

Síndrome de Down: origen parental, asociaciones de satélites y regiones organizadoras nucleolares

Marisol Soto Quintana, Lennie Pineda del Villar, Alicia Rojas Atencio, Francisco Alvarez Nava, Jenny Cañizales Tarazona, Minolfa Prieto Carrasquero*
Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

Recibido: 30-01-97 . Aceptado: 18-07-97

Resumen

Con la finalidad de investigar algunos factores que conducen a la no díscunción (ND) del cromosoma 21 extra, en este trabajo se determinó el origen parental y fase meiótica de la ND del cromosoma 21 extra, en pacientes afectados con Síndrome de Down (SD) y se evaluó en los padres de estos pacientes la importancia de las asociaciones de satélites (AS) y de las variantes en las regiones organizadoras nucleolares (NOR) como factores de riesgo para ND cromosómica. Se estudiaron 28 familias (padre, madre, y afectado con SD) para un total de 84 individuos que asistieron a la consulta de asesoramiento genético de la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de LUZ. Como testigos se estudiaron 40 individuos normales de ambos sexos sin historia familiar de SD. Las muestras de sangre periférica se cultivaron según la técnica de Moorhead (1960) con modificaciones. A los extendidos se les realizó bandas Q y NOR. Los resultados del origen parental y fase meiótica indican que 66,6% de los errores de ND ocurren en meiosis I materna, 25% en meiosis I paterna y 4,2% en meiosis II materna o paterna. Las AS entre los brazos cortos de los diferentes cromosomas acrocéntricos y la frecuencia de NOR entre padres y testigos no fue estadísticamente significativa. En cuanto al tipo de variante NOR, su distribución entre padres y testigos fue altamente significativa, fundamentalmente a expensas de la variante masiva. Los resultados corroboran lo reportado en la literatura donde se indica un mayor predominio de casos en meiosis I materna. Hasta ahora no existe suficiente información experimental que permita relacionar la ocurrencia de trisomía 21 con la AS en los padres de niños afectados con SD. Dada la naturaleza subjetiva del análisis de las variantes NOR y la falta de uniformidad en los criterios para clasificarlas no es posible establecer una relación entre estas variantes y la ND cromosómica, por lo que se hace necesario continuar con estudios de esta naturaleza que permitan esclarecer tal asociación.

Palabras clave: Asociaciones de satélites; no disyunción; regiones organizadoras nucleolares.

* Autor para la correspondencia. Departamento de Citogenética. Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Hospital Universitario. Apartado Postal 15066. Teléfono-Fax (061) 519496. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Down Syndrome: parental origin, satellite of associations and nucleolar organizer regions

Abstract

The parental origin and meiotic stage of the nondisjunction (ND) in the extra chromosome 21 was investigated in patients affected with Down Syndrome (DS), in order to determine the factors that lead to the ND in the extra chromosome 21. The importance of satellite associations (SA) and the variants in the nucleolar organizer regions (NOR), as risk factors were evaluated in the parents of the affected children. Eighty four individuals (father, mother and affected child) from 28 families were studied. The families were selected from patients of the Genetic Counseling Clinic at the Medical Genetics Unit, Faculty of Medicine, University of Zulia. Forty normal individuals, with no family history of DS of both sexes, were studied as controls. Peripheral blood samples were cultured according to Moorhead's technique (1960), with some modifications, and bands Q and NOR were analyzed in the smears. Sixty six per cent of the ND errors occurred in maternal meiosis I, 25% in paternal meiosis I and 4.2% in maternal or paternal meiosis II. No statistically significant differences were found between parents and controls regarding the presence of SA between the short arms of the achrocentric chromosomes and the frequency of NOR. However, a highly significant statistical difference was encountered in the distribution of the NOR variants, mainly represented by the Massive variant. These results agree with previous studies that reported a predominance of ND errors in maternal meiosis I. At present there is no sufficient experimental evidence of a relationship between the presence of the trisomy 21 with SA in parents and DS in the child. Considering the subjective nature of the NOR variants analysis, and the lack of uniformed criteria for their classification, further studies of this nature are necessary in order to establish the true relationship between DS and the parental ND in the extra chromosome 21 and the DS.

