

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira pela orientação, pelo apoio e pela confiança com que me tem brindado desde que iniciei o meu percurso profissional e com maior intensidade neste ano de trabalho. A quem agradeço incansavelmente e para sempre o meu crescimento profissional pela estimulação científica e pelo entusiasmo no meu trabalho e o meu crescimento pessoal pela amizade.

Ao professor Doutor Francisco Corte Real Gonçalves, pela disponibilidade, pela simpatia e pelas palavras de apreço e incentivo.

A todos os meus colegas e amigos de trabalho Alexandra, Ana Jardim, Ana Lourenço, Carla, José, Lúcia, Marta, Miguel, Nuno, Patrícia, Sónia e Susana pela ajuda incondicional que todos e cada um me deram, pelo apoio científico, pela amizade e por cada palavra de carinho e incentivo.

À equipa médica dos Serviços de Genética Médica e de Desenvolvimento do Hospital Pediátrico de Coimbra pelos casos apresentados neste estudo.

Aos meus irmãos, que estão sempre comigo, pelo amor, pelo carinho, pela amizade, por nunca me deixarem cair e fazerem parte de mim.

Aos meus pais, por me apoiarem desde sempre, pela educação que sempre me transmitiram e pelas palavras de conforto e amizade.

À minha avó pela fé, pelo cuidado e pela compreensão que sempre demonstrou e por todas as palavras de apoio e incentivo.

Aos meus amigos, que tenho como irmãos, pelo carinho, pela compreensão, por me fazerem rir quando o humor já está no limite e por tudo o que são para mim.

## Índice

|  | Página |
|--|--------|
| 1. Introdução  | 1      |
| 1.1. Défice Cognitivo  | 2      |
| 1.1.1. Definição e classificação                               | 2      |
| 1.1.2. Epidemiologia   | 3      |
| 1.1.3. Etiologia   | 3      |
| 1.1.4. Patologias associadas                                   | 7      |
| 1.1.5. Prognóstico e contexto sociocultural                    | 8      |
| 1.2. Autismo   | 10     |
| 1.2.1. Definição   | 10     |
| 1.2.2. Epidemiologia   | 10     |
| 1.2.3. Etiologia   | 11     |
| 1.2.4. Patologias associadas                                   | 12     |
| 1.2.5. Prognóstico   | 12     |
| 1.3. Medicina Legal  | 13     |
| 1.3.1. Clínica Médico-legal                                    | 13     |
| 1.3.2. Prova Pericial  | 14     |
| 1.3.3. Direito Penal   | 15     |
| 1.3.4. Ofensas à integridade física e maus tratos              | 15     |
| 1.3.5. Vítimas de maus tratos com défice cognitivo             | 17     |
| 1.3.6. Abuso sexual e crimes contra a autodeterminação sexual  | 19     |
| 1.3.7. Vítimas de abuso sexual com défice cognitivo            | 20     |
| 1.3.8. Agressores e abusadores com défice cognitivo            | 21     |
| 1.4. Citogenética, Biologia Molecular e Genómica               | 23     |
| 1.4.1. Citogenética Convencional                               | 23     |
| 1.4.2. Citogenética Molecular                                  | 24     |
| 1.4.3. Biologia Molecular                                      | 26     |
| 1.4.4. Genómica – Cariótipo Molecular                          | 27     |
| 1.4.5. Análise de fragmentos para o estudo do gene <i>FMR1</i> | 30     |
| 1.5. Objetivos do estudo                                       | 32     |
| 2. Materiais e Métodos   | 33     |
| 2.1. Amostragem  | 34     |
| 2.2. Métodos   | 36     |
| 2.2.1. Citogenética Convencional                               | 36     |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.2. Citogenética Molecular   | 37 |
| 2.2.3. Extração de DNA  | 38 |
| 2.2.4. Biologia Molecular   | 39 |
| 2.2.5. Genômica – Cariótipo Molecular                                 | 42 |
| 2.2.6. Análise de fragmentos para o estudo do gene <i>FMR1</i>        | 44 |
| 3. Resultados   | 46 |
| 3.1. Caracterização da amostra  | 47 |
| 3.2. Descrição de resultados de acordo com as metodologias utilizadas | 48 |
| 3.2.1. Citogenética Convencional                                      | 50 |
| 3.2.2. Biologia Molecular   | 57 |
| 3.2.3. Genômica – Cariótipo Molecular                                 | 66 |
| 3.2.4. Análise de fragmentos para o estudo do gene <i>FMR1</i>        | 77 |
| 3.2.5. Citogenética Molecular   | 80 |
| 4. Discussão  | 81 |
| 5. Conclusões   | 89 |
| 6. Referências Bibliográficas   | 91 |

## Lista de Tabelas

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Tabela 1. Correspondência entre as formas alélicas do gene e o número de repetições do trinucleótido CGG.   | 31            |
| Tabela 2. Combinação de dois, três e quatro testes aplicados por cada caso, nos 850 pacientes estudados.  | 35            |
| Tabela 3. Sondas aplicadas para a confirmação dos resultados alterados utilizando a metodologia de FISH.  | 38            |
| Tabela 4. Síndromes de microdeleção detetadas por MLPA (painel de sondas P245-A2, adaptado <i>MRC-Holland</i> , Amsterdão, Holanda).                                      | 41            |
| Tabela 5. Regiões estudadas pelos painéis de sondas P250-B1, P343-C1, ME028-B1, P036-E1 e P070-B2, utilizados neste trabalho.   | 42            |
| Tabela 6. Distribuição das alterações cromossômicas e genômicas encontradas pelas metodologias utilizadas neste estudo.   | 48            |
| Tabela 7. Alterações encontradas pela análise de citogenética convencional em 572 pacientes.  | 51            |
| Tabela 8. Casos com alterações detetadas pelas técnicas de MLPA, aCGH e análise de fragmentos no estudo dos 552 pacientes com cariótipo normal.                           | 56            |
| Tabela 9. Casos com alterações detetadas pela técnica de MLPA no estudo dos 684 pacientes.  | 58            |
| Tabela 10. Alterações submicroscópicas desequilibradas nos 14 casos detetados no estudo das regiões subteloméricas pela técnica de MLPA.                                  | 58            |
| Tabela 11. Alterações cromossômicas desequilibradas detetadas pelo painel de sondas as regiões críticas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação (P245-A2). | 59            |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 12. Alterações cromossômicas desequilibradas detetadas pelo painel de sondas, para as regiões críticas associadas a autismo (P343-C1).                    | 61 |
| Tabela 13. Alterações submicroscópicas das regiões subteloméricas detetadas pelos painéis de sondas <i>P036-E1</i> , <i>P070-B2</i> nos 416 pacientes estudados. | 63 |
| Tabela 14. Distribuição das 128 alterações de acordo com a sua origem, encontradas pela metodologia de aCGH.   | 68 |
| Tabela 15. Distribuição das alterações apresentadas pelos 99 pacientes estudados pela metodologia de aCGH.   | 68 |
| Tabela 16. Distribuição das 128 alterações pelo seu tamanho, caracterizadas pela metodologia de aCGH.  | 69 |
| Tabela 17. Distribuição das 128 alterações de acordo o tamanho e a origem.   | 70 |
| Tabela 18. Deleções localizadas em regiões críticas, associadas a síndromes de microdeleção.   | 72 |
| Tabela 19. Duplicações localizadas em regiões críticas, associadas a síndromes de microduplicação.   | 74 |
| Tabela 20. Alterações encontradas pela análise de fragmentos no estudo do gene <i>FMR1</i> nos 416 pacientes analisados.   | 77 |

## Lista de Figuras

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Cariograma humano de um indivíduo do sexo masculino (46,XY).   | 24     |
| Figura 2. Diagrama da metodologia de FISH.   | 25     |
| Figura 3. Diferentes etapas da técnica MLPA®.  | 26     |
| Figura 4. Esquema referente ao processo da metodologia de aCGH.  | 28     |
| Figura 5. Esquema representativo da localização e constituição do gene <i>FMR1</i> .   | 30     |
| Figura 6. Metafase de um indivíduo do sexo feminino (46,XX).   | 36     |
| Figura 7. Hibridização da sonda ( <i>SMCR</i> e <i>MDS/ILS</i> ) para a região crítica da síndrome de Smith-Magenis (17p11.2), num indivíduo do sexo feminino que apresenta um resultado normal, observado em cromossomas em metafase, como em interfase.              | 37     |
| Figura 8. (A) Eletroferograma de resultados normais através da aplicação da técnica de MLPA utilizando o painel de sondas para a região crítica 22q11.2 ( <i>salsa MLPA: P250-B1</i> ); (B) Análise dos resultados normais através do <i>software Coffalyser 9.4</i> . | 40     |
| Figura 9. Exemplos de formatos <i>Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray</i> ( <i>Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA</i> ), correspondendo as duas últimas lâminas, 180Kb e 60Kb, aos formatos utilizados neste estudo.                                  | 43     |
| Figura 10. Análise do cromossoma 13 sem alterações cromossómicas desequilibradas, originando um resultado normal obtido pela metodologia de aCGH.  | 44     |
| Figura 11. Resultado de análise do gene <i>FMR1</i> pela técnica de PCR de uma mulher com 2 alelos normais com 20 e 30 repetições CGG.   | 45     |

|   |    |
|---|----|
| Figura 12. Distribuição por sexo e idade (em anos) dos 850 pacientes da amostra do estudo.  | 47 |
| Figura 13. Distribuição das alterações cromossômicas desequilibradas encontradas nos pacientes envolvidos neste estudo.   | 49 |
| Figura 14. (A) Cariograma de uma mulher com cromossoma marcador; (B) Hibridização do cromossoma marcador pela sonda centromérica (DXZ1), revelando a sua origem no cromossoma X.  | 52 |
| Figura 15. (A) Cariograma de um indivíduo do sexo feminino com um anel do cromossoma 21; (B) Hibridização da mistura de sondas subteloméricas para os cromossomas 4 e 21, identificando uma deleção na região terminal do cromossoma 21 em anel; (C) Idiograma do cromossoma 21 com localização da deleção caracterizada pela citogenética molecular. | 53 |
| Figura 16. (A) Cariograma de indivíduo do sexo masculino com uma duplicação de origem paterna do braço longo do cromossoma 9; (B) Ideograma do cromossoma 9 com localização da região duplicada.  | 54 |
| Figura 17. (A) Cariograma de um indivíduo do sexo feminino portador de uma inserção parcial do braço longo do cromossoma 4(q13.1q13.3) no braço longo do cromossoma 21(q21); (B) Ideograma do cromossoma 4 com localização da duplicação caracterizada pela aCGH.   | 55 |
| Figura 18. Análise dos resultados do estudo por MLPA, através do painel de sondas <i>P245-A2</i> , num paciente com uma duplicação de um gene ( <i>SNAP29</i> ) em 22q11.2.   | 59 |
| Figura 19. Análise dos resultados do estudo por MLPA, através do painel de sondas <i>P250-B1</i> , num paciente com uma deleção <i>de novo</i> em 22q11.21, envolvendo 13 genes.  | 60 |
| Figura 20. Análise dos resultados do estudo por MLPA, através do painel de sondas <i>P343-C1</i> , num paciente com uma deleção de 4 genes em 15q13.2-q13.3.  | 61 |
| Figura 21. Análise dos resultados do estudo por MLPA, através do painel de sondas <i>P343-C1</i> , num paciente com uma deleção de sete genes em  | 61 |

16p11.2.

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 22. (A) Análise dos resultados do estudo de MLPA (painéis de sondas <i>P036-E1</i> , <i>P070-B2</i> ) numa paciente com uma deleção na região subtelo-<br>mérica no braço curto do cromossoma 4, envolvendo 2 genes; (B)<br>Confirmação da deleção da região subtelo-<br>mérica do cromossoma 4<br>recorrendo à técnica de FISH.  | 64 |
| Figura 23. (A) Análise dos resultados do estudo de MLPA (painéis de sondas <i>P036-E1</i> , <i>P070-B2</i> ) numa paciente com uma deleção na região sub-<br>telomérica no braço longo do cromossoma 7, envolvendo 1 gene; (B)<br>Confirmação do resultado recorrendo à FISH, verificando a ausência de sinal<br>de hibridização na região subtelo-<br>mérica.                                 | 65 |
| Figura 24. Análise do cromossoma 1 envolvendo quatro alterações <i>de novo</i> ,<br>uma duplicação de 2,4 Mb, uma deleção de 623 Kb, uma deleção de 6,7 Mb<br>e uma duplicação com 277 Kb pela metodologia de aCGH.  | 67 |
| Figura 25. (A) Análise de fragmentos no estudo do gene <i>FMR1</i> pela PCR,<br>sem amplificação devido ao elevado número de repetições CGG; (B) Análise<br>pela técnica de <i>Triplet Repeat Primed PCR Amplidex</i> , revelando mutação<br>completa num indivíduo do sexo masculino.   | 78 |
| Figura 26. (A) Análise de fragmentos no estudo das formas alélicas do gene<br><i>FMR1</i> pela técnica de PCR, revelando apenas um fragmento, que poderá<br>corresponder quer a uma mulher homocigótica normal quer a uma mulher<br>com mutação completa; (B) Análise pela técnica de <i>Triplet Repeat Primed<br/>PCR Amplidex</i> revelando mutação completa num indivíduo do sexo feminino. | 79 |

---

## Lista de Abreviaturas

AAMR – American Association on Mental Retardation

aCGH – array Comparative Genomic Hybridization

APA – American Psychological Association

ASA - Autism Society of America

CNV's – Copy Number Variations

CP – Código Penal

CPP – Código de Processo Penal

DC – Déficit Cognitivo

DECIPHER – Database o Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources

DGV – Database Genomic Variation

DGS – DiGeorge Syndrome

*dn – de novo*

DNA – Deoxyribonucleic acid

DSM-IV – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fourth Edition

ECARUCA – European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations

ELS – Encyclopedia of Life Sciences

FISH – Fluorescence *In Situ* Hybridization

*FMR1* – Fragile X Mental Retardation 1

FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

ICD-10 – International Classification of Diseases – 10th Edition

Kb – Kilobases

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

mat – materna

Mb – Megabases

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

mRNA – Messenger Ribonucleic Acid

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man

OMS – Organização Mundial da Saúde

pat – paterna

pb – Pares Base

PCR – Polymerase Chain Reaction

PWS/AS – PraderWilli Syndrome/Angelman Syndrome

QI – Quociente de Inteligência

RNA – Ribonucleic Acid

SMS – Smith-Magenis Syndrome

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

UTR – Untranslated Region

## Resumo

O défice cognitivo (DC) é um distúrbio com uma elevada prevalência na população. Tem um grande impacto na qualidade de vida da pessoa afetada, na família e na comunidade onde o indivíduo se insere, na sociedade, nos sistemas de educação e solidariedade social e mesmo no sistema legal. Deste modo a determinação da etiologia torna-se indispensável, tanto do ponto de vista familiar, económico e social como jurídico. O desenvolvimento da genética, nas áreas da citogenética, biologia molecular e da genómica propicia um estudo mais aprofundado e alargado de indivíduos com DC e distúrbios do comportamento de causa desconhecida. Deste modo pretendeu-se neste estudo: (I) Identificar e caracterizar as alterações genotípicas dos indivíduos pertencentes ao grupo de pacientes com défice cognitivo e distúrbios do comportamento estudados no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, referidos pelas consultas de Genética Médica e de Desenvolvimento do Hospital Pediátrico de Coimbra nos anos 2010 e 2011. (II) Estabelecer a correlação entre o genótipo e o fenótipo destes indivíduos de modo a demonstrar a causalidade das alterações encontradas. (III) Justificar e sustentar a importância de exames complementares de diagnóstico genético na avaliação feita pelo perito médico e na elaboração do relatório médico-legal, sempre que envolvam indivíduos (vítimas ou agressores) com défice cognitivo e distúrbios do comportamento. A realização deste trabalho permitiu detetar numa percentagem significativa de casos (15,7%) alterações no genótipo de indivíduos com DC e distúrbios do comportamento. Tornando-se o estudo citogenético, molecular e genómico um meio complementar de diagnóstico essencial, permitindo que se estabeleça uma prova da causalidade do DC e dos distúrbios de comportamento apresentados por estes indivíduos e se justifique o fenótipo apresentado pelos mesmos. Em resumo, com os resultados obtidos a partir desta investigação pode afirmar-se que o estudo citogenético, molecular e genómico é um meio de diagnóstico importante destes indivíduos quando avaliados nas perícias médico-legais, enquadrados em crimes de maus tratos e/ou abuso sexual.

## 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Déficit Cognitivo

### 1.1.1. Definição e classificação

O déficit cognitivo (DC) é caracterizado, de acordo com o DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fourth Edition*) e pela AAMR (*American Association on Mental Retardation*), como o funcionamento intelectual abaixo da média, com a existência de limitações e déficits significativos em duas ou mais áreas do comportamento adaptativo, que se manifestem antes dos 18 anos (Amaral et al., 2010; Karnebeek et al., 2005; Shea, 2006).

É descrito também como uma aprendizagem mais lenta do que a observada em indivíduos na mesma faixa etária, em que o grau de desenvolvimento mental está abaixo da média, com imaturidade emocional e dificuldades de memória (Henry, 2010; Rauch et al., 2006). Pode ainda ser definido como um atraso significativo em vários domínios do desenvolvimento, como a motricidade, a linguagem, a cognição, as competências sociais e pessoais e as atividades da vida diária (Ferreira, 2004).

Segundo o DSM-IV é classificado, de acordo com o Quociente de Inteligência (QI), em ligeiro, moderado, severo ou profundo. O QI é medido por testes padronizados de acordo com a idade, que permitem distinguir os vários graus de DC. Classificam-se como DC ligeiro os casos que possuem um QI entre os 50-70, moderado os que possuem um QI entre os 35-50, severo os que possuem um QI entre os 20-35 e profundo os que possuem um QI abaixo de 20 (Karnebeek et al., 2005; Rauch et al., 2006).

Segundo a AAMR a classificação é baseada nas dificuldades que os indivíduos apresentam nas diversas áreas de capacidades adaptativas (Karnebeek et al., 2005; Shea, 2006).

O DC pode ser subdividido em sindrómico, caracterizado por DC associado a dismorfismos, malformações ou alterações neurológicas e não sindrómico, que se define pela presença exclusiva de disfunção cognitiva, sem outro fenótipo associado (Basel-Vanagaite, 2008; Li & Andersson, 2009).

### **1.1.2. Epidemiologia**

O DC é um distúrbio frequente com grande impacto no quotidiano da pessoa afetada, na sua família, na comunidade em que esta se insere e até mesmo na sociedade. A prevalência mundial de DC varia entre 1 e 4%, o que poderá ser explicado pela dificuldade no diagnóstico e na avaliação dos indivíduos afetados, especificamente nos níveis de comprometimento cognitivo e funcional (Bertelli et al., 2012; Maulik et al., 2011; Shea, 2006).

Entre os indivíduos com DC, King (citado por Maulik et al., 2011) refere que o DC ligeiro afeta cerca de 85% dos casos, o moderado cerca de 10%, o grave cerca de 4%, e o profundo cerca de 2%.

Verifica-se uma maior frequência de DC no sexo masculino do que no feminino numa proporção de 1,4:1 (Shea, 2006).

Está descrito que 3% das crianças em idade escolar possuem DC ligeiro/moderado, enquanto 0,38% possui DC severo/profundo (Basel-Vanagaite, 2008). Crianças com DC severo ou profundo, devido à gravidade dos quadros clínicos que apresentam, são identificados mais precocemente, geralmente antes dos 6 anos de idade, em contrapartida as que possuem DC ligeiro ou moderado podem não ser reconhecidas até que integrem o 1º ciclo de escolaridade (Shea, 2006).

### **1.1.3. Etiologia**

O DC pode ter diferentes etiologias sendo a biológica descrita como a mais comum. No entanto há muitos fatores sociais e culturais que podem agravar ou atenuar este problema, o que implica que o indivíduo deve ser avaliado em contexto (Amaral et al., 2010; Matson et al., 2012).

Karnebeek (2005) e colaboradores descrevem que as causas de DC têm uma frequência variável em que os fatores ambientais são responsáveis por 18,6 a 44,5% dos casos e os fatores genéticos por 17,4 a 47,1%. Esta elevada variabilidade deve-se a diferenças nos critérios de diagnóstico, distintas populações em estudo, divergências nos critérios de seleção de pacientes e diversidade dos protocolos e tecnologias utilizados na deteção destes casos.

A pesquisa de uma etiologia é complexa, devido designadamente à variabilidade de fenótipos associados ao DC e alguns estudos referem até que permanece desconhecida em cerca de 80% dos casos (Rauch et al., 2006; Shea, 2006). No entanto, a combinação de uma boa avaliação clínica com metodologias de diagnóstico adequadas permite que uma causa possa ser estabelecida em aproximadamente 50% dos casos. Esta taxa de sucesso depende da idade dos pacientes, da sua seleção e do diagnóstico realizado (Karnebeek et al., 2005).

O diagnóstico clínico deve ser expositivo e incluir a enumeração das capacidades cognitivas e do comportamento adaptativo, os fatores etiológicos, as patologias associadas e a sua coexistência. Deve igualmente referir os aspetos comportamentais, psicológicos e emocionais e as condições ambientais e do contexto sociofamiliar (Ferreira, 2004).

A anamnese e um exame físico completo auxiliam na identificação de uma etiologia possível. A entrevista deve incluir a história familiar, pré-natal, perinatal e eventos neonatais, histórico de doenças, sobretudo neurológica e a descrição detalhada do desenvolvimento e do comportamento (Karnebeek et al., 2005; Shea, 2006).

Uma vez que o DC quando associado a dismorfismos ou outras malformações pode direcionar o diagnóstico para uma determinada síndrome genética, o exame físico deve ser detalhado, incluindo alterações no crescimento, na estatura, marcas ou manchas na pele, fâcias incomum e alterações esqueléticas, assim como deve ser relatada a presença de anomalias cardíacas ou em outros órgãos. Devem ainda ser feitos exames de visão e audição devido à prevalência de défices sensoriais associados ao DC (Karnebeek et al., 2005; Shea, 2006).

No diagnóstico é essencial a distinção entre uma lesão estática ou progressiva, bem como os antecedentes clínicos que podem indicar uma causa genética, ou alterações neurológicas, ou ainda uma lesão pré ou perinatal (Ferreira, 2004).

Em casos de regressão do desenvolvimento pode colocar-se a hipótese de doença neurometabólica ou neurodegenerativa e se o DC coexistir com baixa estatura, malformação sistémica e orgânica pode ser indicativo de uma patologia do sistema nervoso central que cause o DC (Karnebeek et al., 2005; Shea, 2006).

Os testes genéticos utilizados no diagnóstico etiológico são muitas vezes direcionados de acordo com o observado no diagnóstico clínico (Karnebeek et al., 2005; Shea, 2006). A presença de dismorfismos aumenta a probabilidade de encontrar alterações cromossômicas desequilibradas e justifica, nestes pacientes, a realização dos testes citogenéticos. Contudo, estes devem ser realizados independentemente da presença de dismorfismos porque 4 em cada 10 casos de DC sem dismorfismos apresentam alterações cromossômicas (Karnebeek et al., 2005; Schinzel, 2001; Shea, 2006).

A síndrome de Down é a alteração cromossômica mais frequente e resulta da trisomia de todo ou parte do cromossoma 21 (Patterson & Lott, 2011; Rachidi & Lopes, 2007; Rauch et al., 2006). A taxa de detecção da citogenética convencional varia entre 3 a 15%, dependendo dos critérios de inclusão dos indivíduos estudados, como é evidenciado pelo aumento que se verifica quando se inserem pacientes com síndrome de Down (Hochstenbach et al., 2009; Rauch et al., 2006).

A síndrome de X-Frágil é descrita como a segunda causa genética mais comum (Kehrer-Sawatzki, et al., 2006; Raymond, 2006; Sherman, et al., 2005; UKPMC Funders Group, 2009), afetando 1:4000 homens e 1:8000 mulheres (Hantash, et al., 2010; Sherman, et al., 2005). Esta síndrome é causada pela expansão de uma repetição do trinucleótido CGG do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) localizado em Xq27.3 (Pandey et al., 2004; Sherman, et al., 2005).

No âmbito da citogenética várias metodologias têm vindo a ser desenvolvidas com o objetivo de aumentar a detecção de alterações genéticas nos indivíduos com DC. Exemplos destas técnicas são: a FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), o MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) e o aCGH (*array-Comparative Genomic Hybridization*). A percentagem de casos positivos obtidos depende das metodologias utilizadas e da amostra populacional em que são aplicadas.

Os rearranjos desequilibrados nas regiões subteloméricas são responsáveis por 3 a 10% dos casos de DC (Ahn et al., 2007; Balikova et al., 2007; Koolen et al., 2004; Lam et al., 2006; Rooms et al., 2005; Stegmann et al., 2008). O estudo destas regiões foi possível inicialmente devido à evolução da tecnologia de FISH e recentemente com o desenvolvimento do MLPA.

O desenvolvimento na área da genómica proporcionou um aumento da taxa de deteção de alterações genéticas desequilibradas (deleções e duplicações) até 25% (Vissers et al., 2010), ou seja, através do cariótipo molecular obtido com o aCGH foi possível uma diminuição significativa dos casos de etiologia desconhecida em indivíduos com DC.

As alterações metabólicas compreendem um subgrupo causal importante de DC com uma frequência de 1 a 5%, são na sua maioria síndromes autossómicas recessivas e podem ser caracterizadas por regressão neurológica, fácies grosseira, hepatoesplenomegalia e alterações na visão ou audição (Basel-Vanagaite, 2008; Karnebeek et al., 2005).

A presença de alterações genéticas tem consequências, não só no acompanhamento clínico do paciente com DC, como também para os familiares, particularmente no seguimento de futuras gestações de um casal com um filho com esta patologia (Straetmans, et al., 2006).

O aconselhamento genético e o acompanhamento destes indivíduos e das suas famílias são fundamentais, pois é essencial a realização dos exames diagnósticos adequados e a prestação dos esclarecimentos necessários sobre os respetivos resultados e suas implicações. O diagnóstico e a compreensão das diferenças de desenvolvimento destas crianças é importante para se poderem perceber os seus comportamentos e limitações, providenciando sistemas de apoio e suporte (Schieve et al., 2012).

Quando não se determina uma etiologia, o processo que envolve a abordagem clínica e a metodologia de investigação pode tornar-se extenso, complexo, invasivo e uma sobrecarga para o indivíduo, para a sua família, seus cuidadores e para a comunidade.

Quando o recurso às diferentes tecnologias disponíveis não permite a obtenção de um diagnóstico há que equacionar a possibilidade de outros estudos utilizando outras metodologias.

Pessoas com DC devem ser sinalizadas e orientadas para receberem as medidas de reabilitação adequadas ao seu grau e tipo de limitação. Apesar de não ter tratamento, o desenvolvimento de terapias que contribuem para melhorar a aprendizagem, o desenvolvimento cognitivo e a memória destes indivíduos é essencial

e pode permitir futuramente a melhoria da sua qualidade de vida (Crego, et al., 2011; Ferreira, 2004).

#### **1.1.4. Patologias associadas**

A prevalência de estados deficitários e de doença é superior em indivíduos com DC do que na população em geral exigindo maiores cuidados de saúde e de acompanhamento por parte dos pais e dos serviços médicos e de assistência (Hsu et al., 2012; Oeseburg et al., 2010; Schieve et al., 2012; Straetmans, 2006).

A presença de défices sensoriais ocorre em 2% de casos com DC ligeiro e 11% com DC severo e a paralisia cerebral em 6 a 8% de casos com DC ligeiro e 30% com DC severo (Shea, 2006).

As perturbações no sono em indivíduos com DC têm uma frequência que varia entre 8,5 a 34,1%, estando estas geralmente associadas a doenças respiratórias, deficiência visual, condições psiquiátricas e medicação administrada pelos pacientes (Wouw et al., 2012).

Indivíduos com DC têm uma incidência elevada de distúrbios do comportamento em comparação com a população em geral (Cook & Oliver, 2011; Horovitz et al., 2011; Nieuwenhuijzen & Vriens, 2011; Poppes et al., 2010). No que diz respeito à associação de DC com o autismo estima-se que esta se verifica em 20 a 30% dos casos (Shea, 2006).

Relativamente à alteração neurocomportamental de défice de atenção e hiperatividade, caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, esta encontra-se presente em 9 a 15% indivíduos com DC (Kozlowski et al., 2011; Matson et al., 2012; Shea, 2006; Spencer et al., 2007; Trujillo-Orrego et al., 2012). Adultos com história de défice de atenção e hiperatividade na infância possuem uma maior probabilidade de ter comportamentos anti-sociais e criminais (American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 2007). O estabelecimento da correlação entre os distúrbios do comportamento e o DC é complexo devido à sobreposição de sintomas entre eles.

A depressão, a ansiedade, a doença bipolar e as psicoses são distúrbios psiquiátricos que também podem estar associados a DC (Irazabal et al., 2012;

Kozlowski et al., 2011). O diagnóstico psiquiátrico nestes casos é um processo crítico, porque existe dificuldade em estabelecer critérios de avaliação e distinção entre estas patologias (Bertelli et al., 2012; Myrbakk & Tetzchner, 2008).

#### **1.1.5. Prognóstico e contexto sociocultural**

O prognóstico, embora variável e nem sempre coincidente com o QI, torna-se mais claro ao longo do tempo de acordo com o desenvolvimento das capacidades adaptativas do indivíduo. Estas, tal como a presença de autismo, paralisia cerebral, défices sensoriais e outros distúrbios do comportamento, podem ter influência significativa na independência e empregabilidade (Shea, 2006).

Uma análise do comportamento pode identificar potenciais fatores ambientais, que podem ser modificáveis e esclarecer as competências que precisam de ser ensinadas ao indivíduo, familiares e cuidadores (Nieuwenhuijzen & Vriens, 2011).

