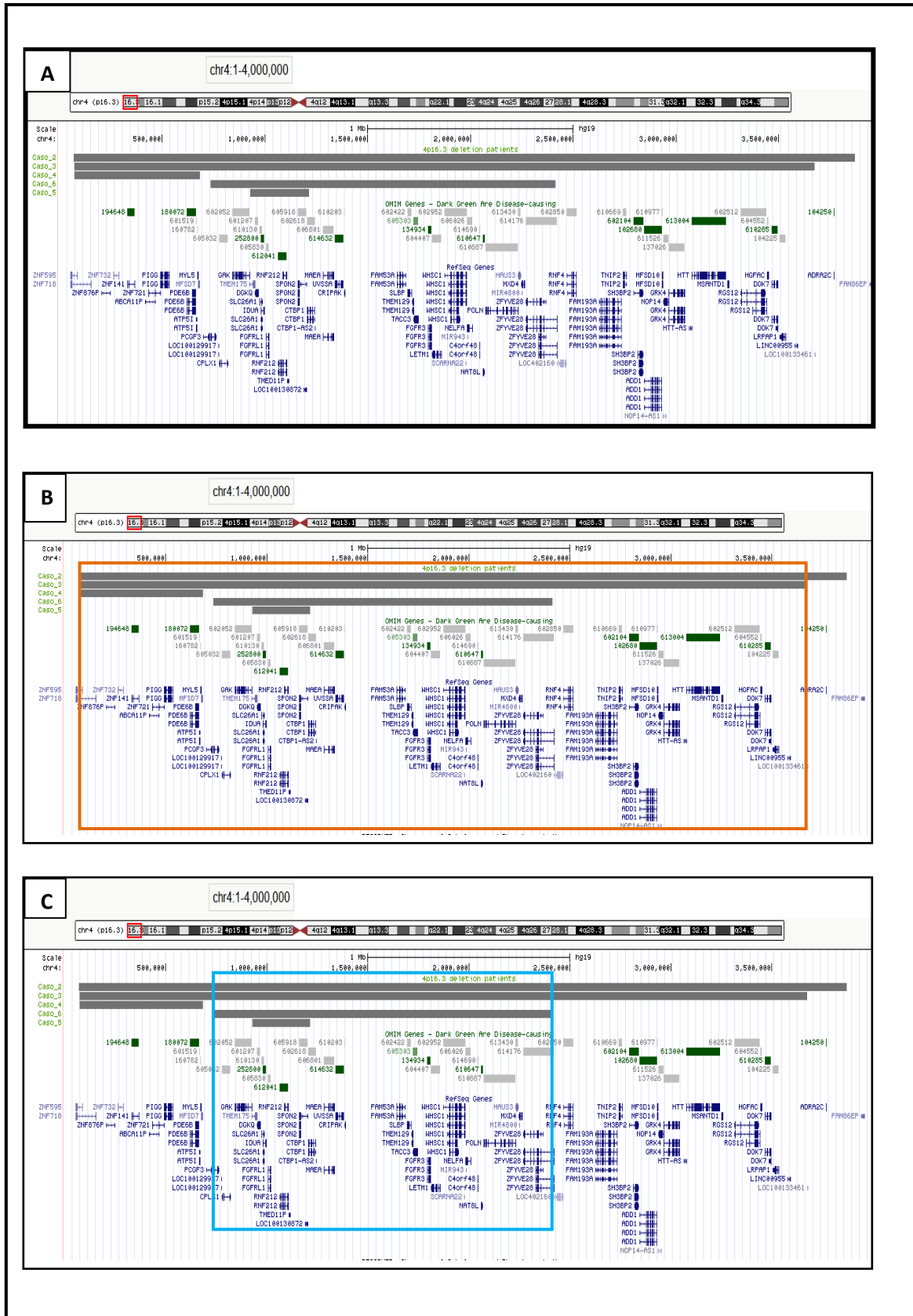


**Figura 12.** Adaptação do esquema de genes mostrando o tamanho da deleção dos casos 2-6 e identificação das regiões críticas para a WHS: ■ WHSCR1 ■ WHSCR2