Key words: Nondisjunction; regions organizer nucleolar; satellite associations.

Introducción

El Síndrome de Down (SD) es la principal causa genética de retardo mental, con una tasa de ocurrencia estimada de 1:600 a 1:800 nacidos vivos. Su alta frecuencia y su gran importancia clínica hace que ésta sea la anomalía cromosómica más extensamente estudiada en humanos (1-10).

Aproximadamente, el 95% de los casos tienen 47 cromosomas y se deben a la no disyunción (ND) meiótica del par de cromosomas 21 en alguno de los padres. El resto se deben generalmente a translocaciones Robertsonianas, mosaicos o trisomías parciales (11-15).

A pesar de las extensas investigaciones realizadas, muy poco se conoce acerca de los mecanismos que determinan la ND; por esta razón, es importante identificar el padre en quien ocurrió y la fase meiótica, así como también determinar algunos factores de riesgo para su ocurrencia. Esto permite evaluar el papel de los múltiples factores etiológicos que han sido implicados en la segregación inadecuada de los cromosomas tales como: consanguinidad, presencia de un determinado haplotipo de ADN, edad materna, exposición a rayos X, desbalance hormonal, frecuencias de recombinación disminuidas, variantes en las regiones organizadoras nucleolares, asociación de satélites. Además, permite identificar aquellos individuos que poseen

un riesgo elevado de tener un hijo con SD u otras trisomías asociadas con ND (16).

En este trabajo se determinó el origen parental de la ND del cromosoma 21 extra en pacientes afectados con SD y se estableció la fase meiótica de la ocurrencia de la ND en los padres. Se evaluó también la importancia de las asociaciones de satélites (AS) y de las variantes en las regiones organizadoras nucleolares (NOR) como factores de riesgo para la ND de este cromosoma.

Materiales y métodos

Se estudiaron 28 familias (28 padres, 28 madres, y 28 afectados para un total de 84 individuos) con al menos un hijo afectado con SD; que asistieron a la consulta de asesoramiento genético de la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia durante los años 1993 a 1994. Se obtuvieron muestras de sangre periférica heparinizada de la madre, el padre, el afectado y de 40 individuos normales (testigos) de ambos sexos sin historia familiar de anomalías cromosómicas. Los pacientes seleccionados correspondían todos a trisomía 21 libre y se excluyeron los casos de translocaciones y/o mosaicos si ello fuera el caso.

Para la obtención de cromosomas las muestras se cultivaron según la técnica de Moorhead (17, 18). Se realizó bandeo Q siguiendo la técnica de Caspersson (19). Se estudiaron 20 metafases por cada individuo, fotografiándose 10 de ellas. Para el copiado se utilizó el método de Overton y cols. (20) de impresión secuencial. El origen parental y la fase meiótica se asignaron por acuerdo entre tres observadores independientes. Posteriormente, las láminas se colorearon con nitrato de plata al 50% (bandas Ag-NOR), según Bloom y Goodpasture (21).

Se registró la presencia de AS, número total de NOR y por grupo de cromosomas acrocéntricos. Las variantes NOR se clasificaron de acuerdo a los criterios establecidos por

Serra y Bova (22) que se describen a continuación: ausencia de NOR, NOR simple indistinta (SI): una sola NOR de tamaño normal, ligeramente variable; debido a la aposición de los tallos. NOR simple (S): dos NOR claramente distinguibles, una por tallo de tamaño normal o muy pequeño. NOR masiva (M): generalmente una sola NOR, la cual aparece notablemente agrandada pero algunas veces puede aparecer como dos grandes NOR yuxtapuestas o solapadas. NOR doble (D): dos NOR claramente separadas, localizadas a diferentes niveles a lo largo del tallo. En metafases pueden aparecer como 2 o 4 de acuerdo al grado de aposición de los dos brazos del cromosoma.