Para uma boa interação entre indivíduos é essencial o desenvolvimento de processos cognitivos que permitam processar e interpretar as interações e a informação social. No caso das crianças com DC ligeiro a moderado estas capacidades de cognição encontram-se diminuídas dificultando as interações sociais. A abordagem e o estudo das capacidades cognitivas permitem uma melhor compreensão das limitações destas crianças promovendo uma melhor perceção por parte dos pais e educadores (Nieuwenhuijzen & Vriens, 2011; Cook & Oliver, 2011).

As novas políticas de saúde, que visam a desinstitucionalização de indivíduos com DC e distúrbios do comportamento, tornam o papel da família central para o modelo biopsicossocial de saúde e bem-estar destes indivíduos (Martorell et al., 2011; Scior, 2011).

A sobrecarga familiar nestes casos é complexa, que inclui vários fatores, desde as rotinas familiares, ao número de horas de cuidado e despesas (Irazabal et al., 2012).

A falta de autonomia e de independência de indivíduos com DC coloca aos progenitores várias questões, no âmbito da educação e dos cuidados de saúde (Mitchell, 2012).

No entanto, o envolvimento e dedicação por parte dos pais e familiares podem contribuir positivamente para uma melhor integração social, na escola e na comunidade (Szumski & Karwowski, 2012).

A integração e inclusão destes indivíduos na comunidade, em condições adequadas, proporcionam um maior desenvolvimento das suas capacidades, evitando o trauma da institucionalização (Thorn, et al., 2009).

Compreender a relação entre estes indivíduos e a comunidade e reconhecer os conhecimentos, atitudes e crenças associadas ao DC, presentes na sociedade, podem ajudar a identificar potenciais dificuldades à inclusão social, a reação do público em geral para com estas pessoas influencia o sucesso ou fracasso das políticas destinadas a aumentar a sua inclusão social (Scior, 2011; Scior & Furnham, 2011).

Há também que ter em consideração o estigma social associado a estes indivíduos que dificulta e condiciona o seu acesso a oportunidades de emprego, habitação e participação na comunidade (Werner, et al., 2012).

Indivíduos com DC têm dificuldade em estabelecer interações sociais, o que promove o seu isolamento e a sua exclusão social, privando-os igualmente de desfrutarem de independência e autonomia e limitando o seu acesso a diversas atividades da vida diária (Cook & Oliver, 2011; Horovitz et al., 2011; Nieuwenhuijzen & Vriens, 2011; Poppes et al., 2010). Deste modo tornam-se mais suscetíveis a sofrerem maus tratos e/ou abuso sexual ou mesmo a desenvolver comportamentos agressivos como consequência da frustração associada aos seus défices.

## 1.2. Distúrbios do comportamento – Autismo

### 1.2.1. Definição e classificação

De acordo com o DSM-IV, a ASA (*Autism Society of America*) e a APA (*American Psychological Association*) o autismo é uma deficiência do desenvolvimento neurológico complexa, identificada geralmente durante os primeiros três anos de vida (Oliveira et al., 2003). No entanto, o subdesenvolvimento da linguagem pode atrasar a identificação dos sintomas (Whitehouse et al., 2009). Verifica-se heterogeneidade do fenótipo clínico, com diferentes níveis de gravidade, tipo e frequência dos sintomas (Schwartz & Neri, 2012).

Caracteriza-se por um decréscimo da comunicação verbal e não-verbal e restrição das interações sociais, com padrões repetitivos e estereotipados de comportamento, interesses e atividades. Apresenta-se como uma desordem psiquiátrica em que o indivíduo se recolhe dentro de si próprio, não respondendo a estímulos externos (Lamb, 2009; Levy et al., 2010; Schwartz & Neri, 2012). É um distúrbio geralmente estável, contudo nalguns casos surge somente num período transitório (Zappella, 2012).

O DSM-IV e o ICD-10 (*International Classification of Diseases, 10th Edition*) classificam o autismo, a síndrome de Asperger, a síndrome de Rett, o transtorno desintegrativo da infância e os transtornos do desenvolvimento sem outra especificação como as desordens do espectro autista (expressão adaptada da língua inglesa *autism spectrum disorders – ASD*) (Lamb, 2009; Levy et al., 2010).

### 1.2.2. Epidemiologia

O desenvolvimento de novas metodologias de estudo, a reestruturação dos critérios de diagnóstico, o aumento do número de serviços e profissionais envolvidos no estudo e a uma maior sensibilização dos pais e cuidadores levaram a um maior reconhecimento e deteção do autismo. Este progresso permitiu ajustar a prevalência mundial em 1% (Baron-Cohen et al., 2009; Kou et al.2012).

A proporção entre homens e mulheres é aproximadamente de 4:1, respetivamente (Lamb, 2009; Levy et al., 2010).

### 1.2.3. Etiologia

O autismo é um distúrbio que está associado a fatores de risco que atuam em simultâneo para produzir este fenótipo. Estes podem ser pré-natais, perinatais, ambientais ou fatores epigenéticos. Deste modo a avaliação do autismo deve ser multidisciplinar, abordando os sintomas principais, a cognição, a linguagem adaptativa e sensorial e as capacidades motoras (Eriksson et al., 2012; Hattier et al., 2011; Kocovska et al., 2012; Levy et al., 2010; McCarthy et al., 2010).

Uma avaliação correta inclui a anamnese e exame físico detalhados e um acompanhamento adequado por um geneticista clínico que orienta os exames de diagnóstico necessários (Levy et al., 2010).

Apesar do desenvolvimento que se tem verificado nos últimos anos na identificação da etiologia genética no autismo, esta só se verifica em cerca de 10 a 20% dos pacientes, permanecendo os restantes com etiologia desconhecida (Schwartz & Neri, 2012).

As alterações mais comuns encontradas incluem as anomalias cromossómicas e as alterações das formas alélicas do gene *FMR1*, associado à síndrome de X-frágil (Gurkan & Hagerman, 2012; Levy et al., 2010). Estima-se que 60 a 80% dos genes associados ao autismo estão em estudo (Kou et al., 2012).

Com o advento das novas tecnologias a taxa de deteção pode aumentar, melhorando o conhecimento e a compreensão do autismo oferecendo um melhor diagnóstico, intervenção e tratamento (Lamb, 2009; Leonard et al., 2011).

O aconselhamento genético e o acompanhamento destes indivíduos são indispensáveis, pois para além da importância na explicação dos resultados dos exames genéticos, o risco de recorrência no segundo filho é 20 a 50 vezes maior do que na população em geral (Levy et al., 2010).

Este distúrbio está descrito como o transtorno neuropsiquiátrico mais associado a causas genéticas (em cerca de 90% dos casos) (Levy et al., 2010).

#### **1.2.4. Patologias associadas**

Os sintomas de autismo podem alterar-se com o desenvolvimento e estar presentes simultaneamente com DC, epilepsia, e outras alterações e patologias do comportamento (Lamb, 2009; Smith & Matson, 2010).

A prevalência de DC em indivíduos com autismo é de 70 a 80% (Schwartz & Neri, 2012; Shea, 2006). Muitas crianças com autismo apresentam dificuldades na linguagem e há autores que levantam a hipótese de que os mesmos genes possam estar implicados nos dois distúrbios (Caylak, 2011; Whitehouse et al., 2009; Wilkinson et al., 2009).

Estes indivíduos sofrem mais frequentemente de problemas de transtorno no sono e ansiedade (Rzepecka et al., 2011). O autismo pode ainda estar associado ao défice de atenção e hiperatividade e a distúrbios psiquiátricos, que por terem características comuns dificultam o diagnóstico (Leonard et al., 2011).

#### **1.2.5. Prognóstico**

Dificuldades de compreensão são mais profundas em crianças com autismo e DC, aumentando assim a necessidade de apoio na sua vida diária e intervenções adaptadas ao seu nível cognitivo, nomeadamente ao nível da comunicação, de forma a melhorar as suas capacidades nas interações sociais (Maljaars et al., 2012).

O progresso das neurociências, da neurobiologia e da genética permitiram avanços no estudo do desenvolvimento cognitivo, afetivo e biológico do autismo, utilizando métodos inovadores para uma melhor deteção, diagnóstico e eficácia dos tratamentos (Levy et al., 2010).

A deteção precoce permite o tratamento cada vez mais individualizado e seguro, o que pode contribuir para uma melhor qualidade de vida tanto do doente como da sua família, por tornar o contexto onde o indivíduo se insere mais estável e com menor tensão e stress e diminuir a probabilidade de maus tratos e/ou abuso sexual.

### **1.3. Medicina Legal**

A Medicina Legal é uma especialidade médica que utiliza conhecimentos técnico-científicos da Medicina para o esclarecimento da Justiça. É a ciência que se dedica ao estudo, investigação e prática clínica aplicada às questões de direito, no âmbito penal, civil, do trabalho, administrativo e da família e menores.

As áreas das ciências forenses são: a tanatologia, a clínica médico-legal e a psiquiatria, a toxicologia, a genética e biologia, a anatomia patológica, a psicologia, a criminalística, a antropologia e a odontologia.

No âmbito das suas valências possui uma vertente ligada à prevenção da violência, contribuindo na promoção de estratégias de segurança e desenvolvendo uma melhor articulação transdisciplinar no interesse das vítimas. Engloba diversas perspetivas sobre as consequências da violência, tais como: as causas, mecanismos e tipos de lesões, o impacto das consequências físicas, psicológicas e sociais, o contexto legal em que o dano resultante se integra e as intervenções tendo em vista gerir o impacto pessoal de uma situação de violência.

A medicina legal pode contribuir para melhorar o conhecimento acerca do fenómeno da violência, como na definição do problema, na identificação dos fatores de risco e de proteção e na programação de intervenções para prevenir ou minorar estas situações.

Tem como objetivo encontrar respostas para os problemas de maus tratos e abuso sexual tentando estabelecer linhas de orientação para uma abordagem transdisciplinar destas questões, prevenindo a vitimização e treinando e sensibilizando profissionais para trabalhar estas questões de forma adequada.

#### **1.3.1. Clínica Médico-Legal**

A clínica médico-legal é uma das áreas da medicina legal orientada para a atividade médica pericial na pessoa viva, com o objetivo de encontrar uma prova científica para esclarecimento da justiça.

Os exames médico-legais mais frequentemente realizados em sede de direito penal são relativos a crimes contra a integridade física e a crimes sexuais. Em sede do

direito do civil são comuns os exames de avaliação do dano corporal pós-traumático em casos de acidentes de viação, bem como de agressão e para avaliação do estado de saúde. Em sede do direito do trabalho os exames relacionam-se fundamentalmente com os acidentes de trabalho.

Na clínica médico-legal a prova pericial é essencialmente médica exigindo-se uma interdisciplinaridade e transversalidade de conhecimentos uma vez que o objeto da perícia é a pessoa. É um ato médico ao qual se aplicam as regras da *leges artis*.

A metodologia do exame é comum para todos os tipos de perícia mas o seu objetivo e conclusões diferem com o âmbito do Direito à luz da qual ela efetuada.

### **1.3.2. Prova pericial**

Nos termos do art.º 151º do Código de Processo Penal (CPP) “a prova pericial tem lugar quando a perceção ou a apreciação dos fatos exigirem especiais conhecimentos técnicos, científicos ou artísticos”. Esta apresenta-se sob a forma de um relatório onde os peritos médicos com reconhecida competência descrevem os resultados do exame pericial e sua interpretação.

O relatório obedece a normas específicas e deve apresentar uma descrição clara, objetiva, pormenorizada e sistematizada das observações feitas e dos dados recolhidos durante a perícia.

A responsabilidade profissional do perito médico está associada ao valor da prova pericial em que “O juízo técnico, científico ou artístico inerente à prova pericial presume-se subtraído à livre apreciação do julgador.” (art.º 163º CPP) e sempre que a opinião do julgador divergir da dos peritos constante no relatório pericial, este tem que fundamentar essa discordância.

A necessidade da prova pericial assenta no fato de a apreciação dos acontecimentos num processo judicial criminal se impor ao julgador ou à autoridade judiciária a quem cabe instruir o processo. Estes na sua função de descobrir o significado das provas ou de considerar o seu valor, para além dos conhecimentos jurídicos e da experiência comum, carecem de conhecimentos técnicos ou científicos (Magalhães et al., 2003).

### **1.3.3. Direito Penal**

O Direito Penal (DP) é a área do direito que determina o que é crime, estabelece as penas e a ordem de proteção de bens jurídicos fundamentais, indispensáveis ao livre desenvolvimento da pessoa humana e à convivência comunitária.

O DP visa proteger os bens jurídicos fundamentais, tais como o património, a vida humana, a liberdade individual. É fragmentário, não protegendo todos os bens, nem da mesma forma, e subsidiário, ou seja, só intervém em *última ratio* e aludindo sempre ao interesse social.

O princípio da legalidade penal do Código Penal (CP) (art. 1.º do CP) define que “Só pode ser punido criminalmente o fato descrito e declarado passível de pena por lei anterior ao momento da sua prática; A medida de segurança só pode ser aplicada a estados de perigosidade cujos pressupostos estejam fixados em lei anterior ao seu preenchimento; não é permitido o recurso à analogia para qualificar um fato como crime, definir um estado de perigosidade ou determinar a pena ou medida de segurança que lhes corresponde”.

Desta forma o crime tem de ser uma ação típica, ilícita e culposa, podendo ser definido como o comportamento humano que lesa ou põe em perigo bens jurídicos fundamentais, ou seja, valores indispensáveis à pessoa humana para a sua subsistência e a sua afirmação com autonomia e dignidade.

### **1.3.4. Ofensas à integridade física e maus tratos**

Os artigos que determinam o enquadramento legal da maioria dos crimes contra a integridade física são: o art.º 143º, do CP, que define o crime contra a integridade física simples e o art.º 144º, do CP, que constitui uma agravação na moldura penal do artigo anterior e define o crime contra a integridade física grave.

O dano corporal tem consequências psicológicas, morais e sociais importantes, e mesmo na ausência de lesões, estas situações promovem o desenvolvimento de distúrbios psicológicos e morais que devem ser valorizados. Verifica-se que o art.º 144º tem em consideração a noção de saúde definida como o “estado de completo

bem-estar físico, mental e social”, segundo a Carta da OMS (1947) (Magalhães et al., 2003).

O crime de maus tratos quando este é praticado em indivíduos menores, com deficiência, doença ou gravidez está descrito no art.º 152º-A do CP.

De acordo com este artigo os maus-tratos podem ser definidos como qualquer forma de tratamento físico e/ou emocional, não acidental e inadequado, resultante de disfunções e/ou carências nas relações interpessoais, num contexto de uma relação de dependência, confiança e poder. Podendo ser comportamentos ativos, físicos, emocionais ou sexuais, ou passivos de omissão ou negligência nos cuidados e/ou afetos (Magalhães, 2005).

A negligência é o comportamento sistemático de omissão, relativamente aos cuidados a ter com uma pessoa dependente, não lhe proporcionando a satisfação das suas necessidades de cuidados básicos de higiene, alimentação, segurança, educação, afeto e saúde, do qual resulta um dano na sua saúde e/ou desenvolvimento, podendo ser voluntário ou involuntário. Pela forma reiterada como geralmente acontecem, privam a vítima dos seus direitos e liberdades afetando, de forma concreta ou potencial, a sua saúde, desenvolvimento e/ou dignidade e podem observar-se em diferentes contextos, quer inserido no ambiente familiar ou em instituições (Magalhães, 2005).

Apesar de estarem estabelecidos na lei os crimes de maus tratos e de violência doméstica é muito difícil determinar a incidência real destes casos e a morbilidade e mortalidade associadas, porque a maioria ocorre em meio familiar. Neste contexto as crianças e as mulheres são as principais vítimas, constituindo estas situações de violência um grave e delicado problema social tendo uma baixa visibilidade (Magalhães, 2005).

A proteção destas vítimas requer o máximo de cooperação, não só das instituições públicas competentes neste âmbito, como dos profissionais que com elas trabalham, como também da população em geral.

A abordagem desta problemática implica a proteção da vítima em perigo, tendo sempre em conta o seu melhor interesse e bem-estar, sem esquecer o respeito pelos direitos da família.

É importante desenvolver estudos de investigação de modo a que a teoria seja apoiada em dados científicos, para permitir uma atuação fundamentada e orientada de acordo com a realidade, com o objetivo de educar para a prevenção e intervir na deteção e tratamento (Magalhães, 2005).

### **1.3.5. Vítimas de maus tratos com défice cognitivo**

A violência é transversal a todos os períodos da história. Os maus tratos infantis eram práticas correntes e estiveram presentes em todos os países e culturas. O infanticídio foi tolerado até ao final do século XVII e, em algumas culturas, crianças frágeis, prematuras, deformadas ou com DC eram consideradas não aptas para viver (Verdugo & Bermejo, 1997).

As crianças com DC, com alterações físicas, prematuras, gémeas, ilegítimas, ou mesmo nascidas em famílias mais desfavorecidas foram sempre ameaçadas pela violência, consideradas um fardo económico e eram frequentemente tratadas com crueldade (Verdugo & Bermejo, 1997).

A partir da década de 60 o abuso e maus tratos em crianças começaram a ser considerados como um grave problema social que exigia medidas urgentes de intervenção. Levando à promulgação da lei de proteção de crianças e menores, e à criação de instituições para crianças que sofriam abusos ou negligência (Verdugo & Bermejo, 1997).

Os maus tratos em pessoas com DC são promovidos muitas vezes pela exigência no seu tratamento e cuidado, implicando paciência por parte dos cuidadores. A debilidade e a fragilidade do corpo destes indivíduos também aumentam as consequências e o impacto que os maus tratos podem ter nas suas capacidades intelectuais e psico-motoras. Verificando-se uma correlação positiva entre a existência de DC e os maus tratos (Verdugo & Bermejo, 1997).

O comportamento parental nem sempre é desadequado, havendo a necessidade de se analisar o estado de desenvolvimento e a idade da criança e avaliar se as alterações físicas ou de doença se enquadram num comportamento considerado de maus tratos ou negligência (Bennett et al., 2006).

Em indivíduos com DC a negligência é a forma de maus tratos mais frequente, nomeadamente por parte de progenitores que também sofram de algum tipo de défice (Verdugo & Bermejo, 1997).

O diagnóstico de DC é uma experiência normalmente traumática para as famílias, podendo causar frustração nos pais em relação a seu filho no que diz respeito à sua formação e futuro fomentando sentimentos de revolta e agressividade (Martorell et al., 2011).

Os fatores de risco que podem levar à violência por parte dos progenitores e/ou cuidadores de indivíduos com DC podem ser o stress e a saturação com os tratamentos e cuidados que estes exigem, o esforço financeiro adicional e a consequentemente diminuição do nível socioeconómico familiar, bem como as dificuldades de integração na comunidade (Irazabal et al., 2012).

A etiologia de comportamentos violentos por parte dos progenitores pode incluir características individuais e psicológicas destes e das crianças, fatores ambientais e socioculturais e problemas muitas vezes associados a vitimação do progenitor. Estes indivíduos repetem o que vivenciaram na infância, existindo um “ciclo de violência” em que também foram vítimas de abuso e maus tratos (Bennett et al., 2006; Leonard et al., 2011).

A diversidade de adaptações em famílias de pessoas com DC depende não só de fatores de risco, bem como do apoio social prestado e os recursos dos sistemas de saúde e de assistência social que contribuem para a diminuição da violência (Gerstein et al., 2009).

As características da criança e dos progenitores, pessoais e familiares, o seu bem-estar ou saúde física e/ou psicológica, o relacionamento parental e a relação progenitor/filho são determinantes na promoção ou prevenção da violência. Deste modo há pais e famílias mais resilientes e bem adaptados que apresentam uma maior conformação pela situação em que se encontra o seu filho (Gerstein et al., 2009).

A avaliação dos fatores de risco e dos fatores de resiliência presentes em cada caso é fundamental para o planeamento de programas de intervenção (Bennett et al., 2006; Gerstein et al., 2009).

Verdugo e Bermejo (1997) referem que crianças com DC ligeiro a moderado são as que possuem um maior risco de maus tratos. Um défice muito severo causa

menor risco de maus tratos porque os pais já não possuem expectativas dos filhos e como possuem muitos apoios institucionais são mais controlados e observados.

Pessoas que para além do DC possuem défice na linguagem têm mais dificuldade em ser detetadas como vítimas de maus tratos pois têm mais dificuldade em se exprimir o que dificulta o relato dos maus tratos (Caylak, 2011).

A maioria dos estudos incide nos maus tratos em crianças com DC, no entanto, ao contrário do que acontece com os indivíduos normais, o abuso e os maus tratos nestes indivíduos permanecem na vida adulta, permanecendo vulneráveis a estas situações (Verdugo & Bermejo, 1997).

### **1.3.6. Abuso sexual e crimes contra a autodeterminação sexual**

Os crimes de natureza sexual, de acordo com o CP podem ser divididos em dois grupos: crimes contra a liberdade sexual, usualmente quando se trata de adultos, e crimes contra a autodeterminação sexual, no caso de crianças ou jovens.

Estudos efetuados em crianças e jovens revelaram que as vítimas de abusos sexuais são maioritariamente do sexo feminino, com uma média de idades próxima de nove anos, na maioria dos casos o abuso ocorre em meio familiar ou por pessoa conhecida da vítima (APAV, 2012; Carvalho, 2007; Silva, 2010).

A reincidência dos abusos é mais elevada nos casos familiares pois a vítima permite com menor resistência o abuso, este está em alguns casos ainda associado a violência física (APAV, 2012; Carvalho, 2007; Silva, 2010).

O abuso sexual em menores consiste no seu envolvimento em práticas que visam a gratificação e satisfação sexual do adulto ou jovem mais velho, numa posição de poder ou de autoridade sobre aquele (Magalhães, 2010).

No caso dos adultos, consiste em obrigar a vítima a manter comportamentos sexuais sem o seu consentimento e, portanto, contra a sua vontade, podendo ser usada a violência física ou emocional.

As características do abusador e/ou características da vítima, designadamente vulnerabilidade e perturbação da saúde mental ou física, o contexto familiar, social e

cultural potenciam o risco de se verificarem situações de abuso e a sua recidiva (Gillespie et al., 2012).

### **1.3.7. Vítimas de abuso sexual com DC**

A incidência de abuso sexual em indivíduos com DC é muito superior que na população em geral, porque têm falta de independência e autonomia, estando dependentes dos seus cuidadores (Eastgate et al., 2011).

No entanto, devido às suas limitações e défices, estas pessoas têm dificuldades em se expressar e relatar o abuso, bem como identificar o abusador e consequentemente os casos sinalizados constituem uma pequena proporção da realidade (Eastgate et al., 2011; Manzanero et al., 2012).

Estas situações também são agravadas porque os indivíduos com DC possuem fraca educação sexual, estão normalmente em isolamento social o que promove a carência e aumenta a suscetibilidade ao abuso sexual (Eastgate et al., 2011).

Os abusadores, por sua vez, preferem abusar de indivíduos com DC porque estes são mais fáceis de persuadir e pelas suas dificuldades de expressão dificilmente os acusariam (Eastgate et al., 2011).

Indivíduos com DC têm o direito de ser sexualmente ativos, no entanto a gestão da sua sexualidade, sendo mais difícil de concretizar, deve ser acompanhada por profissionais, que devem apoiar os seus pais e educadores (Nannini, 2006).

Apenas uma minoria de indivíduos com DC é infértil, por isso a educação sexual é indispensável, necessitando de ser individualizada para se adaptar ao seu nível de compreensão (Barger et al., 2009).

Há uma maior prevalência reportada de abuso sexual em instituições do que no seio familiar, o que reforça a ideia de que indivíduos com DC são mais suscetíveis a tais abusos, revelando também falta de sinalização destas situações no seio familiar (Magalhães, 2010)

.Está demonstrado que indivíduos com DC são mais vulneráveis a abuso sexual e o acompanhamento destas vítimas é essencial.

### **1.3.8. Agressores e Abusadores com DC:**

A falta de integração social de indivíduos com DC pode levar a um comportamento agressivo, desadequado e de indiferença, pois estes estão em níveis de desenvolvimento diferentes dos verificados nos seus pares, na capacidade de conceptualizar problemas, na escolha de estratégias, na utilização do conhecimento apreendido e na identificação e resposta aos estados emocionais de outras pessoas (McKenzie et al., 2012).

Estes indivíduos apresentam um risco elevado para desenvolver problemas interpessoais, sociais e disfunções e desadequação no seu comportamento social e sexual (McKenzie et al., 2012).

Indivíduos abusadores com DC têm geralmente as mesmas características que um abusador com o desenvolvimento cognitivo normal, como relacionamento social fraco, poucas e limitadas relações íntimas, solidão e baixa auto-estima. Estes devem ser estudados de forma a antecipar o abuso e o risco de recorrência (Keeling et al., 2007).

Programas de identificação, prevenção e intervenção precoce no tratamento destes casos são fundamentais de modo a evitar a perpetuação e reincidência de comportamentos de abuso (Timms et al., 2002).

Para uma análise global destes casos deve verificar-se se existe um “ciclo de violência” em que os pais ou cuidadores também foram vítimas de abuso e maus tratos na infância. A agressividade reproduz-se, de forma transgeracional e do agressor para a vítima, que se torna, por sua vez, agressor (Magalhães, 2005).

Por vezes, a associação destes indivíduos a atos criminosos não é linear, pois as pessoas com DC e distúrbios do comportamento podem ser levados pelos outros a cometer atos ilícitos por causa de sua ingenuidade social e os seus comportamentos agressivos podem surgir de uma alteração às suas rotinas ou mudanças nas circunstâncias diárias (O'Brien, 2002).

Delinquentes com DC e distúrbios do comportamento são um grupo de indivíduos com necessidades complexas, que na maioria das vezes não são sinalizados pelo sistema judicial e não possuem acompanhamento e tratamento adequado. O desenvolvimento da investigação nesta área é fundamental para melhorar a eficácia dos tratamentos e permitir uma redução na reincidência dos crimes praticados por estes indivíduos (Barron et al., 2002).

## **1.4. Citogenética, Biologia molecular e Genómica**

### **1.4.1. Citogenética Convencional**

A citogenética é a área da genética que estuda os cromossomas, a sua estrutura, função e comportamento (Barch et al., 1997). Os cromossomas são estruturas complexas, situadas no núcleo das células e constituídas por DNA, proteínas, RNA e polissacáridos. São classificados em função do seu tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas (Rooney, 2001).

O reconhecimento da importância do papel dos cromossomas nas doenças genéticas humanas impulsionou os investigadores a desenvolverem e otimizarem técnicas de visualização e de análise dos cromossomas (Bangs & Donlon, 2005; Rooney, 2001).

Durante a interfase, os cromossomas surgem como estruturas ultrafinas de cromatina dispersas no núcleo (Rooney, 2001), mas quando as células estão em divisão os cromossomas aparecem compactados, sendo a prometáfase a melhor fase para a sua observação ao microscópio (Barch et al., 1997).

Apesar das diferentes formas de compactação, cada cromossoma mantém a sua estrutura e individualidade nas sucessivas divisões celulares (Teixeira & Carreira, 2005).

A citogenética convencional estuda o genoma através da análise numérica e estrutural de todos os cromossomas. Em metafase ou prometáfase, o que implica cultura celular para a obtenção de células em mitose (Bangs & Donlon, 2005; Rooney, 2001).

O cariótipo ou cariograma é a ordenação dos cromossomas por tamanho com 22 pares de autossomas e dois cromossomas sexuais (XX para o sexo feminino e XY para o sexo masculino) (Figura 1).



**Figura 1.** Cariograma humano de um indivíduo do sexo masculino (46,XY) (imagem cedida pelo LCG – FMUC).

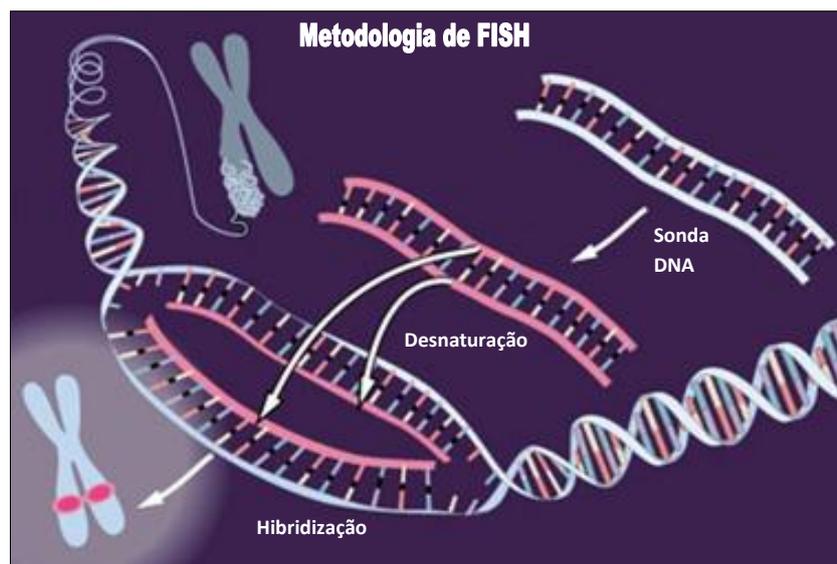
A alteração numérica mais comum é a aneuploidia, que consiste num complemento cromossômico com um cromossoma a mais – trissomia ou a menos – monossomia (Teixeira & Carreira, 2005).

Os rearranjos cromossômicos estruturais podem ser equilibrados, como por exemplo translocações, inserções ou inversões, ou desequilibrados, como por exemplo deleções, duplicações, cromossomas em anel ou isocromossomas (Gardner & Sutherland, 2003). Não é possível a deteção de alterações com uma resolução inferior a 3 – 5 Mb (Mefford, 2012; Rooney, 2001).