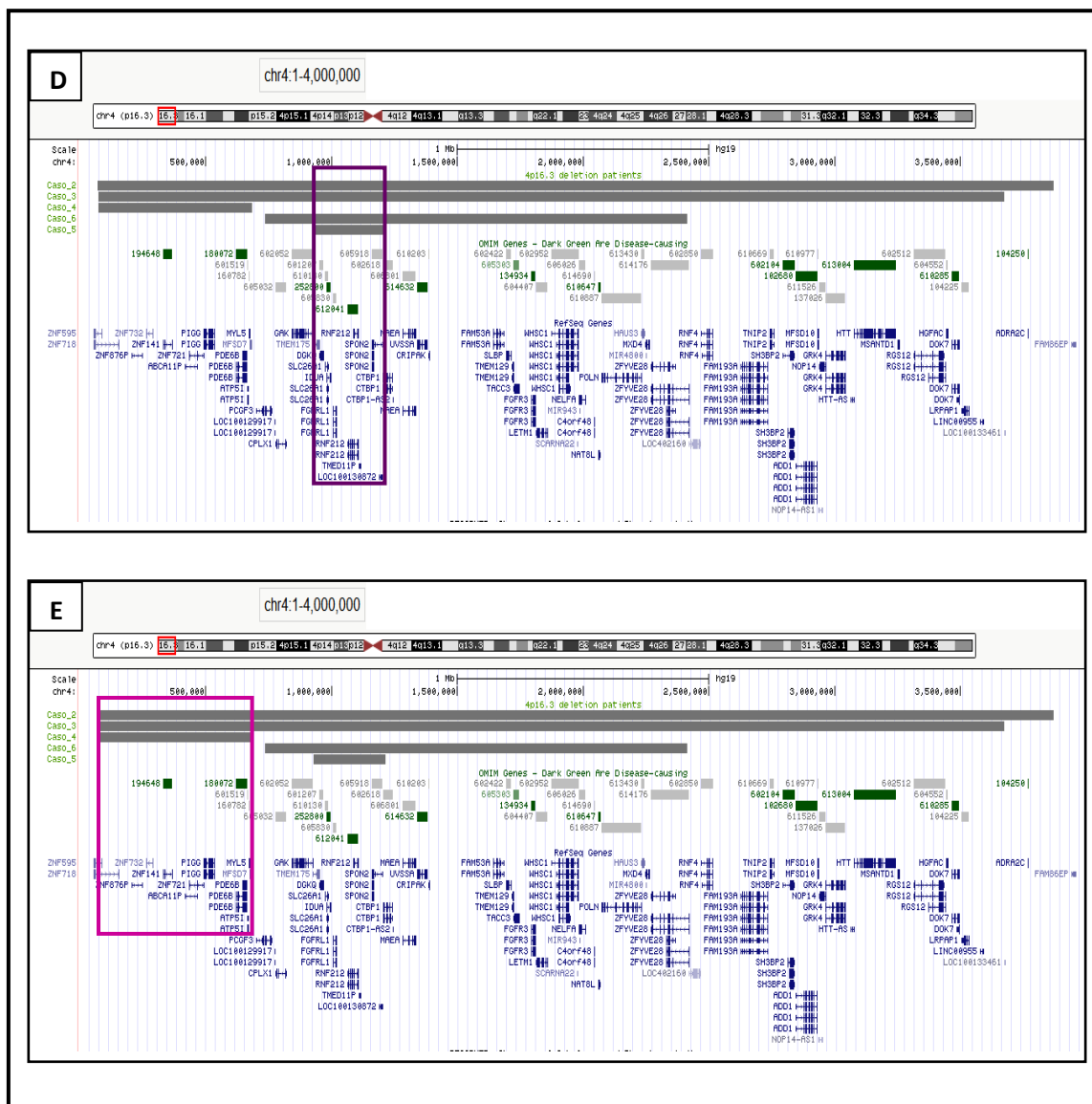
**Tabela 3** – Limites da deleção e número de genes envolvidos nessa região, com indicação de quais já estão associados a doença e, especificamente, já associados ao déficit cognitivo (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) nos casos estudados por array-CGH