Resultados

En la Tabla 1 se presentan los resultados del origen parental y fase meiótica de la ND del cromosoma 21 extra. La misma solo incluye los casos informativos para ambas variables estudiadas lo cual representó el 85,7%. Se observa que la mayoría de los errores de ND ocurren en meiosis I materna (66,6%) y el 25% ocurren en meiosis I paterna, los errores en meiosis II materna o paterna son poco frecuentes, 4,2% en cada caso.

En la Tabla 2 se presentan los tipos de AS entre los brazos cortos de los diferentes cromosomas acrocéntricos: D/D, D/G, G/G. Puede apreciarse que entre los grupos estudiados (padres de pacientes con SD y testigos) la distribución de los distintos tipos de AS no fue estadísticamente significativa ($\chi^2_{[2]} = 3,78; p > 0,1$).

En cuanto a la presencia o ausencia de NOR en los cromosomas del grupo D se observó que predominaba la presencia de éstos tanto en los padres de pacientes con SD 845/1193 (70,8%) como en los testigos 793/1055 (75,2%). Resultados similares se observaron para los cromosomas acrocéntricos del grupo G 549/801 (68,5%) y 484/708 (68,4%) respectivamente. Las pequeñas dife-

Tabla 1
No disyunción del cromosoma 21
Origen parental y fase meiótica

FM	OP		MAT		PAT		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
MI	16	66,6	6	25,0	22	91,6		
MII	1	4,2	1	4,2	2	8,4		
Total	17	70,8	7	29,2	24	100,0		

F. de I.: UGM-LUZ

FM: fase meiótica. MI: meiosis I. MII: meiosis II.

OP: origen parental. MAT: materno. PAT: paterno.

Tabla 2
Regiones organizadoras nucleolares.
Asociaciones de satélites

MTA	TA		D/D		D/G		G/G		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
P	31	45,6	30	44,1	7	10,3	68	100		
T	25	39,7	36	57,1	2	3,2	63	100		

F. de I.: UGM-LUZ

MTA.: muestra P: padres = T: testigos = T.A: tipo de asociación.

rencias encontradas para ambos grupos cromosómicos no fueron estadísticamente significativas. ($\chi^2_{[1]} = 5,33$; $0,05 < P < 0,10$ y $\chi^2_{[1]} = 0,0058$; $p > 0,9$).

La Tabla 3 presenta los tipos de variantes observadas sobre cromosomas acrocéntricos del grupo D; la más frecuente en los padres de los pacientes fue la simple indistin-

ta (SI) 41,1%, el segundo lugar lo ocupa la variante masiva (M) 31,1%, seguida de la simple (S) 27,6% y por último, la doble (D) 0,2%. En el grupo testigo la variante SI (57,1%) fue la más frecuente seguida de la S (33,8%), M (8,1%) y por último, la D (1%).

La Tabla 4 presenta el tipo de variante observada en los cromosomas acrocéntricos

Tabla 3
Variantes de las regiones organizadoras nucleolares.
Cromosomas grupo D.

MTA	TV		SI		S		M		D		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
P	347	41,1	233	27,6	263	31,1	2	0,2	845	100		
T	453	57,1	268	33,8	64	8,1	8	1,0	793	100		
Total	800	48,8	501	30,6	327	20,0	10	0,6	1638	100		

F. de I.: UGM-LUZ.

MTA: muestra. P: padres. T: testigos. TV: tipo de variante.

SI: simple indistinta. S: simple. M: masiva. D: doble.

Tabla 4
Variantes de las regiones organizadoras nucleolares.
Cromosomas grupo G.

MTA	TV		SI		S		M		D		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
P	181	33,0	174	31,7	193	35,2	1	0,1	549	100		
T	248	51,2	178	36,8	57	11,8	1	0,2	484	100		
Total	429	41,5	352	4,1	250	24,2	2	0,2	1033	100		

F. de I.: UGM-LUZ

MTA: muestra. P: padres. T: testigos. TV: tipo de variante.