#### 1.4.2. Citogenética Molecular

A citogenética molecular é uma metodologia que combina a análise citogenética convencional com técnicas de genética molecular, um exemplo é a metodologia de FISH (Shaffer, 1997).

Nesta técnica utiliza-se um segmento de DNA (sonda) previamente conjugado com um fluorocromo hibridizando em regiões específicas complementares de um cromossoma em metafase, prometafase ou interfase (Figura 2) (Knoll & Lichter, 2005).



**Figura 2.** Diagrama da metodologia de FISH (adaptado de <http://www.creative-biolabs.com/fish/tissuearray5.htm>)

Há vários tipos de sondas que diferem segundo o seu tamanho, posição e objetivo. Por exemplo as sondas centroméricas são sequências repetitivas de DNA e identificam centrómeros.

As sondas de sequência única marcam especificamente um gene ou uma região de um dado cromossoma e são particularmente úteis na identificação de alterações estruturais desequilibradas que envolvem segmentos de tamanho inferior a 3 Mb ou associadas às síndromes de microdeleção e de microduplicação.

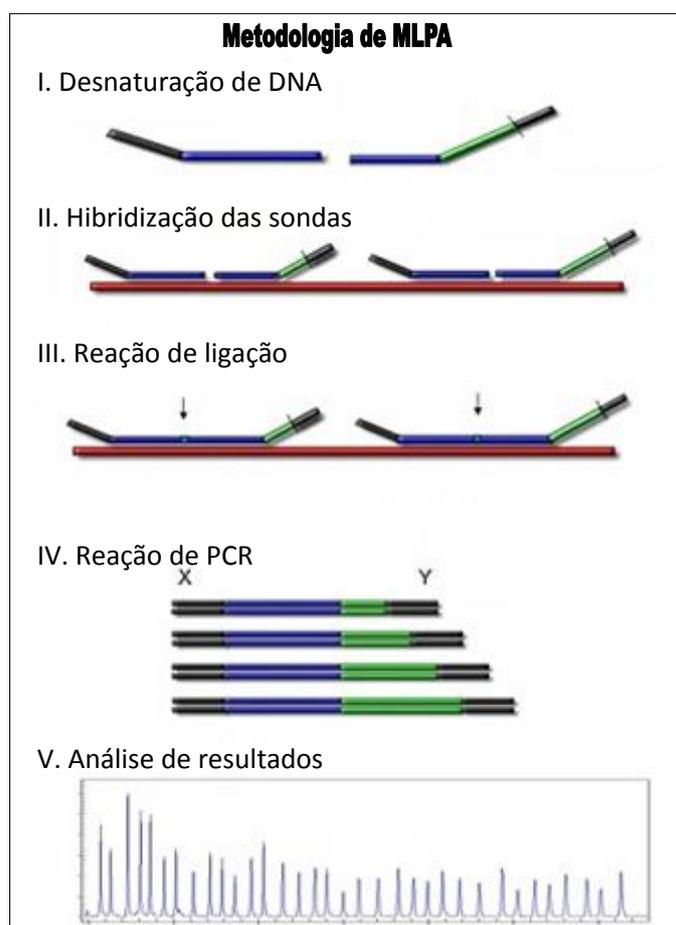
As sondas subteloiméricas são características de cada cromossoma e são utilizadas na caracterização de alterações envolvendo regiões distais dos cromossomas.

Para avaliar as regiões dos telómeros de todos os cromossomas utilizam-se as sondas teloméricas, que são sequências de DNA repetitivo e permitem detetar a ausência de telómeros como por exemplo nos cromossomas em anel.

As sondas de pintura cromossômica consistem numa mistura de várias sondas de DNA obtidas a partir de diferentes partes de um determinado cromossoma, todas marcadas com o mesmo fluorocromo com o qual se obtém uma pintura cromossômica. São particularmente úteis na identificação de cromossomas marcadores ou alterações estruturais complexas.

### 1.4.3. Biologia Molecular

Neste trabalho a técnica de MLPA® (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), foi a tecnologia de biologia molecular utilizada. É um método de quantificação que permite estudar até 50 regiões alvo numa só reação, com 5 etapas: (I) a desnaturação do DNA e a hibridização das sondas MLPA, (II) a reação de ligação, (III) a reação de PCR (Polymerase Chain Reaction), (IV) a separação dos produtos de amplificação e (V) a análise dos resultados (Figura 3).



**Figura 3.** Diferentes etapas da técnica MLPA ® (adaptado de MRC-Holland, 2012).

A técnica de MLPA possui vários painéis de sondas que permitem o estudo específico de algumas regiões do genoma, nomeadamente regiões já descritas e associadas a síndromes de microdeleções e microduplicações, bem como para as

regiões subteloméricas (Ahn et al., 2008; Jehee et al., 2011; Kriek et al., 2007; Rooms, 2004).

É utilizado para detetar alteração no número de cópias, o estado de metilação das regiões codificantes e promotoras, quantificar mRNA, mutações pontuais e SNP's (*Single Nucleotide Polymorphism*).

É uma metodologia simples, rápida e económica uma vez que requer apenas um termociclador e equipamento de eletroforese capilar e podem-se processar várias amostras ao mesmo.

#### **1.4.4. Genómica - Cariótipo Molecular**

O conceito de cariótipo molecular através da metodologia de array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) alterou significativamente o diagnóstico de indivíduos com DC e distúrbios do comportamento. A base genética de várias síndromes clínicas foi descoberta por esta abordagem tendo surgido novas síndromes de microdeleção e microduplicação.

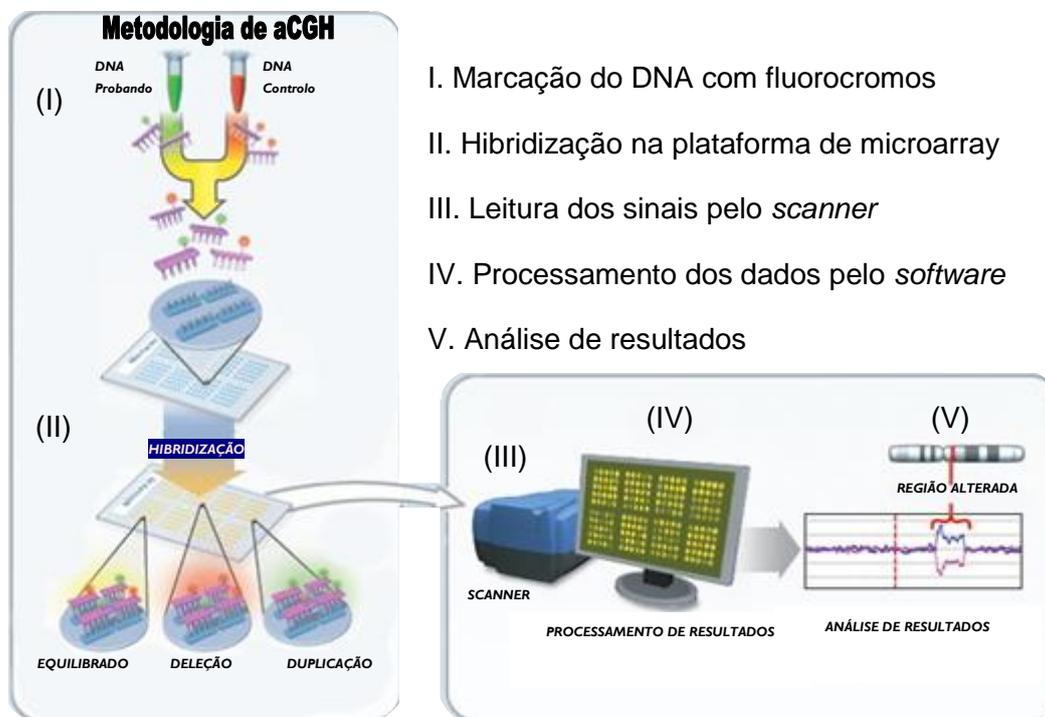
Desta forma contribuiu para uma diminuição dos casos de etiologia desconhecida em indivíduos com DC, autismo, epilepsia, e esquizofrenia, verificando-se um aumento da taxa de deteção destas patologias até 25% (Vissers et al., 2010b).

O aCGH é uma tecnologia que permite detetar a variação do número de cópias em todo o genoma, ou seja, identifica e quantifica alterações na sequência de DNA e define as regiões genómicas onde estas se encontram, de uma forma rápida e com alta resolução (Edelmann & Hirschhorn, 2009; Theisen, 2008).

Desta forma recorrendo a uma única tecnologia podem ser estudados desequilíbrios genómicos associados ao DC e distúrbios de comportamento, envolvendo segmentos de tamanho inferior a 3-5 Mb. É a técnica preferencial para o estudo destes indivíduos (Jaillard et al., 2010; Jehee et al., 2011; Manolakos et al., 2010).

Esta metodologia consiste em 5 etapas: (I) a marcação do DNA com fluorocromos, (II) hibridação na plataforma de microarray, (III) leitura dos sinais pelo

scanner, (IV) processamento dos dados pelo *software* (V) e a análise dos resultados (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema referente ao processo da metodologia de aCGH (adaptado de <http://www.nature.com/scitable/topicpage/microarray-based-comparative-genomic-hybridization-acgh-45432>).

Com a crescente utilização da tecnologia de aCGH foram identificadas novas CNV's (Copy Number Variations), que consistem em aneussomias de segmentos de DNA submicroscópicos.

Estas podem ser causais dos fenótipos estudados ou representarem um polimorfismo no número de cópias inócuo, isto é, correspondem a uma variação normal no genoma humano. Há algumas que influenciam a expressão génica, originando uma variação fenotípica ou uma condição patológica, seja pela interrupção da leitura de genes ou pela alteração na dosagem génica (Knight, 2008).

Variantes raras de CNV's são uma causa frequente de distúrbios neurológicos, como o DC e os distúrbios do comportamento, no entanto estas também podem ser

identificadas em indivíduos saudáveis (Bucan et al., 2009, Marshall et al., 2008; Pinto et al., 2010).

É, portanto, crucial tanto para o diagnóstico como para investigação ser capaz de distinguir entre CNV's responsáveis por doenças ou CNV's benignas. A distinção destas depende do uso de bases de dados adequadas que apontam dados precisos do genótipo e descrições fenotípicas detalhadas de indivíduos com DC (Hehir-Kwa, 2010; McMullan et al., 2009; Miller et al., 2010).

As bases de dados mais comumente utilizadas são: a *DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources)*, a *ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations)*, o *Ensemble* e a *ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays)*.

Na *DGV (Database of Genomic Variation)* encontram-se descritas CNV's que foram observadas em indivíduos normais (Fan et al., 2007; Slavotinek, 2012). Na maioria dos casos as CNV's responsáveis por doenças têm uma origem *de novo* ou num progenitor com um fenótipo ligeiro (Hochstenbach et al., 2011; Vissers et al., 2010a).

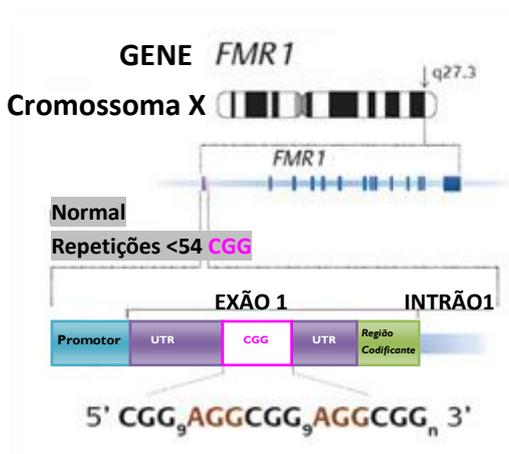
A interpretação dos resultados de aCGH é assim um processo que exige técnicos de análise qualificados e experientes, exigindo uma boa comunicação entre o laboratório e a clínica e a consulta de diversas bases de dados e dados bibliográficos para se poder associar os desequilíbrios ao fenótipo e avaliar o impacto das CNV's encontradas no genoma (Miller et al., 2010; Subramonia-Iyer et al., 2007).

Os resultados das alterações estruturais desequilibradas detetadas por aCGH necessitam de validação através de outras técnicas, bem como a análise das amostras dos pais para determinar a sua origem (*de novo* ou familiar) para assim avaliar o significado clínico das alterações encontradas e ser feita a sua interpretação (Hills et al., 2010).

Esta metodologia tornou-se a tecnologia de primeira linha utilizada no diagnóstico e investigação de indivíduos com DC em serviços e laboratórios de genética moderna (Koolen et al., 2009; Li & Andersson, 2009; Miller et al., 2010; Mefford et al., 2012; Sagoo et al., 2009).

#### 1.4.5. Análise de fragmentos para o estudo do gene *FMR1*

A síndrome de X-Frágil é causada em 98% dos casos pela expansão de uma repetição do trinucleótido CGG da região 5'UTR do gene *FMR1* localizado em Xq27.3 (Figura 4). A metilação dessa extensão silencia a expressão do gene (Hantash et al., 2010; Hawkins et al., 2012; Jin & Warren, 2000; Kehrer-Sawatzki et al., 2006; Pandey et al., 2004; Sherman, et al., 2005).



**Figura 4.** Esquema representativo da localização e constituição do gene *FMR1* (adaptado de <http://www.asuragen.com/ClinicalLab/XpansionInterpreter/XpansionInterpreter.aspx>).

Existem essencialmente quatro formas alélicas do gene *FMR1*, definidas de acordo com o comprimento devido ao número de repetições CGG, normal, intermédio, pré-mutação e mutação completa.

A forma de mutação completa do gene consiste num número de repetições superior a 200 (Tabela 1) promovendo hipermetilação e silenciamento do gene, não se produzindo mRNA e conseqüente ausência de proteína (Sherman et al., 2005).

**Tabela 1.** Correspondência entre as formas alélicas do gene e o número de repetições do trinucleótido CGG.

| <b>Nº de repetições CGG</b> | <b>Formas alélicas</b> |
|-----------------------------|------------------------|
| <b>6 – 54</b>               | Alelo Normal           |
| <b>41 – 54</b>              | Alelo Intermédio       |
| <b>55 – 200</b>             | Alelo Pré-mutado       |
| <b>&gt;200</b>              | Alelo Mutado           |

Diferentes metodologias permitem o estudo do gene *FMR1*, o *Southern blot* e a PCR, que se baseiam na determinação do número de repetições do trinucleótido CGG em ambos os casos e avaliação do grau de metilação do gene, *FMR1*, no caso do Southern Blot (Pandey et al., 2004).

O *Southern blot* foi a técnica inicialmente estabelecida para o diagnóstico, no entanto com o desenvolvimento de tecnologias de biologia molecular foram desenvolvidos novos métodos mais acessíveis e económicos.

O desenvolvimento da tecnologia de PCR e a descoberta da base molecular da doença, permitiram que atualmente a análise de fragmentos por PCR seja a técnica preferencial no estudo deste gene, pois é mais simples, mais rápida e necessita de pouca quantidade de DNA, estabelecendo a dimensão correta dos alelos normais, intermédio e pré-mutado (Tassone et al., 2008). Esta técnica baseia-se na amplificação do fragmento de DNA contendo os tripletos CGG, determinando-se a sua dimensão por eletroforese capilar.

### 1.5. Objetivos do estudo

O DC é um distúrbio com uma elevada prevalência na população, com elevado impacto na qualidade de vida da pessoa afetada, na família e na comunidade onde o indivíduo se insere, bem como na sociedade, nos sistemas de educação e solidariedade social e mesmo no sistema legal. Deste modo a determinação da etiologia torna-se essencial, tanto do ponto de vista familiar, económico e social como jurídico. O desenvolvimento da genética, nas áreas da citogenética, biologia molecular e da genómica propiciou um estudo mais aprofundado e alargado de indivíduos com DC e distúrbios do comportamento de causa desconhecida.

A Medicina Legal tem um papel fundamental na prevenção da violência e na promoção de estratégias de segurança às vítimas de maus tratos e/ou abuso sexual. A identificação de fatores de risco, como a presença de DC e distúrbios do comportamento nas possíveis vítimas ou agressores e a análise da etiologia destas patologias, pode contribuir para prevenir ou mesmo evitar o risco associado a situações de violência e à sua reincidência.

Deste modo pretendeu-se neste estudo:

- Identificar e caracterizar as alterações genótípicas dos indivíduos com défice cognitivo e distúrbios do comportamento estudados no Laboratório de Citogenética e Genómica (LCG) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), nos anos 2010 e 2011.
- Estabelecer a correlação entre o genótipo e o fenótipo destes indivíduos de modo a demonstrar a causalidade das alterações encontradas.
- Justificar e sustentar a importância de exames complementares de diagnóstico genético na avaliação feita pelo perito médico e na elaboração do relatório médico-legal, sempre que envolvam indivíduos (vítimas ou agressores) com défice cognitivo e distúrbios do comportamento.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

## **2.1. Amostragem**

Neste estudo foram incluídos 850 pacientes com DC e distúrbios do comportamento. Foram casos referidos pelas consultas de Genética Médica e de Desenvolvimento do Hospital Pediátrico de Coimbra ao Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra nos anos de 2010 e 2011.

Nos estudos citogenéticos, moleculares e genómicos dos 850 casos foram realizados um total de 2012 testes. Em 572 casos foi feito o estudo do cariótipo. A técnica de MLPA foi aplicada em 684 casos, sendo que em 416 foi usada a combinação dos dois painéis de sondas para o estudo das regiões subteloméricas (ST) e em 268 foram utilizados os painéis de sondas específicos para o estudo das síndromes de microdeleção (MD). Realizou-se o aCGH em 340 casos e a análise de fragmentos no estudo do gene *FMR1* foi feita em 416 casos.

Dos 850 casos, somente 15 foram estudados com recurso a todas as metodologias. Dos 249 casos avaliados apenas por uma técnica, 87 foram estudados por análise citogenética, em 23 foram aplicados os painéis de sondas de MLPA (13 para as regiões subteloméricas e 10 para as microdeleções), em 101 o estudo pelo aCGH e em 38 foi feita a análise de fragmentos no estudo do gene *FMR1*.

A combinação das tecnologias no estudo de um caso foi realizada de acordo com o descrito na Tabela 2.

**Tabela 2.** Combinação de dois, três e quatro testes aplicados por cada caso, nos 850 pacientes estudados.

| Nº Combinações | Nº Casos | Citogenética | MLPA (ST) | MLPA (MD) | aCGH | FMR1 |
|----------------|----------|--------------|-----------|-----------|------|------|
| 2              | 5        |              |           | ✓         |      | ✓    |
| 2              | 7        |              | ✓         |           | ✓    |      |
| 2              | 8        |              |           | ✓         | ✓    |      |
| 2              | 8        | ✓            |           | ✓         |      |      |
| 2              | 10       |              | ✓         | ✓         |      |      |
| 2              | 17       |              | ✓         |           |      | ✓    |
| 2              | 25       |              |           |           | ✓    | ✓    |
| 2              | 42       | ✓            | ✓         |           |      |      |
| 2              | 49       | ✓            |           |           |      | ✓    |
| 2              | 51       | ✓            |           |           | ✓    |      |
| 3              | 32       |              |           | ✓         | ✓    | ✓    |
| 3              | 44       |              | ✓         | ✓         | ✓    |      |
| 3              | 47       |              | ✓         |           | ✓    | ✓    |
| 3              | 52       | ✓            |           |           | ✓    | ✓    |
| 3              | 53       | ✓            |           | ✓         | ✓    |      |
| 3              | 89       | ✓            | ✓         |           | ✓    |      |
| 3              | 133      | ✓            |           | ✓         |      | ✓    |
| 3              | 143      |              | ✓         | ✓         |      | ✓    |
| 3              | 167      | ✓            | ✓         | ✓         |      |      |
| 3              | 210      | ✓            | ✓         |           |      | ✓    |
| 4              | 18       | ✓            |           | ✓         | ✓    | ✓    |
| 4              | 20       |              | ✓         | ✓         | ✓    | ✓    |
| 4              | 32       | ✓            | ✓         |           | ✓    | ✓    |
| 4              | 37       | ✓            | ✓         | ✓         | ✓    |      |
| 4              | 120      | ✓            | ✓         | ✓         |      | ✓    |

ST – subteloméricas; MD – microdeleções; FMR1 – Análise de fragmentos no estudo do gene FMR1.

## 2.2. Métodos

A análise destes indivíduos foi feita com base na informação clínica e nos resultados do laboratório recorrendo a técnicas de citogenética convencional, citogenética molecular, biologia molecular e genómica.

### 2.2.1. Citogenética convencional

A citogenética convencional foi feita a partir de culturas sincronizadas de linfócitos de sangue periférico, de acordo com os procedimentos de rotina do laboratório, protocolos adaptados a partir do manual *Current Protocols in Human Genetics* (Bangs & Donlon, 2005).

Os cromossomas com um padrão de bandas GTG foram analisados com um nível de resolução de 550 a 700 bandas seguindo a nomenclatura estabelecida pelo *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) (Shaffer et al., 2009).

Em cada paciente foram analisadas 10 a 15 metafases (Figura 6) utilizando um microscópio de *Nikon Eclipse* (*Nikon Instruments Europe B.V., Badhoevedorp, Holanda*), acoplado com um sistema de *Cytovision* (*Applied Imaging International Lda, Newcastle upon Tyne, UK*).

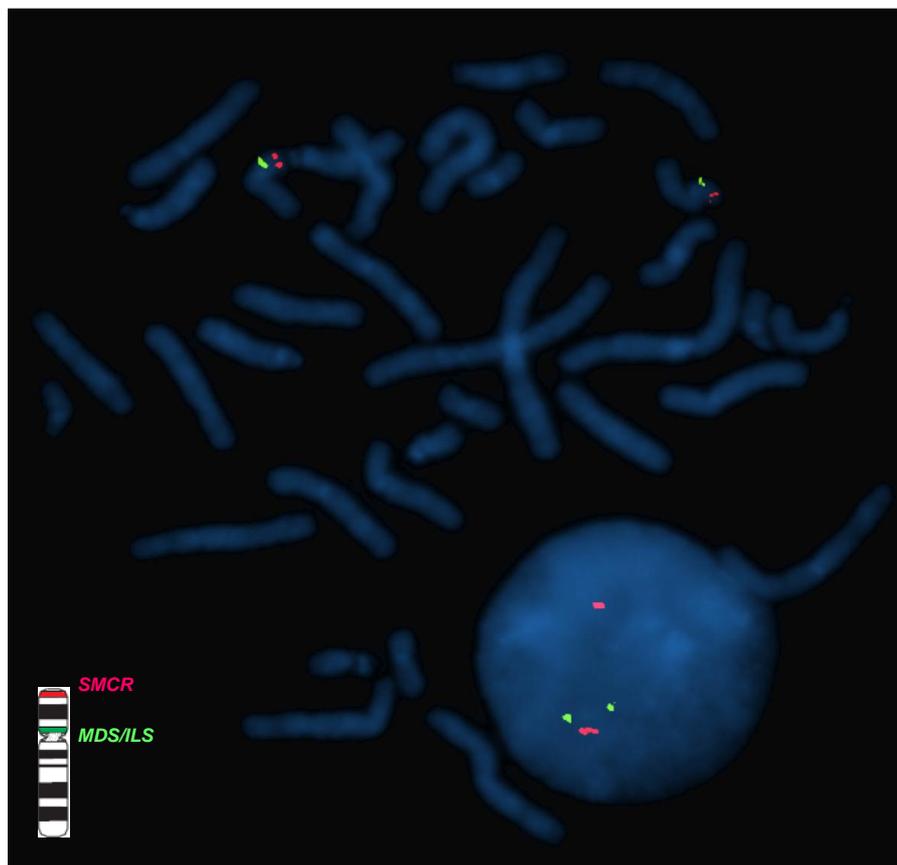


**Figura 6.** Metafase de um indivíduo do sexo feminino (46,XX) (imagem cedida pelo LCG – FMUC).

### 2.2.2. Citogenética Molecular

A técnica de FISH foi realizada em metafases a partir de culturas sincronizadas de linfócitos de sangue periférico, de acordo com os procedimentos de rotina do laboratório, com os protocolos adaptados a partir do manual *Current Protocols in Human Genetics* (Knoll & Lichter, 2005) e com o recomendado pelo fabricante.

Os resultados foram analisados utilizando um microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse* (*Nikon Instruments Europe B.V., Badhoevedorp, Holanda*), acoplado com um sistema de *Cytovision* (*Applied Imaging International Lda, Newcastle upon Tyne, UK*) (Figura 7).



**Figura 7.** Hibridização da sonda (*SMCR* e *MDS/LS*) para a região crítica da síndrome de Smith-Magenis (17p11.2), num indivíduo do sexo feminino que apresenta um resultado normal, observado em cromossomas em metafase, como em interfase (imagem cedida pelo LCG – FMUC).

Nos dois anos em que decorreu este trabalho foi aplicada a metodologia de FISH apenas para a confirmação dos resultados de alterações citogenéticas estruturais desequilibradas detetadas através de outra metodologia.

Foram usadas sondas de sequência única, centroméricas e subteloméricas que marcam especificamente nas regiões discriminadas na tabela 3.

**Tabela 3.** Sondas aplicadas para a confirmação dos resultados alterados utilizando a metodologia de FISH.

| Sonda                 | Fabricante                     | Cromossoma | Região         |
|-----------------------|--------------------------------|------------|----------------|
| <i>RP11-178D12</i>    | <i>BlueGnome</i>               | 15         | 15q21.3        |
| <i>SMCR e MDS/ILS</i> | <i>Cytocell Aquarius</i>       | 17         | 17q11.2        |
| <i>ToTelVysion</i>    | <i>Vysis, Abbott Molecular</i> | Todos      | Subteloméricas |

### 2.2.3. Extração de DNA

Para a execução das técnicas de MLPA e aCGH, bem como do estudo das formas alélicas do gene *FMR1* foi necessário a realização da extração do DNA genómico a partir de linfócitos de sangue periférico.

Esta foi realizada por um método de extração em colunas (*Jetquick DNA Midi Spin kit – Genomed, Alemanha*) em concordância com o protocolo recomendado pelo fabricante.

O DNA extraído foi quantificado e determinado o seu grau de pureza utilizando um espectrofotómetro *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA)*. Para garantia de resultados fidedignos foi necessário assegurar que as amostras de DNA tivessem uma concentração mínima de 40 ng/µl e um grau de pureza entre 1.8 e 2.0, dado pelo quociente de absorvância entre 260 a 280 nm, de acordo com o recomendado pelo fabricante ([www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)).

#### **2.2.4. Biologia Molecular**

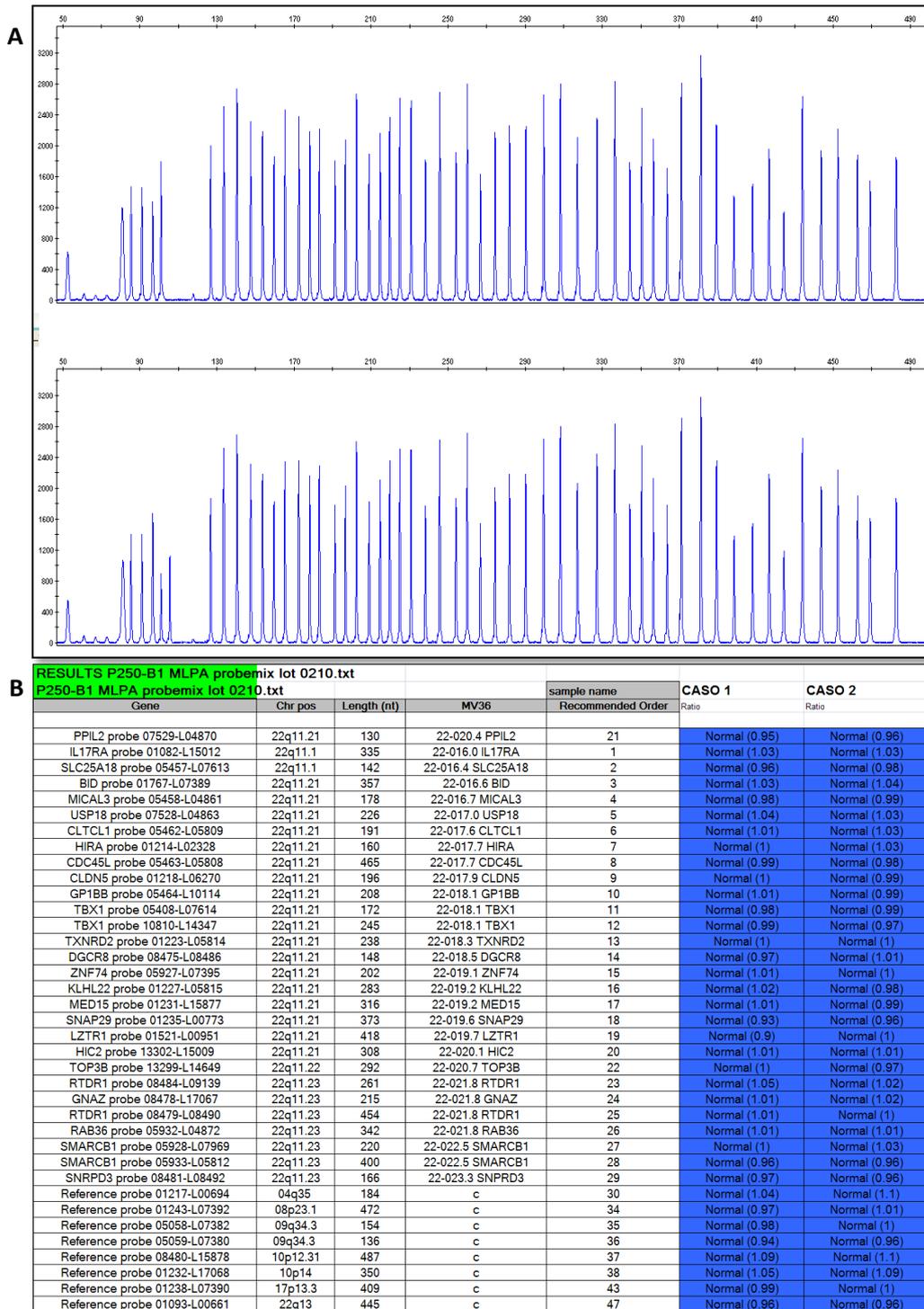
O MLPA é um método que deteta alterações no números de cópias em mais de 45 regiões específicas em uma única reação de PCR, utilizando um único par de *primers*, necessitando apenas de 20ng de DNA genómico.