	<b>Caso 2</b>	<b>Caso 3</b>	<b>Caso 4</b>	<b>Caso 5</b>	<b>Caso 6</b>
Cariótipo	normal	Normal	normal	a)	Normal
Limites da deleção	71,522- 3,872,380	72,447- 3,673,709	72,447- 683,874	927,780- 1,214,915	737,721- 2,416,211
Tamanho da deleção	≈ 3,8 Mb	≈ 3,6 Mb	≈ 0,6 Mb	≈ 0,28 Mb	≈ 1,7 Mb
Número de genes envolvidos	67 genes	65 genes	12 genes	10 genes	34 genes
Genes no morbidmap (OMIM)	7	7	2	2	5
	194648, 180072, 252800, 612041, 614632, 134934, 610647	194648, 180072, 252800, 612041, 614632, 134934, 610647	194648, 180072	252800, 612041	252800, 612041, 614632, 134934, 610547
Genes associados ao déficit cognitivo	252800 (gene IDUA), 610647 (NAT8L)				

a) não realizado







**Figura 13** – A: Esquema de UCSC Genome Browser segundo a versão 19 do genoma (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=185996753&clade=mammal&org=Human&db=hg19&redirect=auto&source=genome.ucsc.edu>); B-E: esquemas adaptados de **A** delimitando a região deletada comum aos casos 2 e 3 (**B**), aos casos 2,3 e 6 (**C**), aos casos 2,3,5 e 6 (**D**) e aos casos 2,3 e 4 (**E**)

## Discussão

Existem inúmeras técnicas de citogenética e genômica molecular, sendo a escolha da técnica a utilizar dependente da orientação da clínica, dos objetivos da análise, do material genético disponível e das tecnologias disponíveis no laboratório.

A análise do material genético do caso 1 por citogenética convencional mostrou a existência de uma deleção na região crítica para o WHS. Ao aplicar a mesma técnica aos casos 2,3, 4 e 6 não foi possível identificar a deleção porque a microdeleção tinha um tamanho inferior à resolução da citogenética convencional. Nestes casos só foi identificada com recurso a array-CGH (caso 2,5 e 6) e a MLPA (caso 3 e 4). Sabendo que a capacidade de detecção de anomalias cromossômicas e estruturais por citogenética convencional varia entre 5-10 Mb, assume-se que o caso 1 possuía uma deleção igual ou superior a esse tamanho.

Por recurso a array-CGH foi possível precisar as posições nucleotídicas inicial e final das deleções existentes nos casos 2 a 6. A análise por FISH foi útil para confirmar os resultados obtidos e estudar o material genético dos progenitores e assim determinar a existência ou não de um rearranjo estrutural equilibrado que por segregação anômala na meiose fosse responsável pela alteração desequilibrada encontrada na sua descendência.

O WHS é, na maioria dos casos, causado por deleções terminais envolvendo a região 4p16.3 podendo estender-se até 4pter.<sup>5</sup> Face às tecnologias mais utilizadas na última década (FISH e MLPA) e, conseqüentemente às sondas utilizadas, as deleções

intersticiais são reportadas com menor frequência. A recente tecnologia do array-CGH tem permitido detetar não só estas deleções intersticiais mas também deleções mais pequenas permitindo melhores correlações genótipo-fenótipo e uma maior possibilidade de identificar as funções dos genes envolvidos.