SI: simple indistinta. S: simple. M: masiva. D: doble.

del grupo G. En los padres de pacientes la variante más frecuente fue la M (35,2%), luego le sigue la SI (33,0%), S (31,7%) y por último la D (0,1%), mientras que en el grupo testigo la variante más frecuente fue la SI (51,2%) seguida de la S (36,8%), M (11,8%), y D (0,2%).

La distribución de la información obtenida de acuerdo al tipo de variantes NOR para ambos grupos fue altamente significativa ($\chi^2_{[3]} = 139,6$; $p < 0,01$ y $\chi^2_{[3]} = 102,6$; $p < 0,01$), para los cromosomas del grupo D y G, respectivamente.

Discusión

Desde hace más de 20 años los heteromorfismos cromosómicos han sido utilizados por diferentes grupos de investigadores de varios países para estudiar el origen parental y la fase meiótica de la ND del cromosoma 21 extra en el SD. Sin embargo, hasta ahora ningún estudio de este tipo ha sido reportado en Latinoamérica.

De acuerdo a nuestros resultados, los casos derivados de origen materno fueron 70,8% mientras que los paternos representan el 29,2%. Estos resultados son similares a los reportados por algunos autores (Tabla 5). A pesar de la similitud total de resultados para los errores en meiosis I materna se observaron algunas discrepancias en la proporción de casos para la meiosis II materna y meiosis I y II paternas, excepto entre este y el trabajo

reportado por Dagna-Bricarelli y cols. (16). Todos los datos publicados del origen parental del cromosoma 21 extra están de acuerdo en que la ND materna es la causa más común de trisomía 21 en el humano, pero las proporciones atribuidas a las diferentes fases meióticas del origen parental varía en algunos estudios (23-27). Sin embargo, las pequeñas discrepancias observadas en las diferentes publicaciones pueden atribuirse a variaciones en la interpretación de la información (28,29), diferencias reales entre poblaciones (27) o a la metodología empleada en los diferentes trabajos.

Actualmente la determinación del origen parental y fase meiótica de la ND del cromosoma 21 extra en el SD se determina por medio de técnicas moleculares las cuales utilizan sondas de ADN específicas para el cromosoma 21, altamente polimórficas tales como repeticiones en series de número variable (VNTR) o iniciadores para realizar reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifican secuencias cortas repetidas. Estos estudios indican que aproximadamente el 94-95% de los casos son de origen materno (2, 5, 30-32). Sin embargo, el hecho de que se hayan observado algunas discrepancias entre estudios citogenéticos y moleculares, no invalida los estudios que utilizan heteromorfismos cromosómicos, solo indica que estos últimos deben ser interpretados cuidadosamente (10).

Tabla 5
Resumen de los trabajos reportados sobre la determinación del origen parental y fase meiótica del cromosoma 21 extra en el Síndrome de Down

Reportes	Error meiótico materno				Error meiótico Paterno				Total
	I	%	II	%	I	%	II	%	
Magenis y Col. (1980).	120	60,9	31	15,7	23	11,7	23	11,7	197
Mikkelsen y Col. (1980).	49	67,1	12	16,4	10	13,7	2	2,7	73
Robert y Callow (1980).	4	66,6	1	16,7	1	16,7	0	--	6
Jongbloet y Col. (1981).	35	54,7	16	25,0	6	9,4	7	10,9	64
Jacob y Mayer. (1981).	11	68,7	3	18,7	0	--	2	12,5	16
Meanning y Col. (1981).	8	66,7	0	--	2	16,7	2	16,7	12
Del Mazo y Col. (1982).	17	63,0	3	11,1	6	22,2	1	3,7	27
Dagna B. y Col. (1990).	168	68,0	14	5,7	55	22,3	10	4,0	247
Total de la literatura	412	64,2	80	12,5	103	16,0	47	7,3	642
Presente estudio	16	66,6	1	4,2	6	25,0	1	4,2	24
Total	428	64,2	81	12,2	109	16,4	48	7,2	666

Por otra parte las técnicas moleculares tienen algunas limitaciones para determinar la fase meiótica donde ocurrió la ND, ya que actualmente no existen marcadores centroméricos sino marcadores proximales ubicados a 5-10 cM del centrómero (31-34). Por lo tanto, es posible que se realicen asignaciones erróneas de la fase meiótica. Lorber y cols. (1992) indicaron que mientras el origen parental de la trisomía 21 puede ser evaluado con exactitud a través de técnicas moleculares, la fase meiótica en la cual ocurrió el error no puede ser definitivamente evaluado con los marcadores de ADN actualmente disponibles (33).