Para cada reação de MLPA utilizaram-se três controlos, amostras de DNA normais para as regiões estudadas e representativas da população saudável. Aplicou-se também um controlo negativo, onde se adiciona água (*Nuclease Free Water*) em vez de DNA, para excluir possíveis contaminações nas reações.

A reação MLPA realizada num termociclador *ABI 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA)* iniciou-se com a desnaturação do DNA. Após a hibridação das sondas de MLPA na sequência de DNA alvo, os oligonucleótidos da sonda são enzimaticamente ligados, realizando-se a reação de ligação. Os produtos, da reação de ligação, são amplificados numa reação de PCR.

A separação dos produtos de amplificação foi feita por eletroforese capilar num sequenciador *ABI PRISM TM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA)*. Os resultados são observados através do *software GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA)*, e a sua análise foi feita através do *software Coffalyser 9.4 (MRC-Holland, Amsterdão, Holanda)*.

Este compara a quantidade relativa dos produtos de amplificação da sonda do paciente com uma amostra de DNA de referência, refletindo o número de cópias alvo. Sempre que o valor para o número de cópias foi inferior a 0,7 foi interpretado como perda e valores superiores a 1,3 foram interpretados como ganho (Figura 8).



**Figura 8. (A)** Eletroferograma de resultados normais através da aplicação da técnica de MLPA utilizando o painel de sondas para a região crítica 22q11.2 (*salsa MLPA: P250-B1*); **(B)** Análise dos resultados normais através do *software Coffalyser 9.4*. (imagens cedidas pelo LCG – FMUC).

Neste trabalho foram utilizados os painéis de sondas que estudam a maioria dos rearranjos desequilibrados nas regiões descritas como causadoras de DC e distúrbios do comportamento, *salsa MLPA: P245-A2, P250-B1, P343-C1, ME028-B1, P036-E1 e P070-B2 (MRC-Holland, Amsterdão, Holanda)* (Tabela 4 e 5).

A *salsa MLPA: P245-A2* inclui sondas específicas para regiões associadas a síndromes de microdeleção relacionadas com DC e autismo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Síndromes de microdeleção detetadas por MLPA (painel de sondas *P245-A2*, adaptado *MRC-Holland, Amsterdão, Holanda*).

| <b>Síndromes de microdeleção detetadas com a <i>salsa MLPA - P245-A2</i>:</b> |
|---|
| Síndrome de deleção 1p36  |
| Síndrome de Microdeleção 2p16   |
| Síndrome de Microdeleção 3q29   |
| Síndrome de Microdeleção 9q22.3   |
| Síndrome de deleção 15q24   |
| Síndrome de Microdeleção 17q21  |
| Síndrome de Phelan-McDermid, 22q13  |
| Síndrome de Cri du Chat, 5p15   |
| Síndrome de DiGeorge, 22q11   |
| Síndrome de DiGeorge região 2, 10p15  |
| Síndrome de Langer-Giedion, 8q  |
| Síndrome de Miller-Dieker, 17p  |
| Síndrome de Microdeleção NF1, 17q11.2   |
| Síndrome de Prader-Willi / Angelman, 15q11.2                                  |
| Síndrome de duplicação do gene <i>MECP2</i> , Xq28                            |
| Síndrome de Rubinstein-Taybi, 16p13.3   |
| Síndrome de Smith-Magenis, 17p11.2  |
| Síndrome de Sotos, 5q35.3   |
| Síndrome de WAGR , 11p13  |
| Síndrome de Williams, 7q11.23   |
| Síndrome de Wolf-Hirschhorn 4p16.3  |

A *salsa MLPA: P250-B1* é específica para o estudo das síndromes de DiGeorge, VeloCardioFacial e de Cat Eye, contendo sondas para a região crítica 22q11.2 (Tabela 5).

A *salsa MLPA: P343-C1* contém sondas específicas para regiões associadas a autismo, a região 15q11q13 (*UBE3A*, *GABRB3*), a região da microdeleção 15q13 (*CHRNA7*), a região 16p11 e a região 22q13 (*SHANK3*) (Tabela 5).

A *salsa MLPA: ME028-B1* é específica para o estudo das síndromes de Prader-Willi e Angelman, contendo sondas para a região 15q11.2 (Tabela 5).

Para a análise das regiões subteloméricas foram utilizados dois painéis de sondas em simultâneo *P036-E1* e *P070-B2* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Regiões estudadas pelos painéis de sondas *P250-B1*, *P343-C1*, *ME028-B1*, *P036-E1* e *P070-B2*, utilizados neste trabalho.

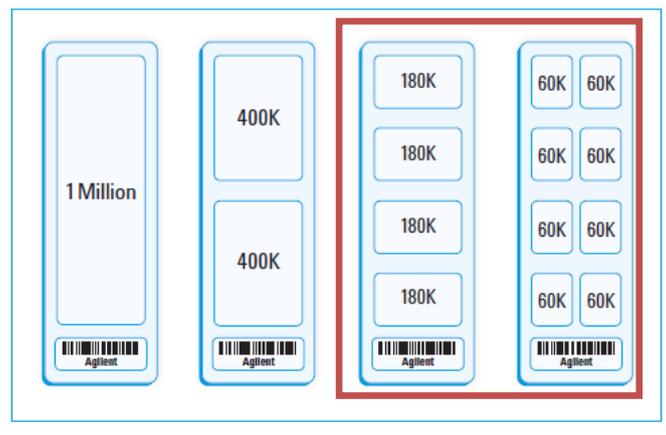
| Painel de sondas                | Região estudada                                |
|---------------------------------|--|
| <i>P250-B1</i>                  | 22q11.2  |
| <i>P343-C1</i>                  | 15q11q13; 15q13; 16p11; 22q13                  |
| <i>ME028-B1</i>                 | 15q11.2  |
| <i>P036-E1</i> e <i>P070-B2</i> | Regiões subteloméricas de todos os cromossomas |

### 2.2.5. Genómica – Cariótipo Molecular

Para o estudo de aCGH o DNA genómico de cada paciente foi hibridizado em *loop/trio*, em que se cruzam 3 pacientes com fenótipos distintos entre si.

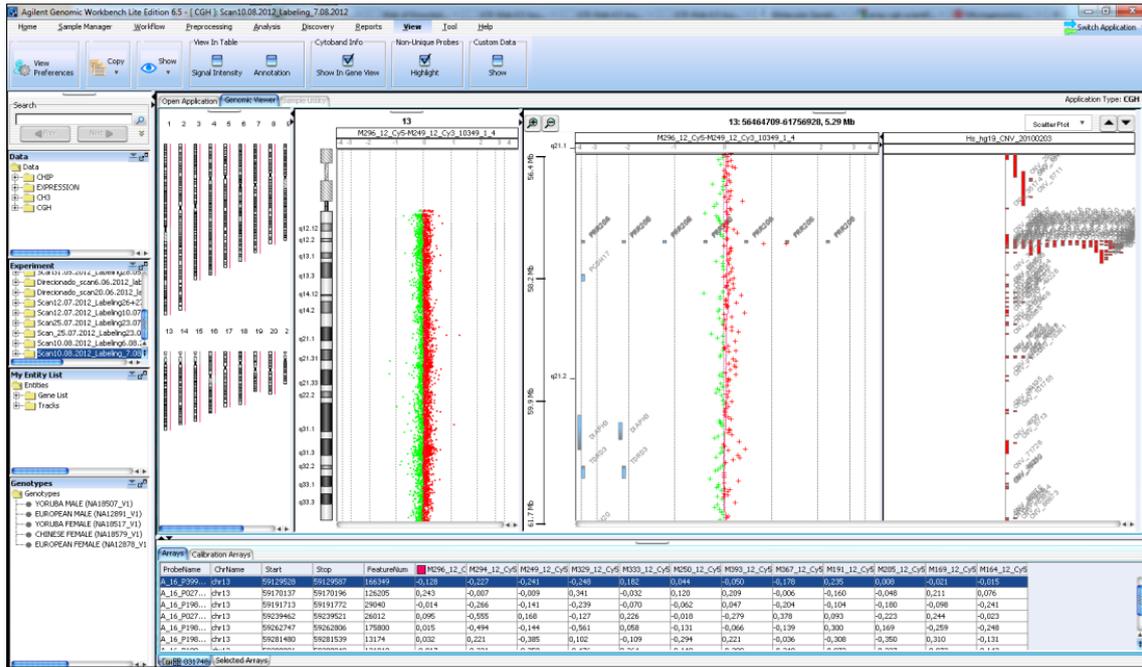
Após a preparação do DNA procede-se ao *labeling* utilizando o *Agilent Genomic DNA enzymatic labeling kit* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*) de acordo com as recomendações do fabricante.

Nas amostras analisadas, neste estudo, foram utilizados dois tipos de formatos de microarray *Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*), *Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 60 K*, um microarray de oligonucleótidos contendo aproximadamente 60 000 sondas de 60 bp com um espaçamento médio de 54 Kb e *Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 180 K* um microarray de oligonucleótidos contendo aproximadamente 180 000 sondas de 60 bp com um espaçamento médio entre sondas de 17 Kb (Figura 9).



**Figura 9.** Exemplos de formatos *Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*), correspondendo as duas últimas lâminas, 180Kb e 60Kb, aos formatos utilizados neste estudo (adaptado de [http://www.lncbio.com/agilent/microarray\\_1\\_2.asp](http://www.lncbio.com/agilent/microarray_1_2.asp)).

Após a hibridação, a plataforma de oligoarray foi digitalizada no *Agilent Microarray Scanner System* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*) e os resultados processados com o software *Feature Extraction (v10.7)* e analisados no *Agilent Genomic Workbench (v6.0)*, com as seguintes configurações: ADM2 como algoritmo de alteração, com o desvio padrão de 6.0 e com a média de 2 Mb (Figura 10) (Ferreira et al., 2012).



**Figura 10.** Análise do cromossoma 13 sem alterações cromossômicas desequilibradas, originando um resultado normal obtido pela metodologia de aCGH (imagem cedida pelo LCG – FMUC).

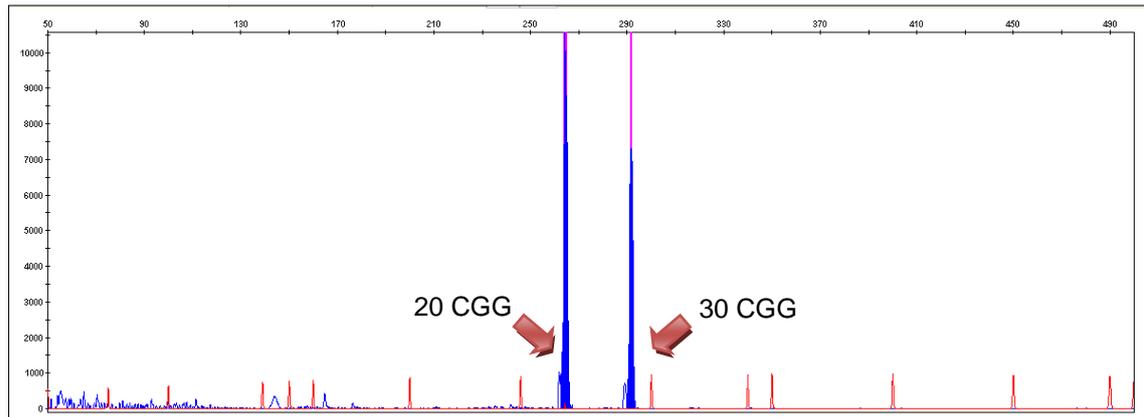
A validação dos resultados das alterações estruturais desequilibradas detetadas por aCGH e a análise das amostras dos pais para determinar a origem e avaliar o significado clínico da alteração foram realizadas através das técnicas de citogenética convencional, FISH e/ou MLPA.

### 2.2.6. Análise de fragmentos no estudo do gene *FMR1*

A determinação do número de repetições do trinucleótido CGG do gene *FMR1* foi feita pela análise de fragmentos, sendo esta a técnica preferencial para o estudo deste gene pois é um método rápido, que necessita de pouca quantidade de DNA e estabelece a dimensão correta dos alelos normais, intermédio e pré-mutado.

O DNA genómico foi amplificado por uma reação de PCR realizada num termociclador *ABI 2720* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*), utilizando um par de primers específico para o gene *FMR1* (Fu et al, 1991).

A análise dos fragmentos de DNA foi feita com o software GeneScan num sequenciador *ABI PRISM TM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA)*, para determinar a sua dimensão e o número de repetições do trinucleótido CGG como observado na Figura 11. O tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com o padrão de peso molecular *ROX 500 (Applied Biosystems, Foster City, USA)*.



**Figura 11.** Resultado de análise do gene *FMR1* pela técnica de PCR de uma mulher com 2 alelos normais com 20 e 30 repetições CGG (imagem cedida pelo LCG – FMUC).

De forma a esclarecer os resultados obtidos pela análise de fragmentos da PCR, quando não se verifica amplificação nas amostras do sexo masculino ou quando se obtém apenas um fragmento em amostras do sexo feminino, utiliza-se a técnica de *AmplideX® FMR1 PCR (Asuragen, Inc., Austin, USA)*, que se baseia num *Triplet Repeat Primed PCR* (Warner et al., 1996), de acordo com o recomendado pelo fabricante (Hawkins et al., 2011).

O PCR convencional não tem capacidade de amplificar mutações nem pré-mutações de grande dimensão, apenas detetáveis pela técnica de *Triplet Repeat Primed PCR*, permitindo assim analisar homens com mutação completa e distinguir entre mulheres homozigóticas normais e mulheres com mutação completa.

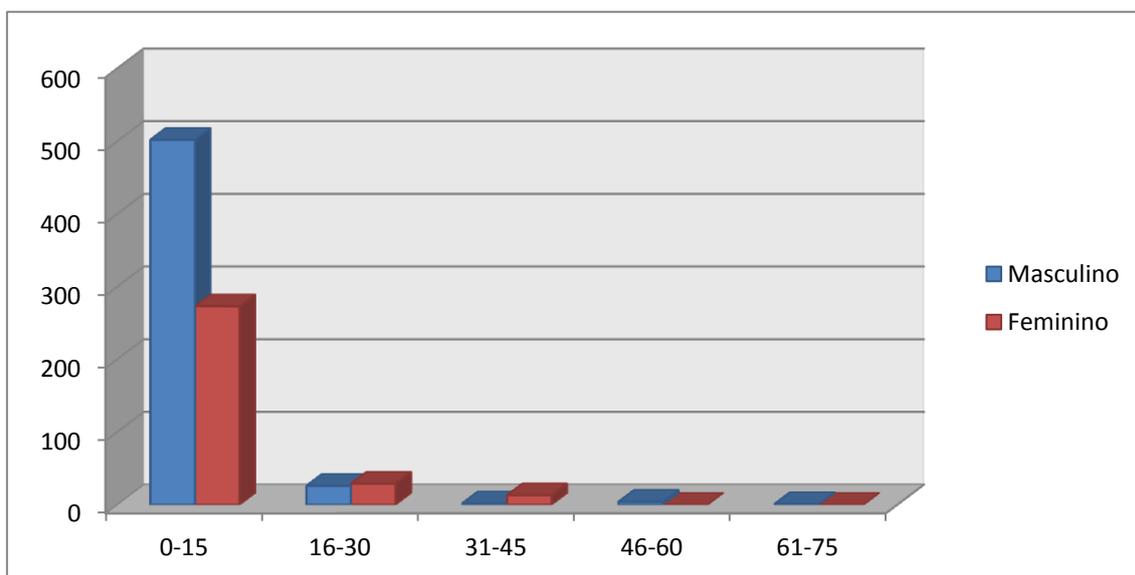
### **3. RESULTADOS**

### 3.1. Caracterização da amostra

Em 850 casos foi realizado o estudo citogenético, molecular e/ou genómico, sendo que a maior parte dos indivíduos tem DC (83,8%) e os restantes autismo. Alguns destes pacientes apresentam em simultâneo outros défices e distúrbios do comportamento, bem como dismorfismos em cerca de 32% dos casos, baixa estatura em 4,6%, epilepsia em cerca de 4%, défice de atenção e hiperatividade em 1,2%, surdez em cerca de 1%, estrabismo e cardiopatia em 0,35% e ataxia em 0,24% dos casos.

A média de idades foi de aproximadamente 9 anos, com uma frequência elevada no grupo de idades dos 0 aos 15 anos. O indivíduo estudado mais novo tem 4 dias e o mais velho tem 67 anos (Figura 12).

Na amostra estudada há uma frequência maior de indivíduos do sexo masculino (63,4%) do que do sexo feminino (36,6%). Se a proporção nos indivíduos com DC entre o sexo masculino (49,72%) e o sexo feminino (34,05%) foi de 1,5:1, no grupo que apresenta autismo a proporção entre o sexo masculino (13,64%) e o sexo feminino (2,7%) foi de 5:1.



**Figura 12.** Distribuição por sexo e idade (em anos) dos 850 pacientes da amostra do estudo.

### 3.2. Descrição de resultados de acordo com as metodologias utilizadas

Dos 850 pacientes incluídos neste estudo em 572 foi efetuada a análise citogenética, em 684 foi aplicado o MLPA, 340 foram estudados pela metodologia de aCGH e em 416 foi realizada a análise de fragmentos no estudo do gene *FMR1* (Tabela 6).

As metodologias utilizadas no âmbito deste trabalho detetaram alterações cromossômicas em 133 casos (15,7%). Destes 10 foram identificados pela análise citogenética convencional, 19 pela técnica de MLPA, 99 pela metodologia de aCGH e 5 pela análise de fragmentos no estudo do gene *FMR1* (Tabela 6).

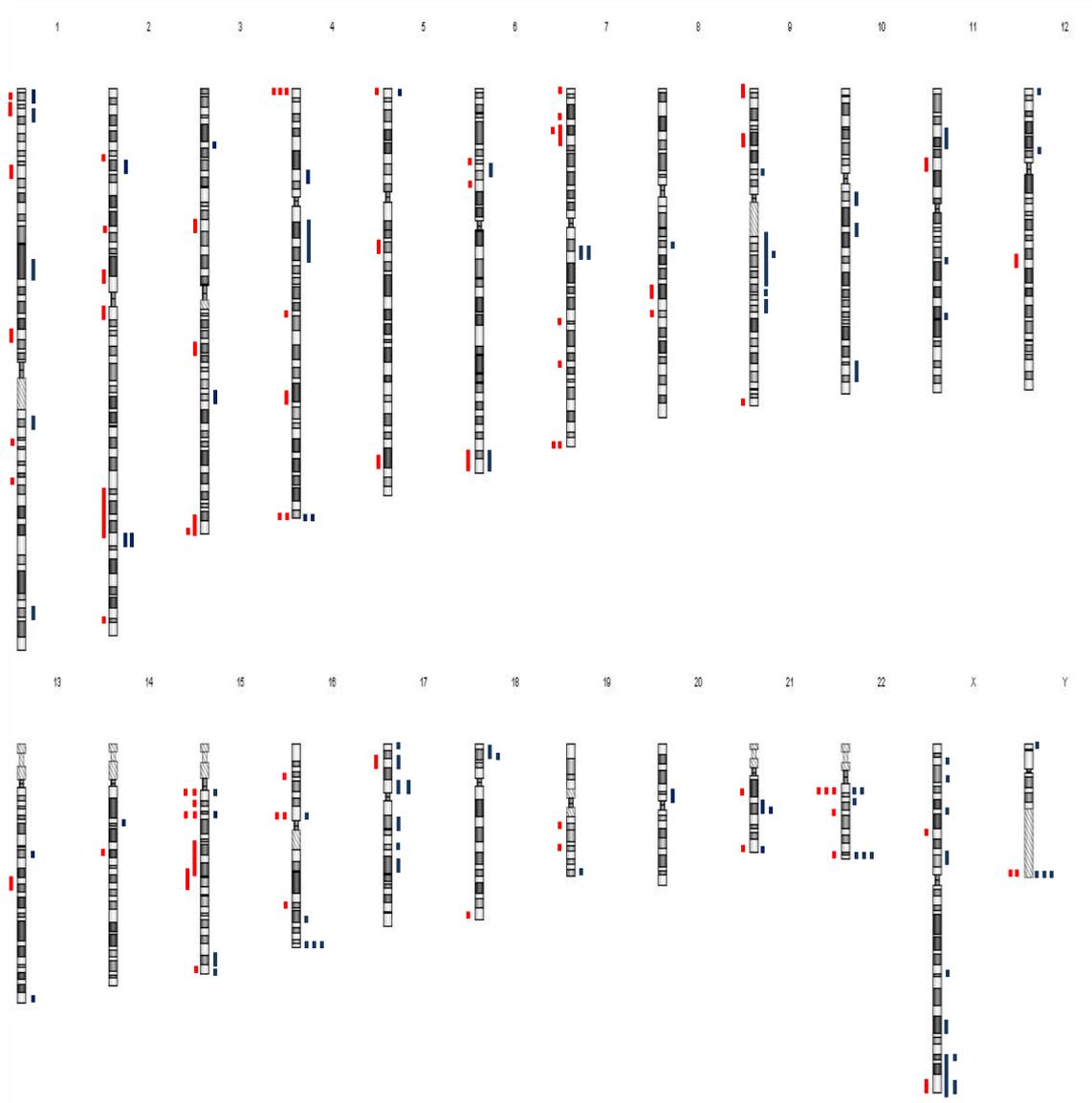
**Tabela 6.** Distribuição das alterações cromossômicas e genômicas encontradas pelas metodologias utilizadas neste estudo.

| Metodologia  | Nº casos que apresentam alterações | Nº de casos estudado | Taxa de detecção |
|--|------------------------------------|----------------------|------------------|
| <b>Citogenética Convencional</b>                           | 10                                 | 572                  | 1,8%             |
| <b>MLPA</b>  | 19                                 | 684                  | 2,8%             |
| <b>aCGH</b>  | 99                                 | 340                  | 29,2%            |
| <b>Análise de fragmentos no estudo do gene <i>FMR1</i></b> | 5                                  | 416                  | 1,2%             |

Nos 133 casos foram detetadas três alterações numéricas (Tabela 7), envolvendo os cromossomas sexuais. Em quatro casos foram observadas rearranjos cromossômicos equilibrados, sendo todas translocações (Tabela 7).

Nos restantes 126 pacientes foram encontradas alterações cromossômicas desequilibradas, deleções e duplicações (Figura 13). Em 27 casos observou-se mais do que uma alteração.

Pelo estudo citogenético, molecular e genómico realizados nestes 126 casos foi possível identificar 151 alterações cromossómicas desequilibradas, 73 deleções e 78 duplicações (Figura 13).



**Figura 13.** Distribuição das alterações cromossómicas desequilibradas encontradas nos pacientes envolvidos neste estudo (deleções a vermelho, do lado esquerdo e duplicações a azul, do lado direito).

### 3.2.1. Citogenética Convencional

A análise citogenética, realizada em 10 a 15 metafases com um padrão de 550 a 700 bandas GTG, foi efetuada em 572 amostras e permitiu a detecção de 10 alterações cromossômicas (Tabela 7).

As idades dos 10 pacientes que apresentaram resultados alterados situam-se entre os 3 e os 35 anos de idade, quatro deles são do sexo masculino e seis são do sexo feminino.

Em oito casos o quadro clínico observado foi o DC, dois deles também apresentavam dismorfismos e noutros dois o fenótipo manifestado era de autismo.

As três alterações numéricas, detetadas pelo estudo citogenético, envolvem o número dos cromossomas sexuais. Dois casos (1 e 2 – Tabela 7) estão associados à síndrome de Klinefelter (47,XXY). O terceiro caso (3 – Tabela 7) é uma variante da síndrome de Turner. É uma situação de mosaico com duas linhas celulares em que, na maioritária o cariótipo é compatível com a síndrome de Turner (45,X) e na outra está presente um cromossoma marcador (Figura 14 – A).

Os quatro rearranjos equilibrados estudados foram translocações (casos 4 a 7 – Tabela 7), em que uma delas era *de novo*, uma vez que o estudo citogenético dos progenitores foi normal. Nas outras duas uma é de origem materna e outra de origem paterna, sendo ambas idênticas às alterações observadas nos pais. E houve outra em que não foi possível realizar o estudo dos progenitores, desconhecendo-se portanto a origem desta alteração (Tabela 7).

Os dois rearranjos estruturais desequilibrados identificados pela citogenética convencional foram um mosaico do cromossoma 21 (caso 8 – Tabela 7) em anel (Figura 15 – A) e uma duplicação em 9q13q21 (caso 9 – Tabela 7) de origem paterna (Figura 16 – A).

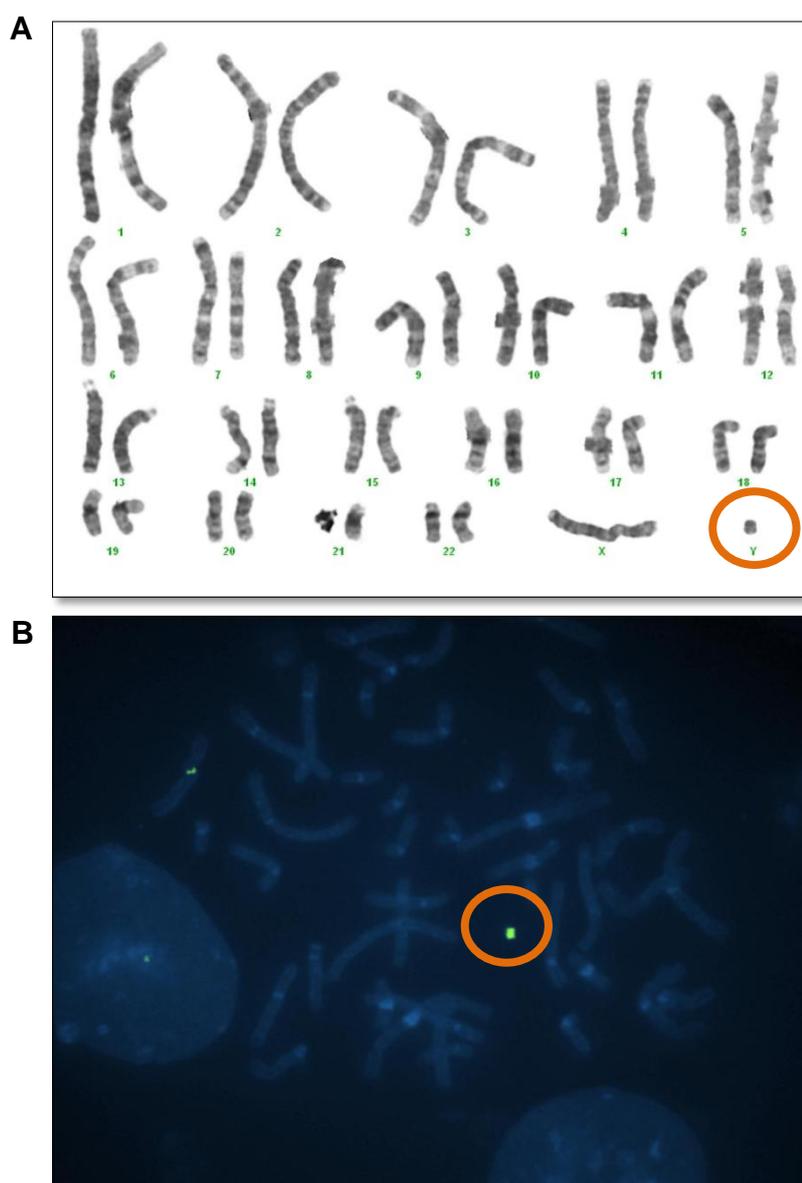
Três dos casos foram melhor caracterizados pela técnica de FISH, uma vez que se tratavam de duas situações de cromossomas marcadores (casos 3 e 8 – Tabela 7) e uma em que se verificava um aumento significativo de uma banda do cromossoma 21 (caso 10 – Tabela 7), em que era necessário averiguar qual a origem do material adicional, se era uma duplicação parcial deste ou se era material de outro cromossoma (Figura 17).