As deleções das regiões críticas WHSCR1 e WHSCR2 levam à perda de funções de genes tanto devido à sua deleção como desregulação de outros genes fora destas regiões, condicionando as características major do WHS.<sup>9</sup> Em estudos anteriores em que existia apenas deleção das regiões críticas ou em estudos com ratos cujo alvo era um único gene foi demonstrado que não havia expressão do fenótipo completo associado a este síndrome. Com base nas conclusões destes estudos foi afastada a hipótese deste síndrome ser causado por um único gene pleiotrópico.<sup>17-19</sup>

A análise dos resultados de outros estudos permitem concluir que há mecanismos alternativos que podem levar a fenótipos mais complexos tais como os associados a um derivativo resultante de uma segregação anómala de uma translocação que resultam em deleção de 4p e uma trissomia adicional de outra região cromossómica (situação do caso 2), uma variação alélica da região 4p homóloga, desregulação de genes fora da região deletada, efeito de posição e silenciamento do telómero, *background* genético e eventos mutacionais pós-zigóticos.<sup>10,20-22</sup>

Em todos os casos, exceto no caso 2, pode estabelecer-se uma relação entre o fenótipo apresentado pelo doente e a deleção que este possui na região 4p16.3. O caso 2, além de possuir uma deleção da região terminal do cromossoma 4, possui uma trissomia

da região terminal do cromossoma 7, o que provavelmente é responsável por um fenótipo mais complexo e tornando mais complicado retirar conclusões de causalidade do genótipo-fenótipo.

Como demonstrado na Figura 12, as deleções identificadas nos casos 4 e 5 não incluem as regiões críticas do WHS, sendo as deleções de ambos os casos distais às regiões críticas, não podendo deste modo considerar-se estes casos como verdadeiros Wolf-Hirschhorn. Na realidade, estas crianças não possuem muitas das características fenotípicas que caracterizam este síndrome.

Neste estudo a relação genótipo-fenótipo não pode ser feita na totalidade porque os casos 1 a 3 correspondem a fetos onde conseqüentemente não é possível analisar dados tais como o neurodesenvolvimento, o crescimento, a força muscular, a capacidade de alimentação, a existência de convulsões e a visão. Apenas é possível tirar conclusões a partir dos achados ecográficos e da anatomia patológica.

Seguidamente são discutidos alguns genes que demonstraram ser responsáveis por parte do fenótipo do WHS. (Tabela 4).

**Tabela 4** – Relação entre genes e características fenotípicas associadas à deleção do mesmo, assinalando quais os casos em que esse gene se encontra deletado

Genes	Características fenotípicas associadas ao gene	Caso	Caso	Caso	Caso	Caso	Caso
		1	2	3	4	5	6
WHSC1	- atraso de crescimento - anomalias cardiovasculares - atraso de neurodesenvolvimento - características craniofaciais	X	X	X	√	√	X
FGFRL1	- características craniofaciais - atraso de crescimento - anomalias esqueléticas - defeitos cardíacos congénitos	X	X	X	√	X	X
FGFR3	- distúrbios esqueléticos	X	X	X	√	√	X
LETM1	- convulsões epiléticas - anomalias neuromusculares - atraso no neurodesenvolvimento	X	X	X	√	√	X
CPLX1	- défices de coordenação motora e locomoção, redução da força motora, distonia, ataxia e tremor de repouso	X	X	X	√	√	X
DGKQ	- défice motor - défice cognitivo	X	X	X	√	X	X
CTBP1	- atraso do crescimento - convulsões epiléticas	X	X	X	√	X	X