Es importante en futuros estudios analizar un gran número de familias mediante combinación de técnicas citogenéticas y moleculares hasta tanto se identifiquen sondas

centroméricas y para el brazo corto del cromosoma 21 que sean altamente polimórficas y específicas, y de esta manera tratar de contribuir al esclarecimiento del mecanismo que influye en la ND meiótica del cromosoma 21 (10, 34).

En cuanto a la AS de cromosomas acrocéntricos Ferguson-Smith y Handmarker indicaron que las AS entre los brazos cortos pueden formar interacciones a través de las NOR (35-37). Por otro lado, Mattei y cols. (1974) y Hansson (1979) indicaron que las AS y específicamente las asociaciones que involucran al cromosoma 21 se observan más frecuentemente en padres de pacientes con SD que en testigos (38, 39). Estos hechos han llevado a pensar que las AS tienen un papel importante en los eventos de ND que llevan a la trisomía 21.

Nuestros hallazgos son similares a los reportados por Cook y Curtis (1974) y Taysl (1975), ya que no se encontraron diferencias significativas para la frecuencia de AS entre padres de pacientes con SD y testigos (40, 41). Estos resultados sugieren que no existe relación entre la AS y riesgo elevado para la ND del cromosoma 21.

En relación con las NOR en 1960, Polani (42) sugirió que la persistencia de éstas podría interferir con el proceso de apareamiento normal, llevando posteriormente, a la mala segregación de univalentes en meiosis I. Desde entonces se ha postulado que la presencia de NOR puede estar implicada en los procesos de ND que involucren los cromosomas acrocéntricos (43).

En 1985, Jackson-Cook (44) sugirió que la presencia de una variante, NOR doble, sobre cromosomas acrocéntricos cumplía un papel importante en la ND meiótica y que los padres que portaban dicha variante tenían un riesgo 20 veces mayor de tener un hijo con SD. Posteriormente otros autores han tratado de corroborar esta hipótesis sin encontrar evidencias a su favor (22, 42, 45, 46).

Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por Spinner (1989) y Serra y Bova (1990), ya que la frecuencia de la variante NOR doble no estuvo incrementada en los padres de pacientes con SD en relación con los testigos (22, 45). Sin embargo, encontramos diferencias altamente significativas entre ambos grupos estudiados para las variantes NOR, fundamentalmente a expensas de la masiva (M).

Estos hallazgos son de difícil interpretación debido a las diferencias metodológicas o clasificaciones de las variantes NOR utilizadas en los diferentes trabajos. La clasificación utilizada aquí es una de las más detalladas y con el menor grado de subjetividad, excepto para las variantes tipo SI y M. La primera, que se define como un solo NOR de tamaño normal y la segunda, como uno de tamaño agrandado puede sin duda conducir a errores en la clasificación de los casos y a la inclusión de

doble NOR no bien definidos dentro de la variante masiva. Además, se han reportado otros factores inherentes a la tinción con plata que aumentan el grado de dificultad, tales como: la cantidad de ADN ribosómico en un organizador nucleolar el cual puede variar grandemente en diferentes individuos, la actividad transcripcional la cual puede cambiar en el curso de la diferenciación celular, y el procedimiento de tinción con plata es capaz de inducir a variabilidad en diferentes meta-fases e incluso en la misma preparación cromosómica (46-49).