**Tabela 7.** Alterações encontradas pela análise de citogenética convencional em 572 pacientes.

| Nº | Idade | Sexo | Fenótipo                | Alteração   |
|----|-------|------|-------------------------|---|
| 1  | 3     | M    | DC                      | 47,XXY  |
| 2  | 6     | M    | DC                      | 47,XXY  |
| 3  | 35    | F    | DC                      | mos45,X[47]/46,X+mar[3].ish der(X)(DXZI++)  |
| 4  | 8     | F    | DC+<br><br>Dismorfismos | 46,XX,t(4;8)(q31.2;p23.2)dn   |
| 5  | 7     | F    | Autismo                 | 46,XX,t(13;15)(q22;q26.1)   |
| 6  | 10    | F    | DC                      | 46,XX,t(4;17)(q31.1;q23.3)mat   |
| 7  | 10    | M    | DC                      | 46,XY,t(3;11)(p13;q14.2)pat   |
| 8  | 12    | F    | DC+<br><br>Dismorfismos | mos46,XX,r(21)(p11.2;q22.3).ishr(21)(p11.2;q22.3)(D21S1575,DSCR+,DI321/D2121+)[39]/46,XX,dup r(21)[1]dn |
| 9  | 11    | M    | Autismo                 | 46,XY,dup9(q13q21)pat   |
| 10 | 8     | F    | DC                      | 46,XX,der(21).ish (21;4)(q21;q13.1q13.3).arr 4q13.1q13.3(62,818,354-71,447,607)x3mat                    |

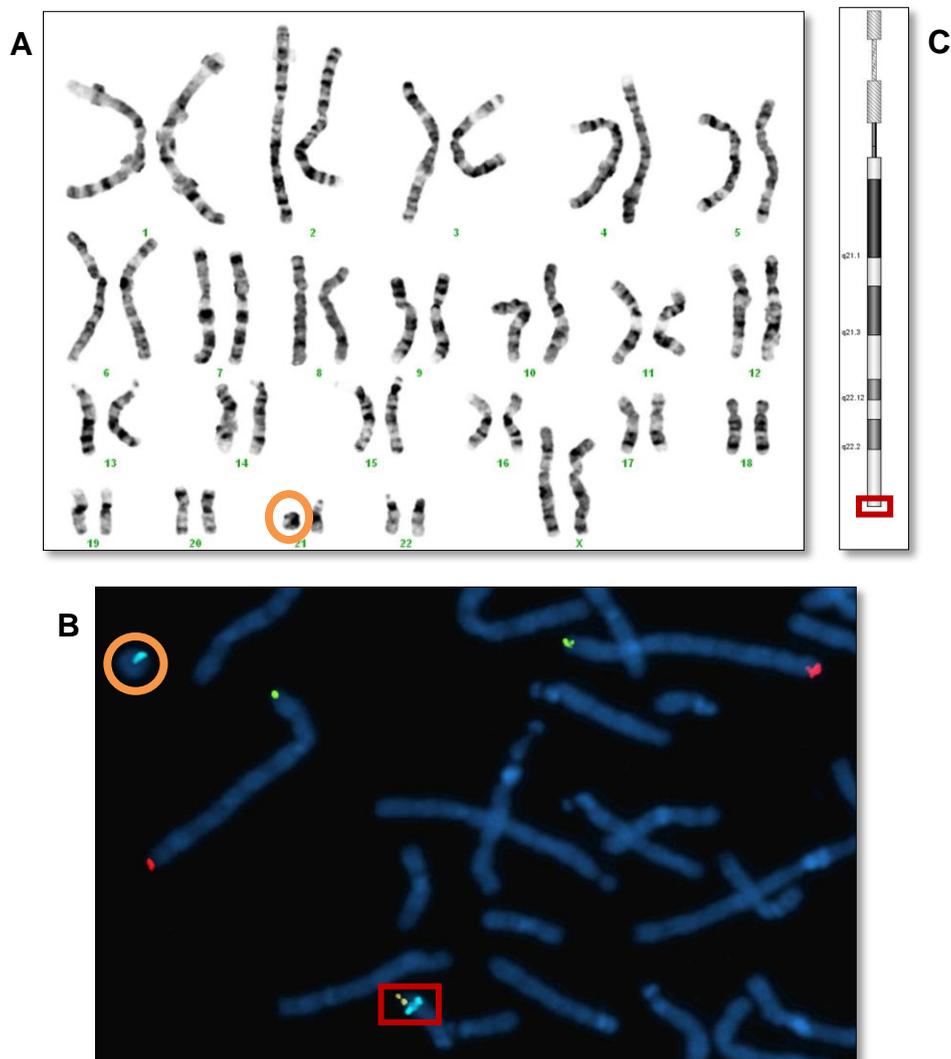
M – masculino; F – feminino; DC – déficit cognitivo; dn – *de novo*; pat – de origem paterna; mat – de origem materna; mos – mosaico; dup – duplicação; t – translocação; r – anel; der – derivativo.

No caso 3 (Tabela 7) a análise das metafases revelou um mosaico com duas linhas celulares: mos 45,X[47]/46,X,+mar[3].ish der(X)(DXZ1++). Em três metafases observou-se um cromossoma marcador (Figura 14 – A). A técnica de FISH demonstrou que o marcador tinha origem no cromossoma X e era dicêntrico (Figura 14 – B).



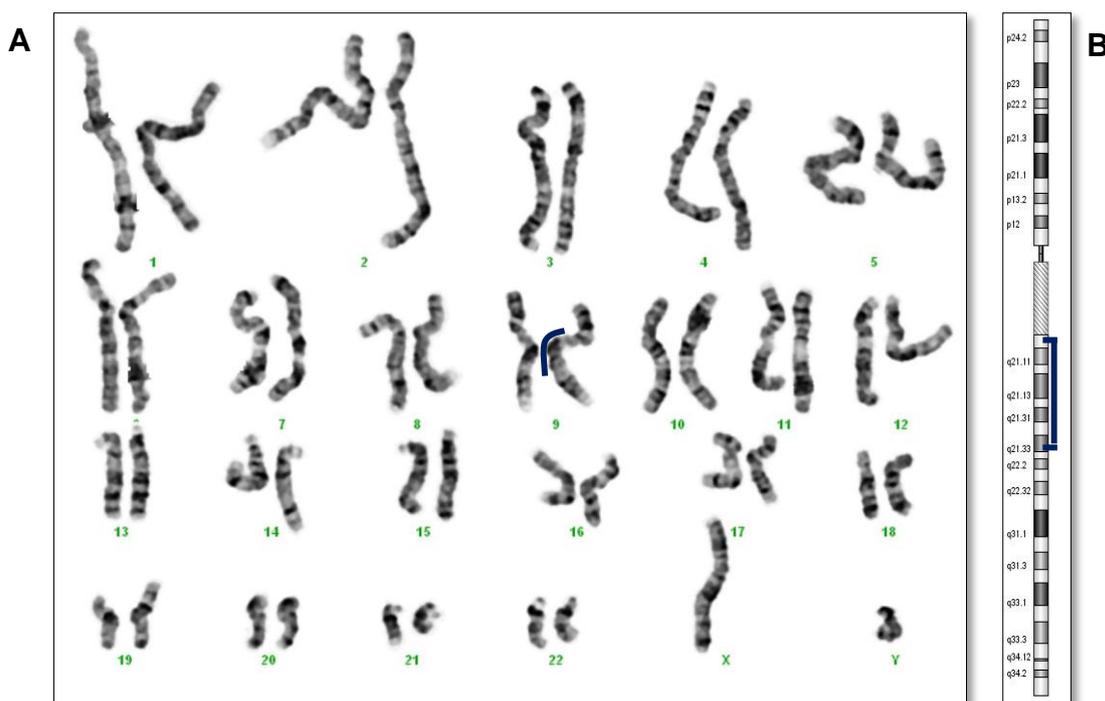
**Figura 14. (A)** Cariograma de uma mulher com cromossoma marcador; **(B)** Hibridização do cromossoma marcador pela sonda centromérica (DXZ1), revelando a sua origem no cromossoma X (imagens cedidas pelo LCG – FMUC).

No estudo do cariótipo do caso 8 (Tabela 7) observou-se, nas metafases analisadas, um cromossoma 21 normal e o outro em anel (Figura 15 – A). Numa das metafases identificou-se um anel duplicado, o que está associado à instabilidade do rearranjo envolvido. A técnica de FISH revelou uma deleção para a região subtelomérica 21qter (*D21S1575-*) (Figura 15 – B e C). É um rearranjo desequilibrado *de novo*, uma vez que nenhum dos progenitores é portador, com uma monossomia da região terminal do cromossoma 21.



**Figura 15. (A)** Cariograma de um indivíduo do sexo feminino com um anel do cromossoma 21; **(B)** Hibridização da mistura de sondas subteloméricas para os cromossomas 4 e 21, identificando uma deleção na região terminal do cromossoma 21 em anel (imagens cedidas pelo LCG – FMUC); **(C)** Idiograma do cromossoma 21 com localização da deleção caracterizada pela citogenética molecular.

O estudo citogenético do caso 9 (Tabela 7) identificou uma trissomia parcial do braço longo do cromossoma 9, em 9q13q21 (Figura 16 – A e B) e averiguou que o material duplicado envolve regiões codificantes e não corresponde a um aumento da região polimórfica deste cromossoma, estando localizado logo abaixo dessa região. Trata-se de uma alteração de origem paterna idêntica à do progenitor, cujo fenótipo se desconhece.



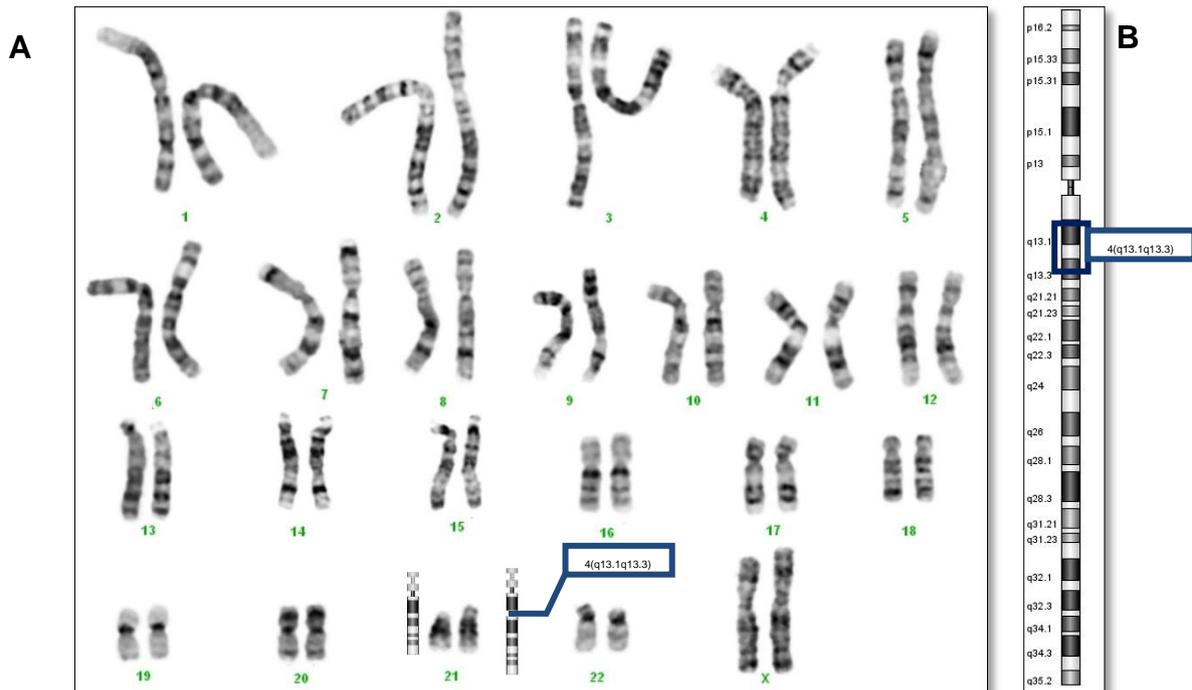
**Figura 16. (A)** Cariograma de indivíduo do sexo masculino com uma duplicação de origem paterna do braço longo do cromossoma 9 (imagem cedida pelo LCG – FMUC); **(B)** Ideograma do cromossoma 9 com localização da região duplicada.

No caso 10 (Tabela 7) a observação das metafases, com um padrão de 700 bandas GTG, sugeriu uma duplicação do braço longo do cromossoma 21 pela presença de material adicional em 21q21 (Figura 17 – A).

A análise por aCGH não revelou qualquer alteração no cromossoma 21. No entanto demonstrou que a região do braço longo do cromossoma 4 (entre as posições nucleotídicas 62,818,354 e 71,447,607) apresentava material duplicado numa extensão de aproximadamente 8.6 Mb, envolvendo 47 genes (Figura 17 – B).

Esta inserção foi confirmada recorrendo à técnica de FISH, verificando-se que a alteração observada na citogenética corresponde a uma inserção de material do cromossoma 4(q13.1q13.3) no cromossoma 21(q21).

O estudo dos progenitores revelou que esta alteração é de origem materna, em que a mãe possui a mesma alteração desequilibrada e o fenótipo de DC.



**Figura 17.** (A) Cariograma de um indivíduo do sexo feminino portador de uma inserção parcial do braço longo do cromossoma 4(q13.1q13.3) no braço longo do cromossoma 21(q21) (imagem cedida pelo LCG – FMUC); (B) Ideograma do cromossoma 4 com localização da duplicação caracterizada pela aCGH.

Dos 552 casos com o resultado do cariótipo normal, em 197 casos foi feito o estudo das regiões críticas associadas a síndromes de microdeleções, pela técnica de MLPA, permitindo a identificação de duas microdeleções (Tabela 8).

Nestes casos (552) também foram estudadas as regiões subtelo méricas pelo MLPA onde se verificaram cinco alterações submicroscópicas desequilibradas, duas microdeleções e três microduplicações (Tabela 8).

Dos 552 pacientes que obtiveram resultado normal pelo estudo citogenético analisaram-se 168 pela metodologia de aCGH, destes em 53 observaram-se rearranjos submicroscópicos desequilibrados (Tabela 8).

Também foi realizada a análise de fragmentos do gene *FMR1*, em 281 destes casos (552), que demonstrou a presença de duas mutações completas (Tabela 8).

A aplicação das metodologias (MLPA, aCGH e análise de fragmentos do gene *FMR1*) aos pacientes com cariótipo normal (552) identificou 63 alterações submicroscópicas desequilibradas, aumentando a taxa de deteção em 11,2%.

**Tabela 8.** Casos com alterações detetadas pelas técnicas de MLPA, aCGH e análise de fragmentos no estudo dos 552 pacientes com cariótipo normal.

| <b>Técnicas aplicadas</b>                                  | <b>Nº de casos com alteração</b> | <b>Nº de casos com cariótipo normal</b> | <b>Percentagem de alterações</b> |
|--|----------------------------------|---|----------------------------------|
| <b>MLPA (MD)</b>   | 2                                | 197                                     | 1%                               |
| <b>MLPA (ST)</b>   | 5                                | 320                                     | 1,6%                             |
| <b>aCGH</b>  | 53                               | 168                                     | 31,5%                            |
| <b>Análise de fragmentos no estudo do gene <i>FMR1</i></b> | 2                                | 281                                     | 0,7%                             |
| <b>Nº total de casos estudados</b>                         | 62                               | 552                                     | 11,2%                            |

### 3.2.2. Biologia Molecular

Dos 684 pacientes estudados pela técnica de MLPA, em que foi realizado o estudo das regiões críticas associadas a variadas síndromes foram utilizados os painéis de sondas *P245-A2* (síndromes de microdeleções/microduplicações), *P250-B1* (região crítica 22q11.2), *P343-C1* (regiões críticas associadas a autismo) e *ME028-B1* (região crítica 15q11.2) e pela análise das regiões subteloméricas (painéis de sondas *P036-E1* e *P070-B2*), em 19 casos verificaram-se alterações submicroscópicas desequilibradas (Tabela 9).

O painel de sondas que estuda as regiões críticas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação (*P245-A2*) foi aplicado em 140 pacientes e identificou duas microduplicações (Tabela 9).

Obteve-se uma microdeleção pelo painel de sondas que estuda a região crítica 22q11.2 (*P250-B1*) nos 61 pacientes estudados (Tabela 9).

O estudo em 125 pacientes feito através do painel de sondas que analisa as regiões críticas associadas a autismo (*P343-C1*) revelou dois casos com microdeleção (Tabela 9).

Em 92 pacientes foi aplicado o painel de sondas que identifica alterações na região crítica 15q11.2 (*ME028-B1*), no entanto não se obtiveram resultados alterados (Tabela 9). Este painel foi bastante usado na confirmação de alterações obtidas pela metodologia de aCGH (secção 3.2.3).

Pela aplicação dos painéis de sondas específicos para as regiões subteloméricas (*P036-E1* e *P070-B2*) foram reveladas 16 alterações submicroscópicas, 8 microdeleções e 8 microduplicações nas regiões terminais dos cromossomas, em 14 dos 416 pacientes estudados (Tabela 9 e 10).

A aplicação dos diferentes painéis de sondas nos pacientes estudados (684) está de acordo com a indicação clínica. Verificando-se em alguns casos que o estudo realizado foi feito em mais do que um painel de sondas. Após um resultado normal a aplicação de outro painel de sondas dependia do quadro clínico apresentado pelo doente.

**Tabela 9.** Casos com alterações detetadas pela técnica de MLPA no estudo dos 684 pacientes.

| <b>Painel de sondas</b>   | <b>Nº casos estudados</b> | <b>Nº de casos com alterações</b> | <b>Percentagem de casos com Alterações</b> |
|---|---------------------------|-----------------------------------|--|
| <b><i>P245-A2</i></b><br><b><i>(Microdeleções)</i></b>                    | 140                       | 2                                 | 1,4%                                       |
| <b><i>P250-B1 (22q11.2)</i></b>   | 61                        | 1                                 | 1,6%                                       |
| <b><i>P343-C1 (Autismo)</i></b>   | 125                       | 2                                 | 1,6%                                       |
| <b><i>ME028-B1 (15q11.2)</i></b>  | 92                        | 0                                 | 0%   |
| <b><i>P036-E1; P070-B2</i></b><br><b><i>(Regiões subtelo­méricas)</i></b> | 416                       | 14                                | 3,37%                                      |

Enquanto que pela aplicação dos painéis de sondas, relativos ao estudo das regiões críticas associadas a síndromes de microdeleções, estes só identificaram uma alteração por paciente, no que diz respeito ao estudo das regiões subtelo­méricas verificaram-se dois casos com duas alterações diferentes: num deles uma microdeleção em 4qter e uma microduplicação em 16qter; e noutro duas microduplicações, uma em 15qter e outra em 21qter (Tabela 10 e 13).

**Tabela 10.** Alterações submicroscópicas desequilibradas nos 14 casos detetados no estudo das regiões subtelo­méricas pela técnica de MLPA (*P036-E1; P070-B2*).

| <b>Tipo de alteração</b> | <b>Nº de alterações</b> | <b>Nº de casos alterados</b> |
|--------------------------|-------------------------|------------------------------|
| <b>Microdeleções</b>     | 8                       | 7                            |
| <b>Microduplicações</b>  | 8                       | 7                            |
| <b>Total</b>             | 16                      | 14                           |

O painel de sondas que estuda as regiões críticas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação (*P245-A2*) detetou duas duplicações no braço longo do cromossoma 22 em dois pacientes do sexo masculino, com o quadro clínico de autismo (Tabela 9 e 11):

- Uma duplicação de origem materna em 22q13.33, envolvendo três genes (*SHANK3*, *ACR*, *RABL2B*), numa criança com 4 anos de idade.

- Uma duplicação em 22q11.2, envolvendo um gene (*SNAP29*), numa criança com 11 anos de idade (Figura 18). Neste caso não foi possível o estudo dos progenitores, desconhecendo-se a origem desta alteração.

| RESULTS P245-A2 MLPA probemix lot 0209, 1008.txt |          |             |                 |                   |               |
|--|----------|-------------|-----------------|-------------------|---------------|
| P245-A2 MLPA probemix lot 0209, 1008.txt         |          |             |                 | sample name       | SM258-2010    |
| Gene   | Chr pos  | Length (nt) | MV36            | Recommended Order | Ratio         |
| CLDN5 Probe 12180L06270                          | 22q11    | 196         | 22-017.9 CLDN5  | 41                | Normal (0.97) |
| GP1BB Probe 54640L07615                          | 22q11.21 | 208         | 22-018.1 GP1BB  | 42                | Normal (0.99) |
| SNAP29 Probe 12350L00773                         | 22q11.21 | 373         | 22-019.6 SNAP29 | 43                | Gain (1.55)   |
| SHANK3 Probe 10181-L11409                        | 22q13.33 | 253         | 22-049.5 SHANK3 | 44                | Normal (0.85) |
| SHANK3 Probe 101820L11174                        | 22q13.33 | 382         | 22.049.5 SHANK3 | 44                | Normal (0.98) |

**Figura 18.** Análise dos resultados do estudo por MLPA, através do painel de sondas *P245-A2*, num paciente com uma duplicação de um gene (*SNAP29*) em 22q11.2.

Para confirmar as alterações submicroscópicas desequilibradas encontradas pela metodologia de aCGH (secção 3.2.3), este painel de sondas (*P245-A2*) também foi aplicado em dois pacientes.

**Tabela 11.** Alterações cromossómicas desequilibradas detetadas pelo painel de sondas as regiões críticas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação (*P245-A2*).

| Nº | Idade | Sexo | Fenótipo | Alteração  | Cromossoma, Região | Origem       |
|----|-------|------|----------|------------|--------------------|--------------|
| 1  | 4     | M    | Autismo  | Duplicação | 22q13.33           | Materna      |
| 2  | 11    | M    | Autismo  | Duplicação | 22q11.2            | Desconhecida |

M – masculino; F – feminino.

Através do painel de sondas para a região crítica 22q11.2 (*P250-B1*) (Tabela 9) foi possível detetar uma deleção *de novo* no braço longo do cromossoma 22, em 22q11.21, envolvendo 13 genes (*CLTCL1*, *HIRA*, *CDC45L*, *CLDN5*, *GP1BB*, *TBX1*, *TXNRD2*, *DGCR8*, *ZNF74*, *KLHL22*, *MED15P*, *SNAP29*, *LZTR1*) numa mulher de 27 anos, com o quadro clínico de DC, dismorfismos e epilepsia (Figura 19).

| 250-A1_MLPA_probemix_lot_0509_1208_0408.txt |          |             |                 |                   |               |
|---|----------|-------------|-----------------|-------------------|---------------|
| 1_MLPA_probemix_lot_0509_1208_0408.txt      |          |             |                 |                   |               |
| Gene  | Chr pos  | Length (nt) | MV36            | sample name       | SM406_10      |
|   |          |             |                 | Recommended Order | Ratio         |
| USP18 probe 7528-L04863                     | 22q11.21 | 226         | 22-017.0 USP18  | 5                 | Normal (1.01) |
| CLTCL1 probe 5462-L05809                    | 22q11.21 | 190         | 22-017.6 CLTCL1 | 6                 | LOH (0.53)    |
| HIRA probe 1214-L02328                      | 22q11.21 | 160         | 22-017.7 HIRA   | 7                 | LOH (0.54)    |
| CDC45L probe 5463-L05808                    | 22q11.21 | 463         | 22-017.9 CDC45L | 8                 | LOH (0.47)    |
| CLDN5 probe 1218-L06270                     | 22q11.21 | 196         | 22-017.9 CLDN5  | 9                 | LOH (0.56)    |
| GP1BB probe 5464-L10114                     | 22q11.21 | 208         | 22-018.1 GP1BB  | 10                | LOH (0.48)    |
| TBX1 probe 5408-L07614                      | 22q11.21 | 172         | 22-018.1 TBX1   | 11                | LOH (0.53)    |
| TBX1 probe 7054-L06663                      | 22q11.21 | 301         | 22-018.1 TBX1   | 12                | LOH (0.55)    |
| TXNRD2 probe 1223-L05814                    | 22q11.21 | 238         | 22-018.3 TXNRD2 | 13                | LOH (0.59)    |
| DGCR8 probe 8475-L08486                     | 22q11.21 | 148         | 22-018.5 DGCR8  | 14                | LOH (0.58)    |
| ZNF74 probe 5927-L07395                     | 22q11.21 | 202         | 22-019.1 ZNF74  | 15                | LOH (0.53)    |
| KLHL22 probe 1227-L05815                    | 22q11.21 | 283         | 22-019.2 KLHL22 | 16                | LOH (0.56)    |
| MED15P probe 1231-L05816                    | 22q11.21 | 319         | 22-018.6 MED15P | 17                | LOH (0.56)    |
| SNAP29 probe 1235-L00773                    | 22q11.21 | 373         | 22-019.6 SNAP29 | 18                | LOH (0.48)    |
| LZTR1 probe 1521-L00951                     | 22q11.21 | 418         | 22-019.7 LZTR1  | 19                | LOH (0.52)    |
| HIC2 probe 5931-L04869                      | 22q11.21 | 310         | 22-020.1 HIC2   | 20                | Normal (1.02) |

**Figura 19.** Análise dos resultados do estudo por MLPA, através do painel de sondas *P250-B1*, num paciente com uma deleção *de novo* em 22q11.21, envolvendo 13 genes.

Este painel de sondas (*P250-B1*) foi também utilizado para obter a confirmação das alterações cromossómicas desequilibradas analisadas pela técnica de aCGH (secção 3.2.3) em três pacientes com o quadro clínico de DC e dismorfismos.

Com a aplicação do painel de sondas que analisa as regiões críticas associadas a autismo (*P343-C1*) no DNA de dois pacientes do sexo masculino com o quadro clínico de autismo detetaram-se (Tabela 9 e 12):

- Uma deleção de origem paterna no braço longo do cromossoma 15 em 15q13.2-q13.3, envolvendo quatro genes (*MTMR15*, *TRPM1*, *KLF13*, *CHRNA7*), num paciente com 14 anos de idade (Figura 20).

| RESULTS P343-B1_MLPA_probemix_lot_0109.txt |         |             |                         |                                  |                          |
|--|---------|-------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| P343-B1_MLPA_probemix_lot_0109.txt         |         |             |                         |                                  |                          |
| Gene                                       | Chr pos | Length (nt) | MV36                    | sample name<br>Recommended Order | SM367-2010_P343<br>Ratio |
| TJP1 probe 08399-L08253                    | 15q13.1 | 391         | 15-027.8 TJP1 Exon 27   | 21                               | Normal (0.93)            |
| TJP1 probe 08389-L14671                    | 15q13.1 | 300         | 15-027.8 TJP1 Exon 01   | 22                               | Normal (1.01)            |
| MTMR15 probe S0356-L13236                  | 15q13.2 | 119         | 15-029.0 MTMR15 Exon 14 | 23                               | LOH (0.60)               |
| MTMR15 probe S0357-L13235                  | 15q13.2 | 114         | 15-029.0 MTMR15 Exon 15 | 24                               | LOH (0.67)               |
| TRPM1 probe 08397-L14672                   | 15q13.2 | 374         | 15-029.1 TRPM1          | 25                               | LOH (0.52)               |
| KLF13 probe 08376-L08230                   | 15q13.3 | 166         | 15-029.4 KLF13          | 26                               | LOH (0.57)               |
| CHRNA7 probe 12956-L08237                  | 15q13.3 | 286         | 15-030.2 CHRNA7         | 27                               | LOH (0.57)               |
| SCG5 probe 12954-L14464                    | 15q13.3 | 493         | 15-030.7 SCG5 Exon 03   | 28                               | Normal (0.96)            |
| SCG5 probe 12951-L14742                    | 15q13.3 | 426         | 15-030.7 SCG5 Exon 06   | 29                               | Normal (1.12)            |

**Figura 20.** Análise dos resultados do estudo por MLPA, através do painel de sondas *P343-C1*, num paciente com uma deleção de quatro genes em 15q13.2-q13.3.

- Uma deleção *de novo* no braço curto do cromossoma 16 em 16p11.2, envolvendo sete genes (*SPN*, *MAZ*, *MVP*, *SEZ6L2*, *HIRIP3*, *DOC2A*, *MAPK3*) num paciente com 7 anos de idade (Figura 21).

| S P343-B1_MLPA_probemix_lot_0109.txt |         |             |                 |                                  |                         |
|--------------------------------------|---------|-------------|-----------------|----------------------------------|-------------------------|
| 13-B1_MLPA_probemix_lot_0109.txt     |         |             |                 |                                  |                         |
| Gene                                 | Chr pos | Length (nt) | MV36            | sample name<br>Recommended Order | M594-2010_P343<br>Ratio |
| LAT probe 11677-L12448               | 16p11.2 | 481         | 16-028.9 LAT    | 30                               | Normal (1.03)           |
| SPN probe 11672-L12443               | 16p11.2 | 364         | 16-029.6 SPN    | 31                               | LOH (0.54)              |
| MAZ probe 11669-L12440               | 16p11.2 | 238         | 16-029.7 MAZ    | 32                               | LOH (0.49)              |
| MAZ probe 11673-L12444               | 16p11.2 | 418         | 16-029.7 MAZ    | 33                               | LOH (0.44)              |
| MVP probe 00550-L00372               | 16p11.2 | 346         | 16-029.7 MVP    | 34                               | LOH (0.51)              |
| SEZ6L2 probe 11668-L12439            | 16p11.2 | 208         | 16-029.8 SEZ6L2 | 35                               | LOH (0.54)              |
| HIRIP3 probe 11674-L12445            | 16p11.2 | 454         | 16-029.9 HIRIP3 | 36                               | LOH (0.51)              |
| HIRIP3 probe 11667-L14670            | 16p11.2 | 173         | 16-029.9 HIRIP3 | 37                               | LOH (0.51)              |
| DOC2A probe 13162-L12447             | 16p11.2 | 226         | 16-029.9 DOC2A  | 38                               | LOH (0.5)               |
| MAPK3 probe 11675-L12446             | 16p11.2 | 463         | 16-030.0 MAPK3  | 39                               | LOH (0.55)              |
| CD2BP2 probe 11671-L12442            | 16p11.2 | 337         | 16-030.3 CD2BP2 | 40                               | Normal (0.99)           |

**Figura 21.** Análise dos resultados do estudo por MLPA, através do painel de sondas *P343-C1*, num paciente com uma deleção de sete genes em 16p11.2.

**Tabela 12.** Alterações cromossómicas desequilibradas detetadas pelo painel de sondas, para as regiões críticas associadas a autismo (*P343-C1*).

| Nº | Idade | Sexo | Fenótipo | Alteração | Cromossoma, Região | Origem         |
|----|-------|------|----------|-----------|--------------------|----------------|
| 1  | 14    | M    | Autismo  | Deleção   | 15q13.2-q13.3      | Paterna        |
| 2  | 7     | M    | Autismo  | Deleção   | 16p11.2            | <i>de novo</i> |

M – masculino; F – feminino.

Recorrendo a este painel de sondas (*P343-C1*) comprovaram-se os resultados alterados obtidos pela metodologia de aCGH (secção 3.2.3) em dois pacientes com duas alterações no cromossoma 16.