X – gene deletado    √ - gene presente

Os casos 1-3 e 6 têm deleção do gene *WHSC1*, sendo este um membro da família das proteínas metiltransferases, indispensáveis para manter a integridade da cromatina.<sup>8</sup> Um estudo demonstrou que ratinhos com deleção de *WHSC1* mostraram atrasos de crescimento e várias anomalias congênitas, tais como anomalias cardiovasculares.<sup>23</sup> Hadju e colaboradores propuseram que este gene tem um papel importante na resposta aos danos no DNA pelo que o atraso no neurodesenvolvimento existente no WHS pode ser explicado por um defeito nesta resposta.<sup>24</sup> Okamoto e colaboradores descreveram uma deleção de 109 Kb no cromossoma 4p16.3 num doente com fenótipo ligeiro de WHS, sugerindo que a haploinsuficiência de *WHSC1* seria a causa mais provável para o atraso de crescimento severo, microcefalia e características faciais apresentadas pelo doente. O mesmo artigo propôs ainda que o gene *WHSC1* e outros genes localizados distalmente teriam um efeito cumulativo na existência de défice cognitivo severo e anomalias craniofaciais severas.<sup>8</sup> Estes achados sugerem que parte das anomalias craniofaciais, as anomalias cardíacas, a restrição do crescimento encontrada nos casos 1-3 e o atraso de crescimento e neurodesenvolvimento no caso 6 se podem dever, ainda que parcialmente, à deleção do gene *WHSC1*.

O gene *FGFRL1*, deletado nos casos 1-3,5 e 6, foi sugerido como sendo responsável pela maior parte das características craniofaciais do WHS. Sugeriu-se que a deleção contígua deste gene e de *WHSC1* manifestaria todas as características craniofaciais do síndrome.<sup>25,26</sup> Este gene tem sido associado a outras características tais como o atraso de crescimento, anomalias esqueléticas e defeitos cardíacos congênitos.<sup>29</sup>

A deleção deste gene pode então ser parcialmente responsável pelo fácies apresentado pelos casos 1-3 e 6, juntamente com o gene *WHSC1*. Visto que a deleção no caso 5 não inclui o gene *WHSC1*, pode-se levantar a hipótese da assimetria facial encontrada no doente se dever à deleção do gene *FGFRL1*. Todos os casos que têm deleção deste gene têm anomalias esqueléticas e os casos 2,5 e 6 apresentam algum tipo de anomalia cardíaca.

A deleção do gene *FGFR3* está associada a distúrbios esqueléticos<sup>8</sup>, sendo um regulador negativo do crescimento ósseo. Os casos 1-3 e 6 têm deleção deste gene e têm anomalias esqueléticas nas mãos, pés ou em ambos.

O gene *LETM1* está deletado na maioria dos doentes com WHS e foi sugerido que possa ser um gene associado ao desenvolvimento das convulsões epiléticas e anomalias no sistema nervoso central (SNC).<sup>8</sup> Este gene está deletado nos casos 1-3 e 6. Foi descrito que a epilepsia costuma manifestar-se nos 3 primeiros anos de vida,<sup>28</sup> contudo o doente 6 tem 4 anos e não há registo de episódios convulsivos. Coloca-se então a hipótese de a haploinsuficiência de *LETM1* não ser sempre significativa da ocorrência de convulsões epiléticas.<sup>8</sup> Apesar destes dados é importante lembrar que não há informação de que este menino tenha feito um eletroencefalograma (EEG), não sendo portanto possível assegurar a ausência de anomalias no SNC. Um estudo mostrou que o gene *LETM1* apresenta homologia com uma proteína existente na levedura envolvida na morfologia mitocondrial, sugerindo que algumas das anomalias neuromusculares presentes no WHS podem ser causadas por disfunção mitocondrial.<sup>29</sup>

Estudos através da técnica de *conditional knockdown* no DmLETM1 (*Drosophila mutant of LETM1*) revelaram uma necessidade por LETM1 em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso<sup>30</sup>, levando a ponderar a possibilidade da deleção do gene desempenhar um papel no atraso no neurodesenvolvimento dos doentes com WHS.

O gene CPLX1, que está deletado nos casos 1-3 e 6, pertence a uma família de proteínas citosólicas com função na exocitose das vesículas sinápticas. Em estudos com ratinhos estabeleceu-se a possível associação entre a deleção deste gene e anomalias neuromusculares.<sup>27,31</sup> A deleção deste gene pode ser a razão da hipotonia ao nascimento e défice de força muscular apresentadas pelo caso 6.