A pesar de los resultados obtenidos en este trabajo que sugieren una relación de las variantes NOR, en particular, la variante masiva con la ND del cromosoma 21, no es posible establecer una conclusión definitiva hasta tanto no se realicen otros estudios con el establecimiento previo de criterios uniformes para la clasificación de las variantes que permitan y faciliten la comparación entre los distintos trabajos. La posible relación de las NOR y la ND cromosómica no ha sido dilucidada hasta ahora, motivo por el cual es muy arriesgado basar el asesoramiento genético en las variantes NOR para predecir el riesgo en parejas con este tipo de problemas. Finalmente, es importante continuar con estos estudios hasta tanto se esclarezca la naturaleza de esta asociación.

Agradecimiento

Nuestro agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por el financiamiento de este trabajo, al personal médico de la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia por el envío de los pacientes, a Julia Molina por su orientación en el análisis de las NOR y a María Diez de Edwal por la elaboración del resumen en inglés.

Referencias bibliográficas

1. ANGELL R., KIAN J., KEITH J., LEDGER W., BAIRD D. *Cytogenet Cell Genet* 65: 194-202, 1994.
2. ANTONARAKIS S. *Am J Hum Genet* 50: 544-550, 1992.
3. FUENTES J., PRITCHARD M., PLANAS A., BOSCH A., FERRER I., ESTIVILL X. *Hum Mol Genet* 4: 1935-1944, 1995.
4. HAMERS A., MEYER H., JONBLOED R., VAN DER HULST W., GERAEDTS J. *Clin Genet* 37: 463-469, 1990.
5. HENDERSON D., SHERMAN L., LOUGHNA S., BENETT P., MOORE G. *Hum Mol Genet* 3: 1373-1376, 1994.
6. MUTCHINICK O., LISKER R., BABISNSKY V. *Bol Hosp Infant Mex* 48: 534-537, 1991.
7. PINEDA L., CHACON I., VILLALOBOS M. *Act Cientific Venez* 42: 134-137, 1991.
8. PINEDA L. El estudio del origen parental del cromosoma 21 extra en el Síndrome de Down: estado actual. Memoria del **V Congreso Venezolano de Genética**. Venezuela, pp. 91-107, 1992.
9. SHERMAN S., PETERSEN M., FREEMAN S., HERSEY J., PETTAY D., TAFT L., FRANTZEN M., MIKKELSEN M., HASSOLD T. *Hum Mol Genet* 3: 1529-1535, 1994.
10. TAKAESU N., JACOBS P., BLACKSTON R., FREEMAN S., NUCCIO J., KURNIT D., UCHIDA I., FREEMAN V., HASSOLD T. *Am J Med Genet* 7: 175-181, 1990.
11. EARLE E., SHAFFER L., KALITSIS P., McQUILLAN C., DALE S., CHOO A. *Am J Hum Genet* 50: 717-724, 1992.
12. KOREMBERG R., KAWASHIMA H., PULST M., OWASAWARA N., YAMAMOTO K., SHOMBERG S., WEST R., ALLEN L., MAGENIS E., IKAWA K., TANIGUSHI N., EPSTEIN J. *Am J Hum Genet* 47: 236-246, 1990.
13. SAYEE R., THOMAS I. *Ann Génét* 36: 171-172, 1993.
14. THOMPSON W., McINNES R., WILLARD F. *Genetics in Medicine*, Saunders Company, Philadelphia, pp. 500, 1991.
15. YUNIS J., CHANDLER M. *Citogenética en Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio*, Todd Sanford-Davidsohn, 7ma Edición, Salvat, Barcelona (España), pp. 832, 1984.
16. DAGNA-BRICARELLI F., PIERLUIGI M., GRASSO M., STRIGINI P., PERRONI L. *Am J Med Genet* 7: 129-132, 1990.
17. MOORHEAD P., NOWELL P., MELLMAN W., BATTIPS D., HUNGERFORD D. *Exp Cell res* 20: 613-616, 1990.
18. SCHAEFFER-HACK M., LAWCE H. *Cytogenetics Laboratory Manual*, The Association of Cytogenetics Technologists, San Francisco, California, 1980.
19. CASPERSON T., HULTEN M., LINDSTEN J., ZECH L. *Exp Cell Res* 63: 240-243, 1970.
20. OVERTON K., MAGENIS R., BRADY T., CHAMBERLIN J., PARKS M. *Am J Hum Genet* 28: 417-419, 1976.
21. BLOOM S., GOODPASTURE C. *Hum Genet* 34: 199-206, 1976.
22. SERRA A., BOBA R. *Am J Med Genet* 7: 169-174.
23. DEL MAZO J., CASTILLO A., ABRISQUETA J. *Hum Genet* 63: 316-320, 1982.
24. JACOBS P., MAYER M. *Ann Hum Genet* 45: 357-365, 1981.
25. JUBERG R., MOWREY P. *Am J Med Genet* 16: 111-116, 1983.
26. MANNING C., GOODMAN H. *Hum Genet* 59: 101-103, 1981.
27. MIKKELSEN M., POULSEN H., GRINSTED J., LANGE A. *Ann Hum Genet* 44: 17-28, 1980.
28. LANGENBECK V., HANSMANN I., HINNEY B., HONIN V. *Hum Genet* 33:89-102, 1976.
29. MATTEI J., AYME S., MATTEI M., GIRAUD F. *J Med Genet* 17: 368-372, 1980.
30. ANTONARAKIS S. *N Engl Med* 324: 672-676, 1990.
31. SHERMAN S., TAKAESU N., FREEMAN S., GRANTHAM M., PHILLIPS C., BLACKSTON R., JACOBS P., COCKWELL E., FREEMAN V., UCHIDA I., MIKKELSEN M., KURNIT D.,