Nos pacientes em que foram estudadas as regiões subteloméricas (painéis de sondas *P036-E1*, *P070-B2*) detetaram-se em 14 deles resultados alterados. Nestes foi possível identificar 16 alterações submicroscópicas: oito microdeleções e oito microduplicações (Tabela 9, 10 e 13).

Dois casos apresentam duas alterações cada um (Tabela 10 e 13):

- uma microdeleção em 4qter e uma microduplicação em 16qter;
- e duas microduplicações uma em 15qter e outra em 21qter.

A idade destes indivíduos está compreendida entre os 2 e os 25 anos de idade e nove deles são do sexo masculino, sendo os restantes do sexo feminino (Tabela 13).

Nos 14 pacientes com alterações submicroscópicas nas regiões subteloméricas em três deles as alterações eram *de novo*, uma vez que o estudo citogenético dos pais foi normal. Dois possuem alterações de origem materna e três de origem paterna, semelhantes às observadas nos pais. Nos restantes casos a origem da alteração é desconhecida pois não foi possível realizar o estudo destes progenitores (Tabela 13).

Em alguns casos foram feitos estudos adicionais recorrendo à técnica de FISH para caracterizar as alterações encontradas, de modo a estabelecer a sua localização, principalmente se estas se encontram próximas de regiões críticas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação. Também se aplicou a FISH para avaliar se a alteração envolvida tem origem num rearranjo equilibrado dos progenitores, fator importante no aconselhamento genético a nível do cálculo do risco de recorrência. Esta verificação impõe-se também a nível técnico, pela existência de poucas sondas, do painel de MLPA para o estudo da região ou fraca qualidade do DNA da amostra.

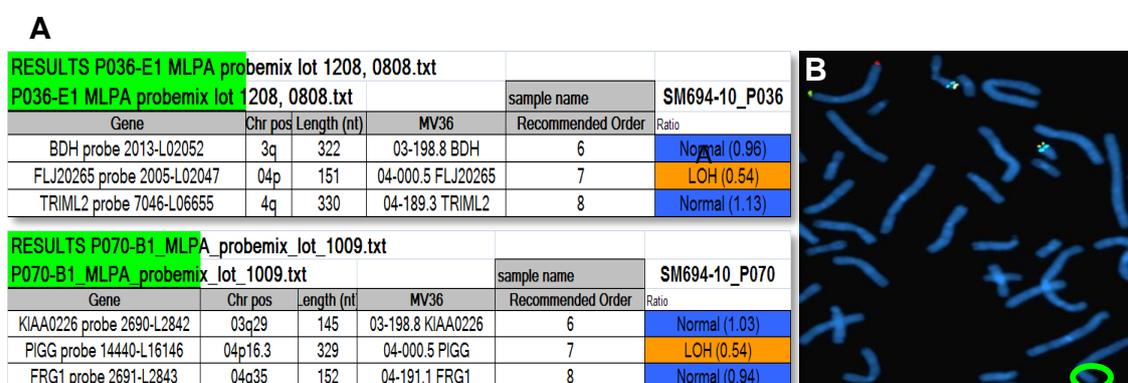
**Tabela 13.** Alterações submicroscópicas das regiões subtelo méricas detetadas pelos painéis de sondas *P036-E1*, *P070-B2* nos 416 pacientes estudados.

| Nº | Id. | S | Fenótipo        | Alt.       | Região           | Origem | Resultado MLPA                                     |
|----|-----|---|-----------------|------------|------------------|--------|--|
| 1  | 4   | M | DC              | del        | 3qter            | mat    | mlpa 3qsubtel(P036)x1mat                           |
| 2  | 7   | F | DC              | del        | 4pter            | Desc.  | mlpa 4psubtel(P036,P070)x1                         |
| 3  | 8   | M | Autismo         | dup        | 4qter            | Desc.  | mlpa 4qsubtel(P036)x3                              |
| 4  | 4   | F | DC              | del<br>dup | 4qter,<br>16qter | pat    | mlpa 4qsubtel(P036)x1,<br>16qsubtel(P070)x3pat     |
| 5  | 5   | M | DC              | dup        | 5pter            | mat    | mlpa<br>5p15.3pter(P036,P070)x3mat                 |
| 6  | 9   | F | DC+<br>dismorf. | del        | 7qter            | dn     | mlpa<br>7qsubtel(P036,P070)x1dn                    |
| 7  | 10  | M | DC+<br>Autismo  | del        | 15qter           | Desc.  | mlpa 15qsubtel(P036)x1                             |
| 8  | 6   | F | DC              | dup        | 15qter<br>21qter | Desc.  | mlpa 15q11(P036,P070)x3,<br>21qsubtel(P036,P070)x3 |
| 9  | 25  | F | DC              | dup        | 16qter           | pat    | mlpa 16qsubtel(P070)x3pat                          |
| 10 | 22  | M | DC              | del        | 22qter           | dn     | mlpa<br>22qsubtel(P036,P070)x1dn                   |
| 11 | 2   | M | DC              | dup        | X/Ypter          | Desc.  | mlpa X/Ypter(P036,P070)x3                          |
| 12 | 5   | M | DC+<br>dismorf. | del        | Yqter            | pat    | mlpa<br>Yqsubtel(P036,P070)x1pat                   |
| 13 | 13  | M | DC              | dup        | X/Ypter          | Desc.  | mlpa X/Ypter(P036,P070)x3                          |
| 14 | 14  | M | DC              | dup        | Yqter            | dn     | mlpa<br>Yqsubtel(P036,P070)x3dn                    |

M – masculino; F – feminino; Id. – idade em anos; S – sexo; DC – défice cognitivo; dis morf. – dis morfismos; Alt. – Alteração; dn – *de novo*; pat – de origem paterna; mat – de origem materna; Desc. – desconhecida; del – deleção; dup – duplicação.

A técnica de MLPA (painéis de sondas *P036-E1* e *P070-B2*) identificou no caso 2 (Tabela 13) uma deleção na região sub-telomérica no braço curto do cromossoma 4 em 4p16.3 (Figura 22-A), envolvendo 2 genes (*FLJ20265* e *PIGG*), numa paciente do sexo feminino, com 7 anos de idade, com o quadro clínico de DC.

A hibridização com a sonda subtelomérica de FISH para esta região confirmou a deleção (*D4S3359-*) (Figura 22-B). Como este rearranjo está localizado na região crítica associada à síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHRC), foram utilizadas sondas de FISH específicas para averiguar o seu envolvimento. Estas sondas comprovaram que esta região crítica não estava envolvida, uma vez que se observaram sinais de hibridização normais (*WHSC1+*).



**Figura 22. (A)** Análise dos resultados do estudo de MLPA (painéis de sondas *P036-E1*, *P070-B2*) numa paciente com uma deleção na região subtelomérica no braço curto do cromossoma 4, envolvendo 2 genes; **(B)** Confirmação da deleção da região subtelomérica do cromossoma 4 recorrendo à técnica de FISH (imagem cedida pelo LCG – FMUC).

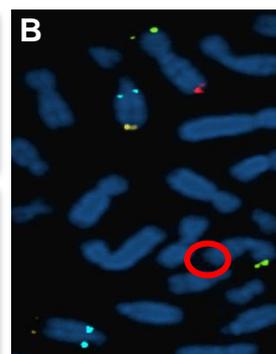
O estudo do caso 6 (Tabela 13) pela MLPA (painéis de sondas *P036-E1*, *P070-B2*) revelou uma deleção *de novo* na região sub-telomérica no braço longo do cromossoma 7 em 7q36.3, envolvendo um gene (*VIPR2*) (Figura 23-A), numa paciente do sexo feminino, com 9 anos de idade, com o quadro clínico de DC e dismorfismos. Esta alteração foi confirmada pela técnica de FISH, pela aplicação de sondas subteloméricas, em que se detetou a ausência da região terminal do braço longo do cromossoma 7 (*STS2000H-*) (Figura 23-B).

A

| RESULTS P036-E1 MLPA probemix lot 1208, 0808.txt |         |             |                 |                   |               |              |
|--|---------|-------------|-----------------|-------------------|---------------|--------------|
| P036-E1 MLPA probemix lot 1208, 0808.txt         |         |             |                 |                   | sample name   | M660-10_P036 |
| Gene   | Chr pos | length (nt) | MV36            | Recommended Order | Ratio         |              |
| CENTA1 probe 2275-L02049                         | 07p     | 172         | 07-000.7 CENTA1 | 13                | Normal (1.01) |              |
| VIPR2 probe 1747-L01303                          | 07q     | 354         | 07-158.4 VIPR2  | 14                | LOH (0.55)    |              |
| FBXO25 probe 2397-L01845                         | 08p     | 179         | 08-000.4 FBXO25 | 15                | Normal (1.02) |              |

| RESULTS P070-B1 MLPA probemix lot 1009.txt |         |             |                 |                   |               |              |
|--|---------|-------------|-----------------|-------------------|---------------|--------------|
| P070-B1 MLPA probemix lot 1009.txt         |         |             |                 |                   | sample name   | M660-10_P070 |
| Gene                                       | Chr pos | length (nt) | MV36            | Recommended Order | Ratio         |              |
| UNC84A probe 2780-L2857                    | 07p22.3 | 355         | 07-000.9 UNC84A | 13                | Normal (0.97) |              |
| VIPR2 probe 2793-L3167                     | 07q36.3 | 172         | 07-158.6 VIPR2  | 14                | LOH (0.56)    |              |
| FBXO25 probe 2715-L0973                    | 08p23.3 | 362         | 08-000.4 FBXO25 | 15                | Normal (1.02) |              |



**Figura 23. (A)** Análise dos resultados do estudo de MLPA (painéis de sondas *P036-E1*, *P070-B2*) numa paciente com uma deleção na região sub-telomérica no braço longo do cromossoma 7, envolvendo 1 gene; **(B)** Confirmação do resultado recorrendo à FISH, verificando a ausência de sinal de hibridização na região subteloamérica (imagem cedida pelo LCG – FMUC).

Pela técnica de MLPA no caso 10 (Tabela 13) (painéis de sondas *P036-E1*, *P070-B2*) observou-se uma deleção *de novo* na região sub-telomérica no braço longo do cromossoma 22 em 22q13.3 num paciente do sexo masculino, com 22 anos de idade, com o quadro clínico de DC. Uma vez que esta alteração se encontra na região crítica 22q13.3 confirmou-se pela técnica de FISH, pela aplicação de sondas subteloamérica a ausência da região terminal do braço longo do cromossoma 22 (*N85A3*-).

O estudo efetuado pelo MLPA no caso 14 (Tabela 13) revelou uma duplicação *de novo* na região sub-telomérica no braço longo do cromossoma Y, envolvendo um gene (*SYBL1*), num paciente com 14 anos de idade, com o quadro clínico de DC. Este rearranjo foi confirmado pela FISH observando-se o ganho de sinal nos telómeros da região terminal do braço curto do cromossoma Y. Esta alteração envolve a região pseudoautosómica PAR2 comum às regiões terminais dos cromossomas X e Y.

Nos 665 pacientes em que o resultado de MLPA foi normal em 64 realizou-se o estudo pela metodologia de aCGH, a qual permitiu a deteção de 15 casos com alterações. Estas não poderiam ser detetadas pelos painéis de sondas de MLPA utilizados pois não se encontram localizadas nas regiões estudadas pelos mesmos.

### 3.2.3. Genómica – Cariótipo Molecular

O estudo do cariótipo molecular nos 340 pacientes identificou 13 com alterações de classe I (localizadas em regiões associadas a síndrome de microdeleção ou microduplicação) e 86 casos com alterações classe II (alterações que não estão descritas na DGV e envolvem genes codificantes conhecidos).

Os 86 pacientes que possuem rearranjos desequilibrados (classe II), apesar de não se encontrarem em regiões descritas como associadas a uma síndrome específica, compreendem alterações que envolvem os genes descritos no *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)* e no *OMIM Morbid Map*, podendo ser consideradas como alterações causais.

Em 80 verificaram-se alterações classes III e IV (Classe IIIA - Deleções ou duplicações que, até à presente data, estão reportadas em baixa frequência na DGV ou não são totalmente sobreponíveis com as descritas na DGV; Classe IIIB - Deleções ou duplicações que, até à presente data, estão reportadas em baixa frequência na DGV ou não são totalmente sobreponíveis com as descritas na DGV, não envolvendo genes codificantes conhecidos; Classe IV - Deleções ou duplicações reportadas em indivíduos normais na DGV).

Apesar de estas alterações (classes III e IV) serem normalmente consideradas sem implicações fenotípicas a sua avaliação deve incluir a análise de todos os genes envolvidos e se estes estão sujeitos a fatores epigenéticos ou de dosagem génica.

Os restantes 160 pacientes apresentaram um resultado normal.

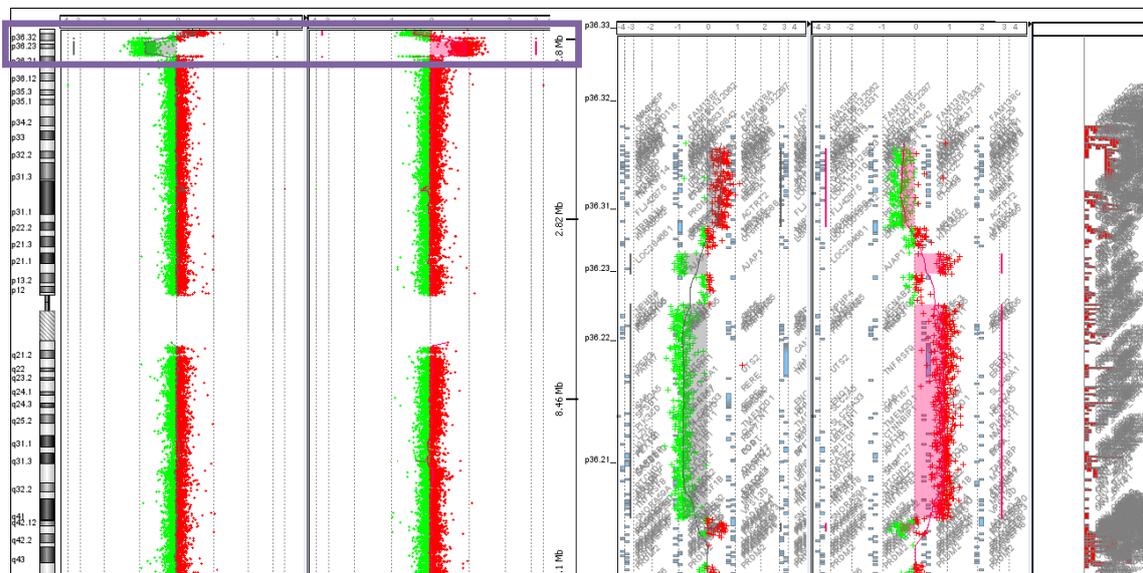
Uma vez que só as alterações classificadas como classes I e II têm efeito causal, foram estas as selecionadas para uma análise mais detalhada. Foram identificados 99 pacientes, que possuem entre os cinco meses e os 40 anos de idade, 56 são do sexo masculino e 43 do sexo feminino.

O quadro clínico de DC foi comum a todos, 52 também apresentam dismorfismos, em sete o fenótipo manifestado era de autismo e noutros sete de epilepsia.

Na análise dos 99 casos observaram-se 128 alterações cromossómicas desequilibradas, 63 deleções e 65 duplicações (Tabela 14).

Em cada paciente que apresentou um ou mais rearranjos desequilibrados foi necessário averiguar pela análise dos genes envolvidos e pela presença de CNV's a causalidade da alteração encontrada de acordo com o fenótipo apresentado.

Por exemplo a análise do cromossoma 1 de um determinado paciente revelou quatro alterações *de novo*, uma duplicação de 2,4 Mb (entre as posições nucleotídicas 746,608-3,218,025), uma deleção de 623 Kb (entre as posições nucleotídicas 4,049,301-4,673,191), uma deleção de 6,7 Mb (entre as posições nucleotídicas 5,631,361-12,339,715) e uma duplicação com 277 Kb (entre as posições nucleotídicas 12,476,648-12,754,273), que pela sua localização é tamanho, e pelos genes que envolvem são consideradas causais (Figura 24).



**Figura 24.** Análise do cromossoma 1 envolvendo quatro alterações *de novo*, uma duplicação de 2,4 Mb, uma deleção de 623 Kb, uma deleção de 6,7 Mb e uma duplicação com 277 Kb, pela metodologia de aCGH (imagem cedida pelo LCG – FMUC).

O estudo da origem destas alterações revelou que 29 eram *de novo* (23%) e 69 são de origem familiar (54%). Em 30 os resultados eram de origem desconhecida, estes devem-se à ausência de estudo nos pais, quer pela falta de comparência à consulta dos dois progenitores ou pela análise de um deles o qual não possui alteração idêntica à do probando (Tabela 14).

**Tabela 14.** Distribuição das 128 alterações de acordo com a sua origem, encontradas pela metodologia de aCGH.

| <b>Origem</b>       | <b>Deleções</b> | <b>Duplicações</b> | <b>Total</b> |
|---------------------|-----------------|--------------------|--------------|
| <b>de novo</b>      | 15              | 14                 | 29           |
| <b>Materna</b>      | 13              | 24                 | 37           |
| <b>Paterna</b>      | 16              | 16                 | 32           |
| <b>Desconhecida</b> | 19              | 11                 | 30           |
| <b>Total</b>        | 63              | 65                 | 128          |

Dos 99 pacientes, em 74 observou-se uma única alteração (75%), uma deleção em 42 e uma duplicação em 32. Os restantes 25 pacientes possuem mais do que um rearranjo: 22 apresentam duas alterações, dois apresentam três alterações e um apresenta quatro alterações (Tabela 15).

**Tabela 15.** Distribuição das alterações apresentadas pelos 99 pacientes estudados pela metodologia de aCGH.

| <b>Nº deleções</b> | <b>Nº duplicações</b> | <b>Nº casos</b> |
|--------------------|-----------------------|-----------------|
| 1                  |                       | 42              |
|                    | 1                     | 32              |
| 2                  |                       | 3               |
|                    | 2                     | 9               |
| 1                  | 1                     | 10              |
| 2                  | 1                     | 1               |
| 1                  | 2                     | 1               |
| 2                  | 2                     | 1               |
|                    |                       | 99              |

A metodologia de aCGH para além de identificar alterações cromossómicas desequilibradas permite também caracterizá-las pelo seu tamanho. Verificaram-se 87 (68%) alterações com um tamanho inferior a 1 Mb e as restantes 41 com um tamanho acima (Tabela 16). Nos rearranjos de menor tamanho (87) identificam-se 40 deleções e 47 duplicações e nos restantes (41) 23 deleções e 18 duplicações (Tabela 16).

A distribuição por tipo (deleção ou duplicação) é análoga independentemente do tamanho dos rearranjos, observando-se no primeiro grupo um ligeiro acréscimo do número de duplicações e no segundo de deleções.

**Tabela 16.** Distribuição das 128 alterações pelo seu tamanho, caracterizadas pela metodologia de aCGH.

| Tamanho      | Deleções | Duplicações | Total |
|--------------|----------|-------------|-------|
| < 100 Kb     | 17       | 7           | 24    |
| 100 – 300 Kb | 14       | 18          | 32    |
| 300 – 500 Kb | 5        | 13          | 18    |
| 500 – 1 Mb   | 4        | 9           | 13    |
| 1 – 2 Mb     | 8        | 7           | 15    |
| 2 – 3 Mb     | 5        | 4           | 9     |
| 3 – 4 Mb     | 3        | 4           | 7     |
| 4 – 5 Mb     | 4        | 2           | 6     |
| 6 – 7 Mb     | 2        | 0           | 2     |
| > 10 Mb      | 1        | 1           | 2     |
| <b>Total</b> | 63       | 65          | 128   |

Nas 87 alterações submicroscópicas desequilibradas (<1 Mb) identificam-se 12 alterações *de novo*, 56 de origem familiar e 19 sem informação quanto à sua origem. Nos 41 rearranjos maiores (> 1 Mb) observaram-se 17 alterações *de novo*, 13 de origem familiar e 11 de origem desconhecida (Tabela 17).

Verificou-se que a maioria (64,4%) das alterações cromossômicas desequilibradas submicroscópicas (<1 Mb) tem origem familiar, e as *de novo* são as menos frequentes (13,8%) (Tabela 17).

Na análise das alterações cromossômicas desequilibradas, com um tamanho acima de 1 Mb, a maior parte (41,5%) é *de novo*, uma vez que o resultado do estudo dos progenitores foi normal (Tabela 17).

Enquanto, que em termos percentuais, as alterações de menor tamanho são herdadas dos progenitores, a maioria das alterações *de novo* tem um tamanho superior a 1 Mb (Tabela 17).

**Tabela 17.** Distribuição das 128 alterações de acordo o tamanho e a origem.

| <b>Tamanho</b>      | <b><i>de novo</i></b> | <b>Materna</b> | <b>Paterna</b> | <b>Desconhecida</b> | <b>Total</b> |
|---------------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|
| <b>&lt; 100 Kb</b>  | 1                     | 10             | 7              | 6                   | 24           |
| <b>100 – 300 Kb</b> | 3                     | 12             | 14             | 3                   | 32           |
| <b>300 – 500 Kb</b> | 4                     | 7              | 2              | 5                   | 18           |
| <b>500 – 1 Mb</b>   | 4                     | 1              | 3              | 5                   | 13           |
| <b>1 – 2 Mb</b>     | 7                     | 4              | 2              | 2                   | 15           |
| <b>2 – 3 Mb</b>     | 3                     | 2              | 1              | 3                   | 9            |
| <b>3 – 4 Mb</b>     | 2                     | 0              | 2              | 3                   | 7            |
| <b>4 – 5 Mb</b>     | 3                     | 0              | 0              | 3                   | 6            |
| <b>6 – 7 Mb</b>     | 1                     | 0              | 1              | 0                   | 2            |
| <b>&gt; 10 Mb</b>   | 1                     | 1              | 0              | 0                   | 2            |
| <b>Total</b>        | 29                    | 37             | 31             | 31                  | 128          |

As alterações cromossômicas desequilibradas encontradas em 13 dos 99 pacientes em que se obteve resultados alterados, estão localizadas em regiões críticas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação relacionadas com o

fenótipo de DC e de distúrbios do comportamento (Tabelas 18 e 19). Destas sete são deleções e seis duplicações.

Os sete pacientes com deleções têm idades compreendidas entre 1 e 19 anos, quatro são do sexo masculino e três do sexo feminino, apresentam um quadro clínico de DC, que em três está associado a dismorfismos (Tabela 18).

Das sete deleções uma é de origem paterna, três alterações são *de novo*, em que o estudo dos pais foi normal e nas restantes não foi possível o estudo dos progenitores (Tabela 18).

Foi detetada por aCGH uma deleção *de novo* com 1,7 Mb no caso 1 (Tabela 18) no braço curto do cromossoma 4 em 4p16.3, região crítica associada à síndrome de Wolf-Hirschhorn. A alteração foi confirmada pela técnica de MLPA através do painel de sondas para as regiões críticas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação (*P245-A2*).

O caso 2 (Tabela 18), analisado por aCGH, possui uma deleção de 184 Kb no braço longo do cromossoma 8 em 8q22.2, que abrange a porção intragénica do gene *COH1*. Por MLPA foi possível delimitar a deleção entre os exões 7 e 18 deste gene. Estas alterações estão descritas e associadas à síndrome de Cohen.

A análise de aCGH no caso 3 (Tabela 18) identificou uma deleção de 578 Kb no braço longo do cromossoma 9 em 9q34.3, envolvendo o gene *EHMT1* associado à síndrome de Kleefstra. Esta alteração foi comprovada pela técnica de MLPA através da aplicação dos painéis de sondas para as regiões subteloméricas (*P036-E1* e *P070-B2*).

O estudo, por aCGH revelou no caso 4 (Tabela 18), uma deleção de origem paterna com 1,5 Mb na região crítica 15q13.3. e no caso 5 (Tabela 18) uma deleção de 544 Kb no braço curto do cromossoma 16, na região crítica 16p11.2. As alterações dos casos 4 e 5 (Tabela 18) foram confirmadas pela utilização do painel de sondas de MLPA que analisa as regiões críticas associadas a autismo (*P343-C1*).

Observaram-se duas deleções *de novo* com 1,4 Mb e outra com 2,1 Mb (caso 6 e 7 – Tabela 18) pelo aCGH, na região crítica 22q11.2, que foram confirmadas por MLPA (*P250-B1*).

**Tabela 18.** Deleções localizadas em regiões críticas, associadas a síndromes de microdeleção.

| <b>Nº</b> | <b>Id.</b> | <b>S</b> | <b>Fenótipo</b>  | <b>Região<br/>(posições<br/>nucleotídicas)</b>  | <b>Tamanho</b> | <b>Origem</b> | <b>Síndrome<br/>Associada</b> |
|-----------|------------|----------|------------------|---|----------------|---------------|-------------------------------|
| 1         | 1          | M        | DC+<br>dismorfi. | 4p16.3<br><br>(737,721-<br>2,416,211)           | 1,7 Mb         | <i>dn</i>     | Wolf-<br>Hirschhorn           |
| 2         | 6          | M        | DC               | 8q22.2<br><br>(100,127,962-<br>100,312,706)     | 184 Kb         | Desc.         | Cohen                         |
| 3         | 2          | F        | DC               | 9q34.3<br><br>(140,407,572-<br>140,986,221)     | 578 Kb         | Desc.         | Kleefstra                     |
| 4         | 19         | M        | DC+<br>dismorf.  | 15q13.2q13.3<br><br>(30,943,903-<br>32,510,863) | 1,5 Mb         | pat           | Microdeleção<br>15q13.3       |
| 5         | 7          | F        | DC               | 16p11.2<br><br>(29,652,999-<br>30,197,341)      | 544 Kb         | Desc.         | Microdeleção<br>16p11.2       |
| 6         | 17         | F        | DC+<br>dismorf.  | 22q11.21<br><br>(18,894,835-<br>20,311,763)     | 1,4 Mb         | <i>dn</i>     | Microdeleção<br>22q11.2       |
| 7         | 4          | M        | DC               | 22q11.21<br><br>(18,894,835-<br>21,032,298)     | 2,1 Mb         | <i>dn</i>     | Microdeleção<br>22q11.2       |

M – masculino; F – feminino; Id. – idade em anos; S – sexo; DC – déficit cognitivo; dismorf. – dismorfismos; *dn* – *de novo*; pat – de origem paterna; mat – de origem materna; Desc. – desconhecida.

Os seis pacientes com duplicação têm entre 2 e 22 anos de idade, quatro são do sexo masculino e dois do sexo feminino (Tabela 19). Quatro apresentam o quadro clínico de DC e dismorfismos, um DC com déficit na linguagem e outro DC com epilepsia (Tabela 19).

Das seis duplicações quatro possuem uma alteração *de novo*, em que o estudo dos pais foi normal, uma é de origem paterna e noutra não foi possível o estudo dos progenitores.

A tecnologia de aCGH permitiu a identificação de duas duplicações (casos 8 e 9 – Tabela 19) de 1,4 Mb no braço longo do cromossoma 7 em 7q11.23, em que o caso 8 (Tabela 19) possui uma alteração *de novo*. Estas alterações foram confirmadas pela técnica de MLPA recorrendo ao painel de sondas para as regiões críticas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação (P245-A2).

O estudo de aCGH revelou uma duplicação *de novo* com 545 Kb no braço curto do cromossoma 16 (caso 10 – Tabela 19). Para corroborar esta alteração utilizou-se a técnica de MLPA pela aplicação do painel de sondas que analisa as regiões críticas associadas a autismo (P343-C1).

Pela metodologia de FISH aplicando as sondas *SMCR* e *MDS/ILS*, de sequência única que hibridizam na região 17p11.2 foram confirmadas duas duplicações *de novo* com 3,4 e 4,9 Mb no braço curto do cromossoma 17 na região crítica 17p11.2 em dois casos estudados (casos 11 e 12 – Tabela 19).

Na análise por aCGH observou-se uma duplicação de origem paterna com 2,6 Mb no braço longo do cromossoma 22 (caso 13 – Tabela 19). Aplicou-se o painel de sondas que estuda a região crítica 22q11.2 (P250-B1), no pai e no probando revelando duas duplicações idênticas.

A aplicação das técnicas de FISH e MLPA é importante para a confirmação e caracterização das alterações submicroscópicas detetadas pelo aCGH, localizadas em regiões associadas às síndromes de microdeleção/microduplicação.

**Tabela 19.** Duplicações localizadas em regiões críticas, associadas a síndromes de microduplicação.

| <b>Nº</b> | <b>Id.</b> | <b>S</b> | <b>Fenótipo</b>          | <b>Região<br/>(posições<br/>nucleotídicas)</b> | <b>Tamanho</b> | <b>Origem</b> | <b>Síndrome<br/>Associada</b> |
|-----------|------------|----------|--------------------------|--|----------------|---------------|-------------------------------|
| <b>8</b>  | 8          | M        | DC+<br>dismorfismos      | 7q11.23<br><br>(72,726,568-<br>74,139,390)     | 1,4 Mb         | <i>dn</i>     | Microduplicação<br>7q11.23    |
| <b>9</b>  | 22         | M        | DC+<br>epilepsia         | 7q11.23<br><br>(72,726,578-<br>74,139,390)     | 1,4 Mb         | Desc.         | Microduplicação<br>7q11.23    |
| <b>10</b> | 6          | M        | DC+<br>dismorfismos      | 16p11.2<br><br>(29,652,999-<br>30,198,600)     | 545 Kb         | <i>dn</i>     | Microduplicação<br>16p11.2    |
| <b>11</b> | 3          | M        | DC+<br>dismorfismos      | 17p11.2<br><br>(16,170,236-<br>21,070,382)     | 4,9 Mb         | <i>dn</i>     | Potocki-Lupski                |
| <b>12</b> | 2          | F        | DC+ déficit<br>linguagem | 17p11.2<br><br>(16,782,546-<br>20,219,464)     | 3,4 Mb         | <i>dn</i>     | Potocki-Lupski                |
| <b>13</b> | 12         | F        | DC+<br>dismorfismos      | 22q11.2<br><br>(18,894,835-<br>21,464,119)     | 2,6 Mb         | pat           | Microduplicação<br>22q11.2    |

M – masculino; F – feminino; Id. – idade em anos; S – sexo; DC – déficit cognitivo; dismorf. – dismorfismos; *dn* – *de novo*; pat – de origem paterna; mat – de origem materna; desc. – desconhecida.