A deleção do gene DGKQ, deletado nos casos 1-3, 5 e 6, foi considerada como uma possível causa para o défice motor e cognitivo existente no WHS, pois o gene correspondente em ratos é expresso na matéria cinzenta do cérebro e estudos *in vitro* relacionaram-no com a regulação de células neuronais e potencialmente envolvido nas sinapses.<sup>32</sup>

Também o gene CTBP1 está deletado nos casos 1-3,5 e 6. Estudos anteriores mostraram que a deleção deste gene está associada com o atraso de crescimento e desenvolvimento de epilepsia<sup>18</sup>, podendo este último dado explicar a existência de epilepsia, se bem que não comprovada, do caso 5.

O aconselhamento genético deve ser oferecido a todos os casais que já têm um filho com WHS ou uma gravidez em que o feto foi diagnosticado com este síndrome. Nos casos em que a deleção resulta de uma segregação anómala, como por exemplo no



caso 2, em que o feto era portador de uma translocação de origem paterna (não havia informação sobre o fenótipo do pai), deve-se oferecer o diagnóstico pré-natal em todas as gravidezes subsequentes ou aconselhar sobre opções de técnicas de reprodução medicamente assistida. É importante também estender o estudo desta região a outros familiares diretos ou de risco. Nos casos 1,3 e 6 foram identificadas deleções *de novo*, sendo oferecido diagnóstico pré-natal em futuras gestações do casal pois há o risco de recorrência de 1 a 2% atribuível à possibilidade de mosaicismo gonadal. O aconselhamento aos progenitores dos casos 4 e 5 é uma situação mais complexa. As deleções dos casos 4 e 5, ambas não envolvendo nenhuma das regiões críticas (WHSCR1 e WHSCR2), foram herdadas dos pais com deleção semelhante (não havia informação sobre o fenótipo). É possível oferecer aos progenitores do caso 2 um diagnóstico genético, pré-natal e/ou pré-implantação pelo risco acrescido de doença genética.

Fazer o diagnóstico correto de WHS permite delinear um plano estratégico para o portador e família permitindo um seguimento mais dirigido, bem como a apresentação de um prognóstico. Este depende da presença ou ausência de malformações graves e epilepsia (tipo e severidade).<sup>2</sup>

## Conclusão

Todos os casos apresentavam deleção da região 4p16.3 que variava em tamanho de 0,28 Mb (caso 5) a mais de 5-10 Mb (caso 1).

Os casos 1 a 6 comprovam que as manifestações fenotípicas do WHS podem ser variáveis e suportam muitas das relações apontadas previamente entre características do fenótipo e genes que se encontram envolvidos na deleção. É demonstrado que os genes responsáveis pela maioria das características fenotípicas típicas encontram-se localizados nas regiões críticas – WHSCR1 e WHSCR2. O caso 4 não exibe deleção de nenhum dos genes referidos como associados ao fenótipo de Wolf-Hirschhorn, sendo dedutível que o déficit cognitivo que a menina apresenta se deve a outro gene, ainda não associado a doença.

Como o diagnóstico de WHS só é feito se houver deleção de uma das regiões críticas, justifica-se a razão para não se poder fazer este diagnóstico nos casos 4 e 5 e correspondentes progenitores portadores, apesar de ser possível identificar nestes casos características fenotípicas sobreponíveis ao síndrome.

A deleção destas regiões não é suficiente para a expressão de todo o fenótipo, existindo outros genes, como FGFRL1, CPLX1, DGKQ, CTBP1, fora das regiões críticas, que mostram ser responsáveis por alguns traços fenotípicos.

Os estudos de citogenética e genómica molecular – citogenética convencional, FISH, MLPA e array-CGH - devem ser complementares na procura de um diagnóstico, pensando nas capacidades, limitações e custo de cada técnica. Mesmo que a citogenética

convencional dê um resultado normal, se os achados clínicos e/ou ecográficos continuarem a ser sugestivos desta ou de outra anomalia cromossômica, devem ser feitos outros estudos de citogenética molecular ou genômica de modo a tentar obter um diagnóstico em tempo útil nos casos em pré-natal. Este artigo apoia ainda que o estudo de casos com suspeita clínica de WHS não se foque apenas na pesquisa das regiões críticas definidoras do síndrome, propondo que se utilizem técnicas como o array-CGH, que permitem o estudo do genoma mais abrangente. A necessidade de um diagnóstico impera também nos casos de crianças como os casos 4-6 pois auxilia a elaboração de um plano de seguimento e o prognóstico.