- BURACZYNSKA M., KEATS B., HASSOLD T. *Am J Hum Genet* 49: 608-620, 1991.
32. ZARAGOZA M., JACOBS P., ROGAN P., SHERMAN S., HASSOLD T. *Human Genet* 94: 411-417, 1994.
33. LORBER B., GRANTHAM M., HUNTINTONG F., HASSOLD T. *Am J Hum Genet* 51: 1265-1276, 1992.
34. PETERSEN M., FRANTZEN M., ANTONARAKIS S., WARREN A., VAN BROECKHHOVEN C., CHAKRAVARTI A., COX T., LUND C., OLSEN B., POULSEN H., SAND A., TOMMERUP N., MIKKELSEN N. *Am J Hum Genet* 51: 516-525, 1992.
35. GREEN J., RESENBAUM K., RAPOPORT S., SCHAPIROAND B. *Clin Genet* 35: 243-250, 1989.
36. MILLER D., TANTRAVAHU R., DEV V., MILLER O. *Am J Hum Genet* 29: 490-502, 1977.
37. SIGMUND J., SCHWARZACHER H., MIKEL-SAR A. *Hum Genet* 50: 81-91, 1979.
38. HASSON ALF. *Hereditas* 90: 59-83, 1979.
39. MATTEI J., MATTEI M., AYME S., GIRAUD F. *Humangenetik* 23: 279-287, 1974.
40. COOK P., CURTIS D. *Humangenetik* 23: 279-287, 1974.
41. TAYSI K. *Clin Genet* 8: 319-323, 1975.
42. HASSOLD T., JACOBS P., PETTAY D. *Hum Genet* 76: 381-384, 1987.
43. GAULDEN M. *Mutation Research* 296: 69-88, 1992.
44. COOK-JACKSON C., FLANERY D., CEREY L., NANCE W., BROWN J. *Am J Hum Genet* 37: 1049-1061, 1985.
45. SPINNER N., EUNPU D., SCHMICKEL R., ZACKAY E., McELDREW D., BUNIN G., McDERMID H., EMANUEL B. *Am J Hum Genet* 44: 631-638, 1989.
46. WANG-WUU S., CHERNG-KANG P., KUANG-DONG W. *Jpn J Human Genet* 37: 51-155, 1992.
47. GONZALEZ G., ROLON A., RIVERA H. *Ann Génét* 36: 221-223, 1993.
48. JOTTERAND BELLOMO M., VAN MELLE G. *Hum Genet* 59: 141-147, 1981.
49. ZAKHAROV A., DAVUDOV A., BENJUSH V., EGOLINA N. *Hum Genet* 60: 334-339, 1982.