Das 13 alterações cromossómicas desequilibradas, detetadas pela técnica de aCGH, localizadas em regiões críticas normalmente associadas a uma síndrome, não poderia ter sido detetada uma deleção (caso 2 – Tabela 18) pela análise de MLPA. Nem pela aplicação dos painéis de sondas normalmente utilizados no estudo de DC e autismo (*P245-A2* e *P343-C1*), nem pelo estudo das regiões subteloméricas (*P036-E1* e *P070-B2*).

Pela aplicação do painel de sondas que inclui sondas específicas para síndromes de microdeleção associadas ao DC e autismo (*P245-A2*), seria possível detetar: a deleção de 1,7 Mb localizada na região crítica 4p16.3 (caso 1 – Tabela 18) e as duas deleções de 1,4 e 2,1 Mb (casos 6 e 7 – Tabela 18) localizadas na região crítica 22q11.2.

Poderiam ter sido detetadas cinco duplicações, que pelo seu tamanho seriam passíveis de ser identificadas nas regiões críticas 7q11.23 (casos 8 e 9 – Tabela 19), 17p11.2 (casos 11 e 12 – Tabela 19) e 22q11.2 (caso 13 – Tabela 19).

Através do painel de sondas que contém sondas específicas para regiões associadas a autismo (*P343-C1*), seriam detetadas: a deleção de 1,5 Mb (caso 4 – Tabela 18) localizada no cromossoma 15 na região crítica 15q13.3; a deleção de 544 Kb (caso 5 – Tabela 18) e a duplicação de 545 Kb (caso 10 – Tabela 19) localizadas na região crítica 16p11.2.

Dos 160 casos com um resultado normal no estudo de aCGH um deles apresentou posteriormente uma mutação completa na análise de fragmentos do gene *FMR1*.

Em três dos pacientes com resultado alterado no cariótipo (citogenética convencional) foi realizada a análise pela metodologia de aCGH. Foram estudados dois rearranjos cromossómicos equilibrados para averiguar a existência de alguma alteração desequilibrada, estes revelaram um resultado normal, verificando-se duas translocações equilibradas. No outro paciente identificou-se que a origem do material adicional observado no cromossoma 21 pertencia ao braço longo do cromossoma 4 (secção 3.2.1).

Pelo estudo do cariótipo e pela aplicação dos painéis de sondas de MLPA para as regiões subteloméricas (*P036-E1* e *P070-B2*), foi confirmado o resultado de uma

duplicação de origem paterna de 6,9 Mb, identificada por aCGH, envolvendo o braço curto do cromossoma 18 em 18p11.32-p11.31.

Em conclusão: neste estudo a citogenética convencional permitiu a deteção de 10 (1,8%) dos casos alterados, com a aplicação da técnica de MLPA foi possível encontrar 19 alterações submicroscópicas desequilibradas correspondendo a um aumento de deteção de 2,8%. A combinação das técnicas de citogenética convencional e MLPA permitiriam uma taxa de deteção de 4,6%. Com a utilização da metodologia de aCGH foi possível aumentar significativamente a identificação de rearranjos cromossómicos desequilibrados em todo o genoma, deste modo, verificou-se uma taxa de deteção de 29,2% por esta tecnologia.

### 3.2.4. Análise de Fragmentos no estudo do gene *FMR1*

A análise de fragmentos no estudo das formas alélicas do gene *FMR1* identificou a mutação completa em 5 dos 416 pacientes estudados, com um número de repetições do trinucleótido CGG superior a 200 (Tabela 20).

A idade destes indivíduos está compreendida entre os 2 e os 12 anos de idade, em que dois são do sexo masculino e três do sexo feminino (Tabela 20).

Todos os pacientes em que se encontrou a mutação completa do gene *FMR1* apresentam o quadro clínico de DC, dois deles com dismorfismos, um com autismo e outro com distúrbios do comportamento (Tabela 20).

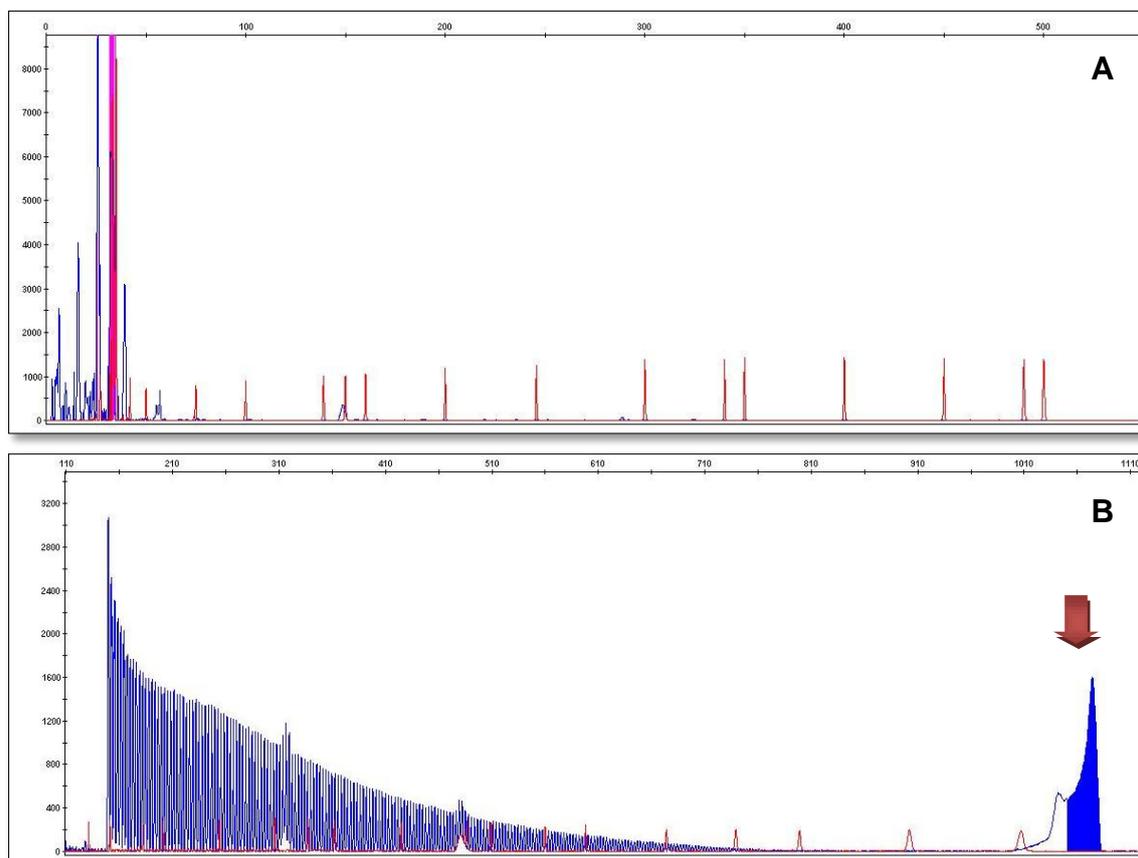
**Tabela 20.** Alterações encontradas pela análise de fragmentos no estudo do gene *FMR1* nos 416 pacientes analisados.

|   | Idade | Sexo | Fenótipo                         | Mutação $\geq 200$ CGG |
|---|-------|------|----------------------------------|------------------------|
| 1 | 5     | F    | DC                               | ✓                      |
| 2 | 2     | M    | DC + dismorfismos                | ✓                      |
| 3 | 9     | M    | DC + dismorfismos                | ✓                      |
| 4 | 7     | F    | DC + autismo                     | ✓                      |
| 5 | 12    | F    | DC + distúrbios do comportamento | ✓                      |

M – masculino; F – feminino; DC – Défice Cognitivo

Sempre que foi necessário clarificar os resultados da análise de fragmentos da PCR no estudo do gene *FMR1* utilizou-se a técnica de *Triplet Repeat Primed PCR Amplidex*. Esta foi aplicada quando não se verificou amplificação nas amostras do sexo masculino ou quando se obteve apenas um fragmento em amostras do sexo feminino. Com o objetivo de discriminar entre mulheres homocigóticas normais e mulheres com mutação completa. Esta abordagem foi utilizada em todos os casos que apresentaram alterações, descrevendo-se os casos 2 e 5 (Tabela 20) de modo a exemplificar o observado no estudo do gene *FMR1*, tanto em pacientes do sexo masculino, como do sexo feminino.

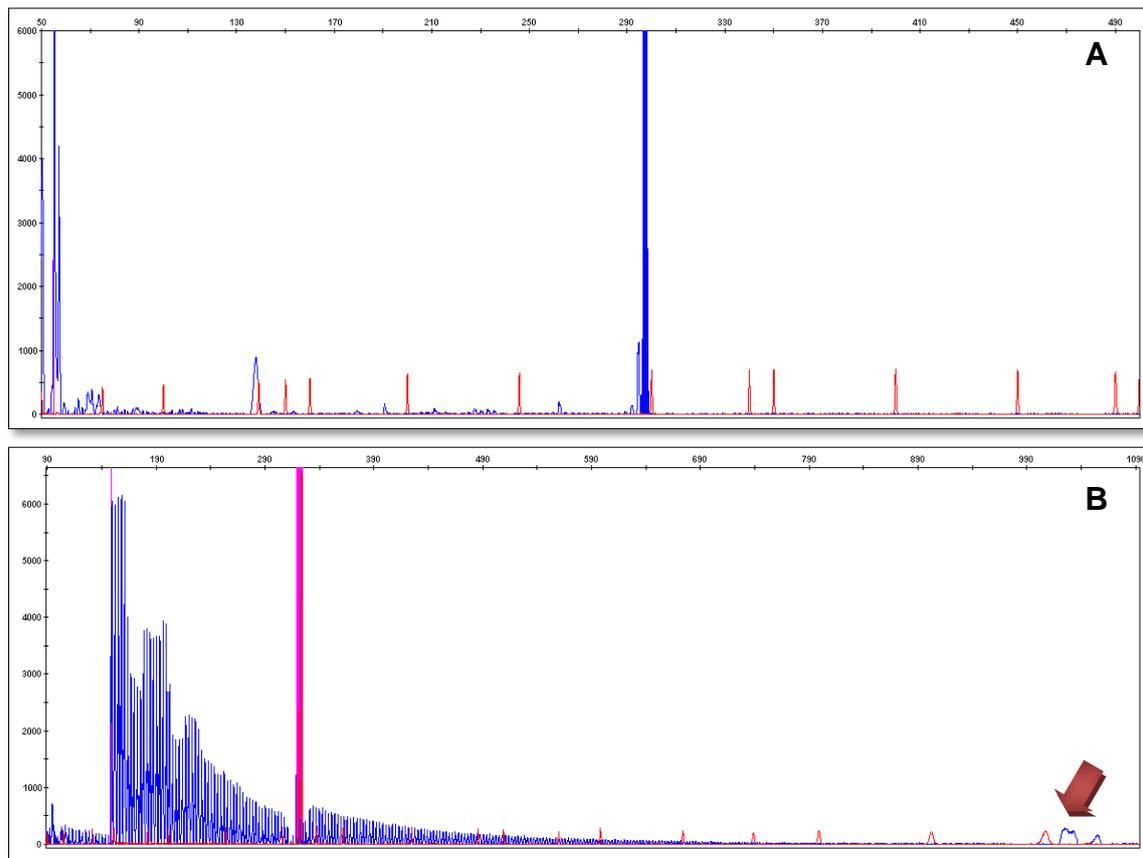
No caso 2 (Tabela 20) não se verificou amplificação do número de repetições do trinucleótido CGG do gene *FMR1* pela análise de fragmentos da PCR (Figura 25-A), tendo sido necessário realizar-se a análise pela técnica de *Triplet Repeat Primed PCR Amplidex* que revelou a mutação completa (Figura 25-B).



**Figura 25. (A)** Análise de fragmentos no estudo do gene *FMR1* pela PCR, sem amplificação devido ao elevado número de repetições CGG; **(B)** Análise pela técnica de *Triplet Repeat Primed PCR Amplidex*, revelando mutação completa num indivíduo do sexo masculino.

Neste último (caso 5 – Tabela 20) a dúvida era se o resultado poderia corresponder a uma mulher homozigótica normal ou a uma mulher com mutação completa pois observou-se apenas um fragmento pela análise de fragmentos da PCR (Figura 26-A).

A análise por *Triplet Repeat Primed PCR Amplidex* confirmou a mutação completa (Figura 26-B).



**Figura 26. (A)** Análise de fragmentos no estudo das formas alélicas do gene *FMR1* pela técnica de PCR, revelando apenas um fragmento, que poderá corresponder quer a uma mulher homozigótica normal quer a uma mulher com mutação completa; **(B)** Análise pela técnica de *Triplet Repeat Primed PCR Amplidex* revelando mutação completa num indivíduo do sexo feminino.

### **3.2.5. Citogenética Molecular**

A técnica de FISH foi aplicada para a caracterização de três casos alterados detetados pela citogenética convencional descritos no capítulo 3.2.1.

Também foi utilizada para a confirmação dos resultados patológicos obtidos pelas metodologias de MLPA e aCGH.

Os resultados referentes ao MLPA são quatro casos de confirmação de alterações submicroscópicas nas regiões subteloméricas descritos no capítulo 3.2.2.

A descrição dos resultados relativos à verificação das alterações cromossômicas desequilibradas detetadas pelo aCGH encontra-se no capítulo 3.2.3.

## **4. DISCUSSÃO**

O défice cognitivo (DC) e os distúrbios do comportamento são patologias que para além de prevalentes na população, têm uma percentagem elevada de casos de etiologia idiopática. Com a finalidade de avaliar esta população foram incluídos no presente trabalho 850 pacientes com este quadro clínico e causa desconhecida, estudados no Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC durante os anos 2010 e 2011

O progresso da citogenética e da genómica possibilitou que o estudo destes pacientes pudesse ser feito recorrendo a diferentes tecnologias. Estas permitem uma abordagem mais alargada e aprofundada de forma a encontrar a causalidade genética destes fenótipos. Deste modo, recorrendo a diferentes métodos identificaram-se 133 casos com alterações cromossómicas/genómicas.

A citogenética convencional, permite a deteção de alterações cromossómicas numéricas (aneuploidias) e rearranjos estruturais, que podem ser equilibrados e desequilibrados, desde que envolvam segmentos de DNA iguais ou superiores a 3Mb. Dos 572 pacientes estudados por esta tecnologia foram encontradas 10 alterações, obtendo-se uma taxa de deteção de 1,8%, inferior à referida na literatura (3 a 15%) (Hochstenbach et al., 2009; Rauch et al., 2006).

Esta disparidade pode ser justificada por várias razões: os pacientes incluídos na amostra (850) são selecionados pela clínica, excluindo-se outros doentes com fenótipos associados a alterações sindrómicas específicas, em que se realiza um estudo direcionado; este trabalho incide num curto período de tempo (2 anos), em que no segundo ano foi implementado o cariótipo molecular, no estudo de pacientes com este quadro clínico, em substituição do cariótipo convencional.

O estudo do cariótipo identificou alterações numéricas nos cromossomas sexuais em três pacientes. Dois casos estão associados à síndrome de Klinefelter e uma situação de mosaico associado à síndrome de Turner. A incidência destas cromossomopatias na população é elevada e estão descritas como associadas ao fenótipo de DC, verificando-se concordância entre os resultados obtidos e o referido na literatura (Hall, 2006; Teixeira & Carreira, 2005; Wikström & Dunkel, 2011).

A análise citogenética permitiu também a deteção de 4 translocações recíprocas aparentemente equilibradas, em que uma era *de novo*, duas de origem familiar e noutra não foi possível determinar a sua origem uma vez que não foi feito o estudo dos progenitores. As translocações são os rearranjos cromossómicos

estruturais mais comuns (Teixeira & Carreira, 2005), em que o DC está associado às translocações *de novo* em 6 a 10% dos casos (Gardner & Sutherland, 2003). Para averiguar se existiam microdeleções ou microduplicações nos seus pontos de quebra, ou em outras regiões do genoma, duas das translocações foram ainda caracterizadas por aCGH, revelando-se um resultado normal. Nestes casos, apesar de não haver desequilíbrio, ganho ou perda de material, os pontos de quebra podem interferir com genes, disrompendo-os ou causar o efeito de posição e conseqüentemente ter impacto no fenótipo.

A importância da detecção destes rearranjos cromossômicos estruturais equilibrados reside não só para estabelecer a relação genótipo/fenótipo, mas também para avaliar o impacto familiar. Os portadores de uma alteração equilibrada devem ser orientados para consultas de genética, onde lhes devem ser explicadas as implicações destes resultados. A detecção e caracterização destes rearranjos atribuem um papel fundamental ao estudo realizado pelas técnicas de citogenética convencional e molecular.

No presente estudo, pela análise cromossômica, ainda se detetaram três alterações desequilibradas: um cromossoma 21 em anel, uma trissomia parcial no braço longo do cromossoma 9 e uma trissomia parcial no braço longo do cromossoma 4.

Os cromossomas em anel são referidos como alterações raras que geralmente estão associadas a DC e que normalmente se encontram em mosaico devido à sua instabilidade mitótica (Gardner & Sutherland, 2003). Foi identificado um cromossoma 21 em anel e posteriormente caracterizado pela FISH, revelando uma deleção na sua região terminal e, pelo estudo dos progenitores, verificou-se que se tratava de uma alteração *de novo*. Uma vez que este paciente possui uma deleção *de novo* na região subtelomérica do cromossoma 21 podemos atribuir a causalidade genética do DC.

O estudo do cariótipo, num paciente com o quadro clínico de autismo, identificou uma duplicação, de origem paterna, em 9q13q21. A análise do tamanho e da localização desta alteração revela que esta envolve regiões codificantes, contendo vários genes, deste modo pode atribuir-se a sua causalidade no fenótipo apresentado, apesar de ser de origem familiar (Goumy et al., 2005).

As inserções são rearranjos equilibrados, em que um segmento de um cromossoma é inserido num cromossoma diferente. A identificação dos portadores de

alterações estruturais equilibradas é geralmente feita através da descendência, que herda a aneuploidia parcial (Teixeira & Carreira, 2005). Neste estudo, através da análise cromossômica de um paciente com DC, foi detetado um derivativo do cromossoma 21 com material extra no braço longo do cromossoma 21 (21q21). Através da sua caracterização por aCGH verificou-se uma duplicação no braço longo do cromossoma 4 (4q13.1-q13.3), revelando que o material extra no cromossoma 21 se tratava de uma inserção de material com origem no braço longo do cromossoma 4. Trissomias do braço longo do cromossoma 4 estão referidas como associadas ao quadro clínico de DC, o que leva a concluir que esta alteração possa estar na origem do fenótipo deste paciente (Lundin et al., 2002).

Este caso foi particularmente interessante porque demonstrou que a combinação de múltiplas tecnologias (citogenética convencional, citogenética molecular e aCGH) permitiram concluir que, não se tratava de uma duplicação direta do cromossoma 21, como o estudo do cariótipo levou inicialmente a crer, mas uma duplicação por inserção herdada e conseqüentemente com um risco de recorrência, que para esta última situação é substancialmente elevada.

Concluindo-se que, é fundamental que um laboratório de diagnóstico tenha a possibilidade de recorrer a diferentes metodologias, tanto para estabelecer corretamente a natureza das alterações e assim calcular devidamente o risco de recorrência na família em causa, como identificar outras famílias que estão em risco e também necessitam de aconselhamento genético, de estudos direcionados e de eventual diagnóstico prénatal.

As metodologias de MLPA e aCGH são muito importantes na deteção de rearranjos estruturais desequilibrados, com a vantagem de poderem identificar alterações com um tamanho inferior a 3 – 5 Mb. Por este motivo 552 casos com o resultado do cariótipo normal, foram posteriormente analisados por estas tecnologias, permitindo deste modo a deteção de alterações submicroscópicas nestes pacientes.

A metodologia de MLPA compreende painéis de sondas para o estudo de regiões associadas às síndromes de microdeleção e microduplicação, bem como para as regiões subteloméricas relacionadas com os quadros clínicos de DC e autismo (Ahn et al., 2008; Koolen et al., 2004; Li et al., 2012; Slavotinek, 2011). Justificando-se a causalidade das alterações detetadas por esta metodologia, à exceção das quatro alterações na região pseudoautosómica *PAR2* comum aos braços longos dos

cromossomas X e Y que não estão associadas aos fenótipos observados (Kühl et al, 2001).

Dos 684 pacientes estudados pela técnica de MLPA em 19 casos verificaram-se alterações submicroscópicas desequilibradas. Para a obtenção deste resultado foi necessário recorrer a seis painéis de sondas diferentes, uma vez que esta metodologia é muito específica e não se adequa ao estudo de primeira linha em doenças como o DC e os distúrbios do comportamento.

Sendo o MLPA a tecnologia que tem o custo mais reduzido por teste, em patologias cuja clínica seja específica para uma região crítica (por exemplo as síndromes de PraderWilli, Angelman, DiGeorge entre outras), deve ser aplicado de forma direcionada. A sua utilização é também importante na confirmação de alterações já detetadas por outra metodologia.

O aCGH é uma tecnologia que identifica e quantifica alterações no número de cópias na sequência de DNA e delimita as regiões genómicas onde se encontram as alterações, rapidamente e com alta resolução. Pode identificar ainda CNV's novas que podem ou não estar associadas aos fenótipos estudados, no entanto há algumas que influenciam a expressão génica (Bucan et al., 2009; Marshall et al., 2008; Pinto et al., 2010).

Com a utilização da metodologia de aCGH foi possível aumentar significativamente a identificação de rearranjos cromossómicos desequilibrados em todo o genoma, permitindo deste modo uma taxa de deteção de 29,2%. Este valor está acima do referido na literatura (10 a 25%) (Hochstenbach et al., 2011; Knight, 2008; Vissers et al., 2010), visto que, no ano de 2011, esta tecnologia foi implementada como primeira linha o que levou a que a amostra inicial estudada tenha sido muito selecionada. Todos os casos estudados tinham um fenótipo alterado grave (DC e dismorfismos) e resultados laboratoriais normais (cariótipo e regiões críticas de várias síndromes). Desta forma verificou-se um aumento da taxa de deteção em indivíduos com DC e distúrbios do comportamento, contribuindo assim para a diminuição dos casos de etiologia desconhecida.

O estudo do cariótipo molecular nos 340 pacientes identificou 13 com alterações localizadas em regiões associadas a síndrome de microdeleção ou microduplicação e 86 casos com alterações que não estão descritas na DGV e envolvem genes codificantes conhecidos, estes compreendem alterações que

envolvem os genes descritos no *OMIM* e no *OMIM Morbid Map*, podendo ser consideradas como alterações causais. Nestas alterações foi possível estabelecer a correlação genótipo fenótipo recorrendo a informação disponível nas bases de dados existentes e na literatura (Hochstenbach et al., 2011; Knight, 2008; Li et al., 2010; McMullan et al., 2009; Miller et al., 2010; Piccione et al., 2010; Vissers et al., 2010).

A técnica de aCGH para além de detetar as síndromes de microdeleção e microduplicação conhecidas e descritas como associadas a DC e distúrbios do comportamento, permitiu também delinear novas alterações como sindrómicas relacionadas com estes fenótipos (Hehir-Kwa, 2010; McMullan et al., 2009; Miller et al., 2010).

De acordo com este trabalho, utilizar o aCGH como teste de primeira linha, no estudo de indivíduos com DC e distúrbios de comportamento, detetaria 124 casos alterados (93,2%), dos quais 76 (57,1%) não seriam detetados por qualquer das outras metodologias direcionadas. A utilização desta estratégia está a aumentar consideravelmente pois a relação entre o custo e benefício do aCGH é superior à aplicação combinada da citogenética convencional e os diferentes painéis de sondas utilizados pela MLPA. A tecnologia de aCGH também se torna mais rápida pois evita a realização de várias análises específicas e consecutivas.

Desta forma recorrendo a uma única tecnologia podem ser estudadas todas as alterações genéticas conhecidas como associadas ao DC e distúrbios do comportamento, bem como detetar novas alterações, que mesmo não estando descritas como causais, possam ser estudadas de forma a verificar o seu impacto no fenótipo, tornando-se o aCGH na técnica preferencial para o estudo destes indivíduos.

Para além de analisar as alterações já descritas como causais e etiologicamente patológicas, há também a necessidade de avaliar todas as alterações encontradas, pois mesmo as consideradas como CNV's, no caso específico de autismo e outros distúrbios do comportamento podem estar associadas à origem destas patologias, (Bucan et al., 2009; Marshall et al., 2008; Pinto et al., 2010).

Em 80 pacientes dos 340 estudados por aCGH, observaram-se CNV's, que apesar de estas alterações serem normalmente observadas em indivíduos normais, devem ser avaliadas as suas implicações fenotípicas, analisando os genes envolvidos nestas alterações, a sua origem familiar ou não e se estes genes estão sujeitos a fatores epigenéticos ou de dosagem génica. Neste trabalho não foi possível fazer essa

correlação genótipo/fenótipo, no entanto com o desenvolvimento das bases de dados e com aumento da informação acerca do impacto no fenótipo das alterações cromossómicas desequilibradas, a correlação pode ser estabelecida.

As técnicas de citogenética convencional, FISH, MLPA são muito importantes e essenciais, como complementares ao “cariótipo molecular”, principalmente na validação dos resultados das alterações estruturais desequilibradas detetadas por aCGH, e na análise das amostras dos pais para determinar a origem, e avaliar o significado clínico das alterações encontradas. São fundamentais na abordagem de casos com resultado positivo, pois permitem confirmar com precisão e segurança de uma forma rápida as alterações estruturais desequilibradas detetadas por aCGH, como verificado neste estudo.

A citogenética molecular é particularmente útil para melhor caracterizar os resultados alterados encontrados na citogenética convencional, e na confirmação dos resultados alterados obtidos pelas metodologias de MLPA e aCGH pois é muito sensível e específica permitindo um estudo preciso e rápido na verificação dos resultados obtidos estas metodologias.

A análise de fragmentos no estudo do gene *FMR1* é importante no diagnóstico genético da síndrome de X-Frágil associada ao DC e distúrbios de comportamento, porque é uma técnica rápida, fidedigna e eficaz. Nestes casos o seu estudo é essencial quando se verifique um resultado normal obtido pelas metodologias de aCGH e citogenética convencional.

A combinação de todas as metodologias envolvidas neste estudo permitiu estabelecer uma taxa de deteção em quase 20% dos casos, e caracterizar as alterações genótípicas permitindo a atribuição de uma etiologia causal para os indivíduos com DC e distúrbios de comportamento, conferindo ao estudo citogenético, molecular e genómico uma importância significativa no estudo destes indivíduos, conferindo uma maior relevância à tecnologia de aCGH.

O estudo genético no âmbito da citogenética e da genómica, aplicadas à área médico-legal não se aplica somente na problemática dos maus tratos e do abuso sexual em indivíduos com DC e distúrbios do comportamento. No âmbito da medicina-legal uma área de grande relevância é o estudo de indivíduos com esquizofrenia e outros distúrbios psicológicos e psiquiátricos. Neste campo também pode ser aplicada a tecnologia de aCGH, pois estão reportadas CNV's específicas identificadas nestes

indivíduos com uma frequência superior à observada em indivíduos normais. No entanto é necessário ainda aprofundar a investigação neste campo de modo a definir o impacto que estas alterações genómicas causam no fenótipo destes indivíduos, avaliar o grau de influência de outros fatores e estabelecer critérios de diagnóstico nestes casos (Hochstenbach et al., 2011).

## **5. CONCLUSÕES**

O déficit cognitivo (DC) e os distúrbios do comportamento são patologias com uma elevada incidência na população, de etiologia desconhecida em cerca de 80% dos casos. Com um grande impacto na qualidade de vida do paciente e da sua família, nos sistemas de educação e solidariedade social e mesmo no sistema legal, tornando essencial a determinação da sua etiologia.

Os maus tratos e o abuso sexual, quer seja em contexto familiar ou institucional, constituem um grave e delicado problema social. A incidência de situações de abuso e maus tratos nos indivíduos DC e os distúrbios do comportamento é muito superior à verificada em indivíduos normais. A proteção destas vítimas exige o desenvolvimento e investigação em todas as áreas envolvidas no estudo da pessoa humana.

Para identificar as alterações genótípicas nos pacientes incluídos neste trabalho, foram utilizadas várias metodologias, que permitiram estabelecer e caracterizar numa percentagem significativa de casos, o genótipo de indivíduos com déficit cognitivo e distúrbios do comportamento tornando o estudo citogenético, molecular e genómico o diagnóstico preferencial no estudo destas patologias.

Os resultados obtidos neste trabalho sustentam e justificam a importância do estudo citogenético e genómico para a identificação e caracterização de alterações cromossómicas e no impacto que estas têm no fenótipo destes pacientes.

A investigação sobre a base genética do DC e distúrbios do comportamento ganhou um impulso significativo na última década devido ao desenvolvimento das tecnologias moleculares, sobretudo com a implementação do cariótipo molecular, que alterou significativamente o estudo citogenético com grande impacto no diagnóstico e na avaliação clínica, e permitiu o aumento do número de alterações cromossómicas conhecidas e consideradas causais associadas a estes indivíduos.