A interpretação do mecanismo que causa a deleção, possibilitada pelo estudo do material genético dos progenitores, revela-se de extrema importância para discutir com o casal o risco de recorrência e a possibilidade de seguimento em gravidezes subsequentes.

Este estudo permitiu analisar o processo laboratorial de diagnóstico perante a suspeita clínica de um síndrome genético num laboratório de Genética clínica como o Laboratório de Citogenética e Genômica da FMUC, promovendo uma melhor visão sobre a parceria entre a clínica e o laboratório.

## **Agradecimentos**

- Professora Doutora Isabel Carreira e Professora Doutora Joana de Melo pela orientação e pelo tempo que me disponibilizaram,
- Investigadores José Ferrão e Susana Ferreira e restante equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica Molecular, por todas as revisões, explicações, apontamentos e sugestões que me forneceram;
- Doutora Fabiana Ramos, por descrever os dados clínicos dos casos que compõem a minha amostra;
- Aos meus pais, irmã e prima pelo apoio e ajuda.

## Bibliografia

1. Battaglia A, Carey JC, South ST, Wright TJ. Wolf-Hirschhorn Syndrome. *GeneReviews*. 2002
2. Battaglia A, South S, Carey JC. Clinical utility card for: Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. *European Journal of Genetics*. 2011; 19(4)
3. Andersen EF, Carey JC, Earl DL, Corzo D, Suttie M et al. Deletions involving genes WHSC1 and LETM1 may be necessary, but are not sufficient to cause Wolf-Hirschhorn syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2013; 19(2): 1-7
4. Maas NMC, Van Buggenhout G, Hannes F, Theinpont B, Sanlaville D, Kok K et al. Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridization (CGH). *Journal of Medical Genetics*. 2008; 45:71-80
5. Zollino M, Murdolo M, Marangi G, Pecile V, Galasso C, Mazzanti L e Neri G. On the Nosology and Pathogenesis of Wolf-Hirschhorn Syndrome: Genotype-Phenotype Correlation Analysis of 80 patients and Literature Review. *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)*. 2008;148C:257-269
6. South ST, Whitby H, Battaglia A, Carey JC, Brothman AR. Comprehensive analysis of Wolf-Hirschhorn syndrome using array CGH indicates a high prevalence of translocations. *European Journal of Human Genetics*. 2008;16:45-52

7. South ST, Bleyl SB, Carey JC. Two unique patients with novel microdeletions in 4p16.3 that exclude the WHS critical regions: implications for critical region designation. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2007;143A:2137-2142
8. Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T. 109 kb Deletion of Chromosome 4p16.3 in a Patient with Mild Phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013;161A:1465-1469
9. Sheth F, Akinde OR, Datar C, Adeteye OV, Sheth J. Genotype-Phenotype Characterization of Wolf-Hirschhorn Syndrome Confirmed by FISH: Case Reports. *Genetics*. 2012; Article ID 878796, 5 páginas.
10. Ikonomidou T, Antsaklis P, Daskalakis G, Sindos M, Papantoniou N, Kosmaidou Z e Antsaklis A. Prenatal diagnosis of Wolf-Hirschhorn syndrome: ultrasonography and genetics. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2013;26(9):941-942
11. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities of Congenital Anomalies. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;86:749-764
12. Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the

detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *European Journal of Medical Genetics*. 2008;51(2):93-105

13. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of arrayCGH in the evaluation of dysmorphology malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2007;17(3):182-192

14. Xiang B, Li A, Valentin D, Nowak NJ, Zhao H, Li P. Analytical and clinical validity of whole-genome oligonucleotide array comparative genomic hybridization for pediatric patients with mental retardation and developmental delay. *American Journal of Medical Genetics*. 2008; 146A:1942-1954

15. Shaffer LG, Mc Gowan-Jordan, Schmid M. ISCN, an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Karger (collaboration of Cytogenetic and Genome Research)

16. Rauch A, Schellmoser S, Kraus C, Dörr HG, Trautmann U, Altherr MR et al. First Known Microdeletion within the Wolf-Hirschhorn-Syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation. *American Journal of Medical Genetics*. 2001;99:338-342

17. Bangs CD, Donlon TA. *Current Protocols in Human Genetics*. 2005; Supplement 45: 4.1.1-4.1.19

18. Simon R, Bergemann AD. Mouse Models of Wolf-Hirschhorn Syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)*.2008;148C:275-280
19. Catela C, Bilbao-Cortes D, Slonimsky E, Kratsios P, Rosenthal N, Te Welscher P. Multiple congenital malformations of Wolf-Hirschhorn syndrome are recapitulated in *Fgfr11* null mice. *Diseases Models & Mechanisms*. 2009;2(5-6):283-294
20. Zollino M, Lecce R, Murdolo M, Orteschi D, Marangi G, Selicorni A et al. Wolf-Hirschhorn syndrome-associated chromosome changes are not mediated by olfactory receptor gene clusters nor by inversion polymorphism on 4p16. *Human Genetics*. 2007;122:423-430
21. Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R et al. Heterozygous Submicroscopic Inversions Involving Olfactory Receptor-Gene Clusters Mediate the Recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. *American Journal Human Genetics*. 2002;71:276-285
22. Bergemann AD, Cole F, Hirschhorn K. The etiology of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Genetics*. 2005: 21(3)
23. Nimura K, Ura K, Shiratori H, Ikawa M, Okabe M, Schwartz RJ. A histone A3 lysine 36 trimethyltransferase links *Nkx2-5* to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature*. 2009;460: 287-291



24. Hadju I, Ciccia A, Lewis SM, Elledge SJ. Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in the cellular response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108 (32):13130-4
25. Hammond P, Hannes F, Suttie M, Devriendt K, Vermeesch JR, Faravelli F et al. Fine-grained facial phenotype-genotype analysis in Wolf-Hirschhorn syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2012;20:33-40
26. Engbers H, Smagt JJ, Slot R, Vermeesch JR, Hochstenbach R, Poot M. Wolf-Hirschhorn syndrome facial dysmorphic features in a patient with a terminal 4p16.3 deletion telomeric to the WHSCR and WHSCR2 regions. *European Journal of Human Genetics*. 2009; 17:129-132
27. Misceo D, Barøy T, Helle JR, Braaten Ø, Fanemel M, Frengen E. 1,5 Mb deletion of chromosome 4p16.3 associated with postnatal growth delay, psychomotoric impairment, epilepsy, impulsive behavior and asynchronous skeletal development. *Gene*. 2012;507:85-91
28. Battaglia A, Filippi t, South ST, Carey JC. Spectrum of epilepsy and electroencephalogram patterns in Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 87 patients. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2009;51(5):373-380

29. Schickum S, Moghekar A, Simpson JC, Steglich C, O'Brien RJ, Winterpatch A e Endele SU. LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics*. 2004;83(2):254-261
30. McQuibban AG, Joza N, Megighian A, Scorzeto M, Zanini D, Reipert S, Richter C et al. A Drosophila mutant of LETM1, a candidate gene for seizures in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Human Molecular Genetics*. 2010;19 (6):987-1000
31. Glynn D, Drew CJ, Reim K, Brose N, Morton AJ. Profound ataxia in complexin I knockout mice masks a complex phenotype that includes exploratory and habituation deficits. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(16):2369-2385
32. Tu-Sekine B, Raben DM. Regulation of DGK- $\theta$ . *Journal of Cellular Physiology*. 2009;220: 548-552