Em suma, pode afirmar-se que a tecnologia de aCGH é um meio de diagnóstico preferencial de indivíduos não só com déficit cognitivo e distúrbios do comportamento, mas também com esquizofrenia e alterações psicológicas e psiquiátricas, visto que é um método rápido e com uma taxa de deteção elevada, tornando-se um importante exame complementar de diagnóstico na realização da perícia médico-legal.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ahn, J., Mann, K., Docherty, Z., Ogilvie, C. (2008). Submicroscopic chromosome imbalance in patients with developmental delay and/or dysmorphism referred specifically for Fragile X testing and karyotype analysis. *Molecular Cytogenetics*, 1.

Ahn, J., Ogilvie, C., Welch, A., Thomas, H., Madula, R., Hills, A., Donaghue, C., Mann, K. (2007). Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Medical Genetics*, 8, 9.

Amaral, R. et al. (2010), Deficiência mental – casuística da Unidade de Desenvolvimento do Hospital de Dona Estefânia, *Acta Médica Portuguesa*, 23, 6, 993-1000.

American Academy of Child and Adolescent Psychiatry – AACAP (2007). Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 46, 7, 894-921.

Apoio à Vítima (APAV) (2012). ESTATÍSTICAS APAV relatório anual 2011. [www.apav.pt/estatisticas](http://www.apav.pt/estatisticas)

Balikova, I., Menten, B., Ravel, T., Caignec, C., Thienpont, B., Urbina, M., Doco-Fenzy, M., Rademaeker, M., Mortier, G., Kooy, F., Ende, J., Devriendt, K., Fryns, J., Speleman, F., Vermeesch, J. (2007). Subtelomeric Imbalances in Phenotypically Normal Individuals. *Human Mutation*, 28, 10, 958-967.

Bangs C. & Donlon T. (2005). Metaphase Chromosome Preparation from Cultured Peripheral Blood Cells. In Dracopoli N., Haines J., Korf B., Moir D., Morton C., Seidman C., Seidman J., Smith D. (eds), *Current Protocols in Human Genetics* (Unit 4). EUA: John Wiley & Sons Inc.

Barch, M., Knutsen, T., Spurbeck, J. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (3ª ed.). New York: Lippincott – Raven.

Barger, E., Wacker, J., Macy, R., Parish, S. (2009). Sexual Assault Prevention for Women With Intellectual Disabilities: A Critical Review of the Evidence. *Intellectual And Developmental Disabilities*, 47, 4, 249-262.

Baron-Cohen, S., Scott, F., Allison, C., Williams, J., Bolton, P., Matthews, F., Brayne, C. (2009). Prevalence of autism-spectrum conditions: UK school-based population study. *The British Journal of Psychiatry*, 194, 500-509.

Barron, P., Hassiotis, A., Banes, J. (2002). Offenders with intellectual disability: the size of the problem and therapeutic outcomes. *Journal of Intellectual Disability Research*, 46, 6, 454 - 463.

Basel-Vanagaite, L. (2008). Molecular Genetics of Mental Retardation. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

- Bennett, D., Sullivan, M., Lewis, M. (2006). Relations of Parental Report and Observation of Parenting to Maltreatment History. *Child Maltreatment*, 11, 1, 63-75.
- Bertelli M., et al. (2012). Reliability and validity of the SPAID-G check list for detecting psychiatric disorders in adults with intellectual disability. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 382-390.
- Bucan, M., Abrahams, B., Wang, K., Glessner, J., Herman, E. (2009). Genome-Wide Analyses of Exonic Copy Number Variants in a Family-Based Study Point to Novel Autism Susceptibility Genes. *PLoS Genet*, 5, 6.
- Carvalho, L. (2007). *A valoração do testemunho da criança vítima de abuso sexual intra-familiar no contexto da avaliação forense*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses.
- Caylak, E. (2011). Biological/Biochemical Features and Molecular Genetics of Specific Language Impairment (SLI). *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Código de Processo Penal. Decreto-Lei nº 78/87, de 17 de Fevereiro, Republicado pela Lei nº 48/2007, de 29 de Agosto, Decreto-Lei nº 166, Série I, 5844-5954.
- Código Penal. Decreto-Lei nº 400/82, de 23 de Setembro, Republicado pela Lei nº 59/2007, de 4 de Setembro, Decreto-Lei nº 170, Série I, 6181-6258.
- Cook, F., Oliver, C. (2011). A review of defining and measuring sociability in children with intellectual disabilities. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 11-24.
- Crego, C., Landreth, A., Silva, A. (2011). Molecular and Cellular Basis of Learning Difficulties in Genetic Disorders. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Eastgate, G., Driel, M., Lennox, N., Scheermeyer, N. (2011). Women with intellectual disabilities – a study of sexuality, sexual abuse and protection skills. *Australian Family Physician*, 40, 4, 226-230.
- Edelmann, L., Hirschhorn, K. (2009). Clinical Utility of Array CGH for the Detection of Chromosomal Imbalances Associated with Mental Retardation and Multiple Congenital Anomalies. Year In Human And Medical Genetics, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1151, 157-166.
- Eriksson, M., Westerlund, J., Anderlid, B., Gillberg, C., Fernell, E. (2012) First-degree relatives of young children with autism spectrum disorders: Some gender aspects. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 1642-1648.
- Fan, Y., Jayakar, P., Zhu, H., Barbouth, D., Sacharow, S., Morales, A., Carver, V., Benke, P., Mundy, P., Elsas, L. (2007). Detection of Pathogenic Gene Copy Number

Variations in Patients With Mental Retardation by Genomewide Oligonucleotide Array Comparative Genomic Hybridization. *Human Mutation*, 28, 11, 1124-1132.

Ferreira, J. (2004). Dossier de perturbações do Desenvolvimento, *Revista Portuguesa de Clínica Geral, Atraso de Desenvolvimento Psicomotor*, 20, 703-12.

Ferreira, S., Matoso, E., Venâncio, M., Saraiva, J., Melo, J., Carreira, I. (2012). Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in alagille syndrome region. *Molecular Cytogenetics*, 5, 25.

Fu, Y., Kuhl, D., Pizzuti, A. et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67, 6, 1047-1058.

Gardner, R., Sutherland G. (2003). *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*, 3ª Edição. USA: Oxford University Press.

Gerstein, E., Crnic, K., Blacher, J., Baker, B. (2009). Resilience and the course of daily parenting stress in families of young children with intellectual disabilities. *Journal of Intellectual Disabilities Research*, 53, 12, 981-997.

Gillespie, S., Mitchell, I., Fisher, D., Beech, A. (2012). Treating disturbed emotional regulation in sexual offenders: The potential applications of mindful self-regulation and controlled breathing techniques. *Aggression and Violent Behavior*, 17, 333-343.

Goumy, C., Mihaescu, M., Tchirkov, A., Giollant, M., Bonnet-Dupeyron, M., Jaffray, J., Geneix, A., Perissel, B., Francannet, C., Boespflug-Tanguy O., Vago, P. (2005). An unusual familial chromosome 9 "variant" with variable phenotype: characterization by CGH analysis. *Morphologie*, 89, 285, 71-75.

Gurkan, C., Hagerman, R. (2012). Targeted treatments in autism and fragile X syndrome. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 6, 1311-1320.

Hall, L. (2006). Turner Syndrome. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Hantash, F., Goos, D., Tsao, D., Quan, F., Buller-Burckle, A., Peng, M., Jarvis, M., Sun, W., Strom, C. (2010). Qualitative assessment of FMR1 (CGG)<sub>n</sub> triplet repeat status in normal, intermediate, premutation, full mutation, and mosaic carriers in both sexes: Implications for fragile X syndrome carrier and newborn screening. *Genetics IN Medicine*, 12, 3, 162-173.

Hattier, M., Matson, J., Tureck, K., Horovitz, M. (2011). The effects of gender and age on repetitive and/or restricted behaviours and interests in adults with autism spectrum disorders and intellectual disability. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 2346-2351.

- Hawkins, M., Boyle, J., Wright, J., Elles, R., Ramsden, S., O'Grady, A., Sweeney, M., Barton, D., Burgess, T., Moore, M., Burns, C., Stacey, G., Gray, E., Metcalfe, P., Hawkins, J. (2011). Preparation and validation of the first WHO international genetic reference panel for Fragile X syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 19, 10-17.
- Hehir-Kwa, J., Wieskamp, N., Webber, C., Pfundt, R., Brunner, H. (2010) Accurate Distinction of Pathogenic from Benign CNVs in Mental Retardation. *PLoS ONE* 6, 4, 1000752.
- Henry, L. A. (2010). The episodic buffer in children with intellectual disabilities: An exploratory study. *Research in Developmental Disabilities*, 31, 6.3, 1609–1614.
- Hills, A., Ahn, J., Donaghue, C., Thomas, H., Mann, K., Ogilvie, C. (2010). MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance. *Molecular Cytogenetics*, 3, 19.
- Hochstenbach, R., Binsbergen, E., Engelen, J., Nieuwint, A., Polstra, A., Poddighe, P., Ruivenkamp, C., Sikkema-Raddatz, B., Smeets, D., Poot, M. (2009). Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in Netherlands. *European Journal of Medical Genetics*, 52, 161-169.
- Hochstenbach, R., Buizer-Voskamp, J., Vorstman, J., Ophoff, R. (2011). Genome Arrays for the Detection of Copy Number Variations in Idiopathic Mental Retardation, Idiopathic Generalized Epilepsy and Neuropsychiatric Disorders: Lessons for Diagnostic Workflow and Research. *Cytogenetic Genome Research*, 135, 174-202.
- Horovitz, M., Matson, J. L., Sipes, M., Shoemaker, M., Belva, B., Bamburg J. W. (2011). Incidence and trends in psychopathology symptoms over time in adults with severe to profound intellectual disability. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 685–692.
- Hsu, S., Yen, C., Hung, W., Lin, L., Wu, C., Lin, J. (2012). The risk of metabolic syndrome among institutionalized adults with intellectual disabilities. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 615-620.
- Irazabal, M., Marsa, F., García, M., Gutierrez-Recacha, P., Martorell, A., Salvador-Carulla, L., Ochoa, S. (2012). Family burden related to clinical and functional variables of people with intellectual disability with and without a mental disorder. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 796-803.
- Jaillard, S., Drunat, S., Bendavid, C., Aboura, A., Etcheverry, A., Journal, H., Delahaye, A., Pasquier, L., Bonneau, D., Toutain, A., Burglen, A., Guichet, A., Pipiras, E., Gilbert-Dussardier, B., Benzacken, B., Martin-Coignard, D., Henry, C., David, A., Lucas, J., Mosser, J., David, V., Odent, S., Verloes, A., Dubourg, C. (2010). Identification of gene copy number variations in patients with mental retardation using array-CGH: Novel syndromes in a large French series. *European Journal of Medical Genetics*, 53, 66-75.

- Jehee, F., Takamori, J., Medeiros, P., Pordeus, A., Latini, F., Bertola, D., Kim, C., Passos-Bueno, M. (2011). Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *European Journal of Medical Genetics*, 54, 425-432.
- Jin, P., Warren, S. (2000). Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics* 9, 6, 901-908.
- Karnebeek, C., Scheper, F., Abeling, N., Alders, M., Barth, P., Hoovers, J., Koevoets, C., Wanders, R., Hennekam, R. (2005). Etiology of Mental Retardation in Children Referred to a Tertiary Care Center: A Prospective Study. *American Journal on Mental Retardation*, 110, 4, 253-267.
- Keeling, J., Beech, A., Rose, J. (2007). Assessment of intellectually disabled sexual offenders: The current position. *Aggression and Violent Behavior*, 12, 229-241.
- Kehrer-Sawatzki, H., Steinbach, P., Hameister, H. (2006). X-linked Genes for General Cognitive Abilities. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Knight, S. (2008). Intellectual Disability: Genetics. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Knoll, J. & Lichter, P. (2005). In Situ Hybridization to Metaphase Chromosomes and Interphase Nuclei. In Dracopoli N., Haines J., Korf B., Moir D., Morton C., Seidman C., Seidman J., Smith D. (eds), *Current Protocols in Human Genetics* (Unit 8.10). EUA: John Wiley & Sons Inc.
- Kocovska, E., Fernell, E., Billstedt, E., Minnis, H., Gillberg, C. (2012). Vitamin D and autism: Clinical review. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 1541-1550.
- Koolen, D., Nillesen, W., Versteeg, M., Merkx, G., Knoers, N., Kets, M., Vermeer, S., van Ravenswaaij, C., Kovel, C., Brunner, H., Smeets, D., Vries, B., Sistermans, E. (2004). Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *Journal Medical Genetics*, 41, 892-899.
- Koolen, D., Pfundt, R., Leeuw, N., Hehir-Kwa, J., Nillesen, W., Neefs, I., Scheltinga, I., Sistermans, E., Smeets, D., Brunner, H., van Kessel, A., Veltman, J., Vries, B. (2009). Genomic Microarrays in Mental Retardation: A Practical Workflow for Diagnostic Applications. *Human Mutation*, 30, 283-292.
- Kou, Y., Betancur, C., Xu, H., Buxbaum, J., Maayan, A. (2012). Network- and attribute-based classifiers can prioritize genes and pathways for autism spectrum disorders and intellectual disability. *American Journal Medical Genetics Part C*, 160 C, 2, 130-42.

Kozłowski, A. M., Matson, J. L., Sipes, M., Hattier, M. A., Bamburg J. W. (2011). The relationship between psychopathology symptom clusters and the presence of comorbid psychopathology in individuals with severe to profound intellectual disability. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 1610–1614.

Kriek M., Knijnenburg J., White S. Rosenberg, C., Dunnen, J., Ommen, G., Tanke, H., Breuning, M., Szuhai, K. (2007). Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: A new strategy combining MLPA and array-CGH. *American Journal Of Medical Genetics - Part A*, 143A, 6, 610-614.

Kühl H., Röttger S., Heilbronner H., Enders H., Schempp W. (2001). Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Research*, 9, 3, 215-22.

Lam, A., Lam, S., Lai, K., Tong, T., Chau, T. (2006). High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clinical Biochemistry*, 39, 196–202.

Lamb, J. (2009). Molecular Genetics of Autism. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Leonard, H., Glasson, E., Nassar, N., Whitehouse, A., Bebbington, A. (2011). Autism and Intellectual Disability Are Differentially Related to Sociodemographic Background at Birth. *PLoS ONE*, 6, 3, 17875.

Levy, S., Mandell, D., Schultz, R. (2010). Autism. *Lancet* 7, 374, 9701, 1627-1638.

Li, F., Shen, Y., Köhler, U., Sharkey, F., Menon, D., Coulleaux, L., Malan, V., Rio, M., McMullan, D., Coxi, H., Fagan, K., Gaunt, L., Metcalfe, K., Heinrich, U., Hislop, G., Maye, U., Sutcliffe, M., Wu, B., Thiel, B., Mulchandani, S., Conlin, L., Spinner, N., Murphy, K., Batista, D. (2010). Interstitial microduplication of Xp22.31: Causative of intellectual disability or benign copy number variant? *European Journal of Medical Genetics*, 53, 93-99.

Li, M., Andersson, H. (2009). Clinical Application of Microarray-Based Molecular Cytogenetics: An Emerging New Era of Genomic Medicine. *The Journal Of Pediatrics*, 155, 3.

Lundin, C., Zech, L., Sjörs, K., Wadelius, C., Annerén, G. (2002). Trisomy 4q syndrome: presentation of a new case and review of the literature. *Annales de Génétique*, 45, 2, 53-57.

Magalhães, T. (2003). A avaliação do dano corporal em Direito Penal. Breves reflexões médico-legais. *Revista de Direito Penal*, 2, 1, 63-82.

Magalhães, T. (2005). *Maus tratos em crianças e jovens* (4ª Ed.). Coimbra: Quarteto.

- Magalhães, T. (2010). *Abuso de crianças e jovens: da suspeita ao diagnóstico*. Lisboa: Lidel Edições técnicas, Lda.
- Maljaars, J., Noens, I., Scholte, E., Berckelaer-Onnes, I. (2012). Level of sense-making in children with autistic disorder and intellectual disability: Patterns of delay and deviance in development. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 6, 806-814.
- Manolakos, E., Vetro, A., Kefalas, K., Rapti, S., Louizou, E., Garas, A., Kitsos, G., Vasileiadis, L., Tsoplou, P., Eleftheriades, M., Peitsidis, P., Orru, S., Liehr, T., Petersen, M., Thomaidis, L. (2010). The use of array-CGH in a cohort of Greek children with developmental delay. *Molecular Cytogenetics*, 3, 22.
- Manzanero, A., Contreras, M., Recio, M., Alemany, A., Martorell, A. (2012). Effects of presentation format and instructions on the ability of people with intellectual disability to identify faces. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 391-397.
- Marshall, C., Noor, A., Vincent, J., Lionel, A., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., Thiruvahindrapduram, B., Fiebig, A., Schreiber, S., Friedman, J., Ketelaars, C., Vos, Y., Ficicioglu, C., Kirkpatrick, S., Nicolson, R., Sloman, L., Summers, A., Gibbons, C., Teebi, A., Chitayat, D., Weksberg, R., Thompson, A., Vardy, C., Crosbie, V., Luscombe, S., Baatjes, R., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Fernandez, B., Szatmari, P., Scherer, S. (2008). Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics*, 82, 477-488.
- Martorell, A., Gutierrez-Recacha, P., Irazabal, M., Marsa, F., Garcia, M. (2011). Family impact in intellectual disability, severe mental health disorders and mental health disorders in ID. A comparison. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 2847-2852.
- Matson, J. L., Belva, B. C., Hattier, M. A., Matson, M. L. (2012). Scaling methods to measure psychopathology in persons with intellectual disabilities. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 549-562.
- Maulik, P., Mascarenhas, M., Mathers, C., Dua, T., Saxena, S. (2011). Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 419-436.
- McCarthy, J., Hemmings, C., Kravariti, E., Dworzynski, K., Holt, G., Bouras, N., Tsakanikos, E. (2010). Challenging behavior and co-morbid psychopathology in adults with intellectual disability and autism spectrum disorders. *Research in Developmental Disabilities*, 31, 362-366.
- McKenzie, K., Michie, A., Murray, A., Hales, C. (2012). Screening for offenders with an intellectual disability: The validity of the Learning Disability Screening Questionnaire. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 791-795.
- McMullan, D., Bonin, M., Hehir-Kwa, J., Vries, B., Dufke, A., Rattenberry, E., Steehouwer, M., Moruz, L., Pfundt, R., Leeuw, N., Riess, A., Altug-Teber, O., Enders, H., Singer, S., Grasshoff, U., Walter, M., Walker, J., Lamb, C., Davison, E., Brueton, L.,

Riess, O., Veltman J. (2009). Molecular Karyotyping of Patients with Unexplained Mental Retardation by SNP Arrays: A Multicenter Study. *Human Mutation*, 30, 1082-1092.

Mefford, H., Batshaw, M., Hoffman, E. (2012). Genomics, Intellectual Disability, and Autism. *New England Journal of Medicine*, 366, 733-743.

Miller, T., Adam, M., Aradhya, S., Biesecker, L., Brothman, A., Carter, N., Church, D., Crolla, J., Eichler, E., Epstein, C., Faucett, A., Feuk, L., Friedman, J., Hamosh, A., Jackson, L., Kaminsky, E., Kok, K., Krantz, I., Kuhn, R., Lee, C., Ostell, J., Rosenberg, C., Scherer, S., Spinner, N., Stavropoulos, D., Tepperberg, J., Thorland, E., Vermeesch, J., Waggoner, D., Watson, M., Martin, L., Ledbetter, D. (2010). Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *The American Journal of Human Genetics*, 86, 749-764.

Mitchell, W. (2012). Parents' accounts: Factors considered when deciding how far to involve their son/daughter with learning disabilities in choice-making. *Children and Youth Services Review*, 34, 1560-1569.

Myrbakk, E., Tetzchner, S. (2008) Psychiatric disorders and behavior problems in people with intellectual disability. *Research in Developmental Disabilities*, 29, 316-332.

Nannini, A. (2006). Sexual assault patterns among women with and Without disabilities seeking survivor services. *Women's Health Issues*, 16, 372-379.

Nieuwenhuijzen, M., Vriens, A. (2011). Social Cognitive skills and social information processing in children with mild to borderline intellectual disabilities. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 426-434.

O'Brien, G. (2002). Dual diagnosis in offenders with intellectual disability: setting research priorities: a review of research findings concerning psychiatric disorder (excluding personality disorder) among offenders with intellectual disability. *Journal of Intellectual Disability Research*, 46, 21-30.

Oeseburg, B., Groothoff, J., Dijkstra, G., Reijneveld, S., Jansen, D. (2010). Pervasive developmental disorder behavior in adolescents with intellectual disability and co-occurring somatic chronic diseases. *Research in Developmental Disabilities*, 31, 496-501.

Oliveira, G., Matoso, E., Vicente, A., Ribeiro, P., Marques, C., Ataíde, A., Miguel, T., Saraiva, J., Carreira, I. (2003). Partial Tetrasomy of Chromosome 3q and Mosaicism in a Child with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 33, 2, 177-185.

Pandey U., Phadke S., Mittal B. (2004). Molecular diagnosis and genetic counselling for fragile X mental retardation. *Neurology India*, 52, 1, 36-42.

- Patterson, D., Lott, I. (2011). Down Syndrome. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Piccione, M., Piro, E., Serraino, F., Cavani, S., Ciccone, R., Malacarne, M., Pierluigi, M., Vitaloni, M., Zuffardi, O., Corsello, G. (2012). Interstitial deletion of chromosome 2p15-16.1: Report of two patients and critical review of current genotype e phenotype correlation. *European Journal of Medical Genetics*, 55, 238-244.
- Pinto, D. et al. (2010). Functional Impact of Global Rare Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder. *Nature*, 466(7304), 368-372.
- Poppes, P., van der Putten A., Vlaskamp, C. (2010). Frequency and severity of challenging behaviour in people with profound intellectual and multiple disabilities. *Research in Developmental Disabilities*, 31, 1269-1275.
- Rachidi, M., Lopes, C. (2007). Mental retardation in Down syndrome: From gene dosage imbalance to molecular and cellular mechanisms. *Neuroscience Research*, 59, 349-369.
- Rauch, A., Hoyer, J., Guth S., Zweier, C., Kraus, C., Becker, C., Zenker, M., Huffmeier, U., Thiel, C., Ruschendorf, F., Nurnberg, P., Reis, A., Trautmann, U. (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 140A, 2063-2074.
- Raymond, F. (2006). X linked mental retardation: a clinical guide. *Journal of Medical Genetics*, 43,193-200.
- Rooms, L., Reyniers, E., Kooy, R. (2005). Subtelomeric Rearrangements in the Mentally Retarded: A Comparison of Detection Methods. *Human Mutation*, 25, 513-524.
- Rooms, L., Reyniers, E., Luijk, R., Scheers, S., Wauters, J., Ceulemans, B., Ende, J., Bever, Y., Kooy, R. (2004). Subtelomeric Deletions Detected in Patients With Idiopathic Mental Retardation Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). *Human Mutation*, 23, 17-21.
- Rooney, D. E. (2001). *Human Cytogenetics: constitutional analysis* (3<sup>th</sup> ed.). London: Oxford University Press.
- Rzepecka, H., McKenzie, K., McClure, I., Murphy, S. (2011) Sleep, anxiety and challenging behaviour in children with intellectual disability and/or autism spectrum disorder. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 2758-2766.
- Sagoo, G., Butterworth, A., Sanderson, S., Shaw-Smith, C., Higgins, J., Burton, H. (2009). Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genetics IN Medicine*, 11, 3, 139-146.

- Schieve, L., Gonzalez, V., Boulet, S., Visser, S., Rice, C., Braun, K., Boyle, C. (2012). Concurrent medical conditions and health care use and needs among children with learning and behavioural developmental disabilities, National Health Interview Survey, 2006–2010. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 467–476.
- Schinzel, A. (2001). *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man* (2<sup>a</sup> Ed.). New York: De Gruyter.
- Schwartz, C., Neri, G. (2012). Autism and intellectual disability: Two sides of the same coin. *American Journal of Medical Genetics Part C, Seminars in Medical Genetics*, 160C, 2, 89-90.
- Scior, K. (2011). Public awareness, attitudes and beliefs regarding intellectual disability: A systematic review. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 2164-2182.
- Scior, K., Furnham, A. (2011). Development and validation of the Intellectual Disability Literacy Scale for assessment of knowledge, beliefs and attitudes to intellectual disability. *Research in Developmental Disabilities*, 32, 1530-1541.
- Shaffer L., Slovak M., Campbell L. (2009). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009 - Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: S. Karger AG.
- Shaffer, L. (1997). Diagnosis of Microdeletion Syndromes by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). In Dracopoli N., Haines J., Korf B., Moir D., Morton C., Seidman C., Seidman J., Smith D. (eds), *Current Protocols in Human Genetics* (Unit 8.10). EUA: John Wiley & Sons Inc.
- Shea, S. (2006). Mental retardation in Children ages 6 to 16. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13, 262–270.
- Sherman, S., Pletcher, B., Driscoll, D. (2005). Fragile X syndrome: Diagnostic and carrier testing. *Genetics in Medicine*, 7, 8, 584-587.
- Silva, K. (2010). *Abuso sexual de crianças: aspetos jurídicos a ponderar no âmbito da perícia médico-legal*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses.
- Slavotinek, A. (2012). Microdeletion Syndromes. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Smith, K., Matson, J. (2010). Social skills: Differences among adults with intellectual disabilities, co-morbid autism spectrum disorders and epilepsy. *Research in Developmental Disabilities*, 31, 1366-1372.
- Spencer, T., Biederman, J., Mick, E. (2007). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Diagnosis, Lifespan, Comorbidities, and Neurobiology. *Ambulatory Pediatrics*, 7, 73-81.

- Stegmann, A., Jonker, L., Engelen, J. (2008). European Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Journal of Medical Genetics*, 51, 93-105.
- Straetmans, J., Valk, H., Schellevis, F., Dinant, G. (2006). Health problems of people with intellectual disabilities: the impact for general practice. *British Journal of General Practice*, 57, 64-66.
- Subramonia-Iyer, S., Sanderson, S., Sagoo, G., Higgins, J., Burton, H., Zimmern, R., Kroese, M., Brice, P., Shaw-Smith, C. (2007). Array-based comparative genomic hybridization for investigating chromosomal abnormalities in patients with learning disability: Systematic review meta-analysis of diagnostic and false-positive yields. *Genetics IN Medicine*, 9, 2, 74-79.
- Szumski, G., Karwowski, M. (2012). School achievement of children with intellectual disability: The role of socioeconomic status, placement, and parents' engagement. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 1615-1625.
- Tassone, F., Pan, R., Amiri, K., Taylor, A., Hagerman, J. (2008). A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the Fragile X (*FMR1*) gene in newborn and high-risk populations. *Journal Molecular Diagnosis*, 10, 1, 43-49.
- Teixeira, R. & Carreira, I. (2005). Meiose e Aneuploidia. In Azevedo, C. (2005). *Biologia Celular e Molecular* (4ª ed.). Lisboa: Lidel.
- Theisen, A. (2008). Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education* 1, 1.
- Thorn, S., Pittman, A., Myers, R., Slaughter, C. (2009). Increasing community integration and inclusion for people with intellectual disabilities. *Research in Developmental Disabilities*, 30, 891–901.
- Timms, S., Goreczny, A. (2002). Adolescent sex offenders with mental retardation Literature review and assessment considerations. *Aggression and Violent Behavior*, 7, 1–19.
- Trujillo-Orrego, N., Pineda, D., Uribe, L. (2012). Diagnostic validity of attention deficit/hyperactivity disorder: from phenomenology to neurobiology. *Revista de Neurología*, 1, 54, 5, 289-302.
- UKPMC Funders Group (2009). A systematic, large-scale resequencing screen of X chromosome coding exons in mental retardation. *Nature Genetics*, 41, 5, 535-543.
- Verdugo, M., Bermejo, B. (1997). The Mentally Retarded Person as a Victim of Maltreatment. *Aggression and Violent Behavior*, 2, 2, 143-165.

Vissers, L., Ligt, J., Gilissen, J., Janssen, I., Steehouwer, M., Vries, P., Lier, B., Arts, P., Wieskamp, N., Rosario, M., Bon, B., Hoischen, A., Vries, B., Brunner, H., Veltman, J. (2010a). A *de novo* paradigm for mental retardation. *Nature Genetics* 42, 12, 1109-1113.

Vissers, L., Vries, B., Veltman, J. (2010b). Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *Journal Medical Genetics*, 47, 289-297.

Warner, J., Barron, L., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D., Brock, D. (1996). A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *Journal Medical Genetics*, 33, 1022-1026.

Werner, S., Corrigan, P., Ditchman, N., Sokol, K. (2012). Stigma and intellectual disability: A review of related measures and future directions. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 748-765.

Whitehouse, A., Line, E., Watt, H., Bishop, D. (2009). Qualitative aspects of developmental language impairment relate to language and literacy outcome in adulthood. *International Journal of Language & Communication Disorders*, 44, 4, 489-510.

Wikström, A., Dunkel, L. (2011). Klinefelter syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25, 239-250.

Wilkinson, K., Rosenquist, C., McIlvane, J. (2009). Exclusion learning and emergent symbolic category formation in individuals with severe language impairments and intellectual disabilities. *Psychological Record*, 1, 59, 2, 187.

Wouw, E., Evenhuis, H., Echteld, M. (2012). Prevalence, associated factors and treatment of sleep problems in adults with intellectual disability: A systematic review. *Research in Developmental Disabilities*, 33, 1310-1332.

Zappella M. (2012). Reversible autism and intellectual disability in children. *American Journal of Medical Genetics, Part C, Seminar Medical Genetics*, 160 C, 2, 111-7.