

# **A IMPORTÂNCIA DE REARRANJOS SUBTELOMÉRICOS NO ATRASO MENTAL**

Marta Isabel Tomás Brás

Afiliação: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço: Rua Dr. Paulo Quintela, lote 320, 1º andar “B”; Coimbra

Correio electrónico: [martaisabelbras@gmail.com](mailto:martaisabelbras@gmail.com)

**A IMPORTÂNCIA DE REARRANJOS SUBTELOMÉRICOS NO ATRASO MENTAL**Marta Brás<sup>1</sup>, J Ferrão<sup>1</sup>, E Matoso<sup>1</sup>, IM Carreira<sup>1</sup>

1. Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**PALAVRAS-CHAVE:** atraso mental, rearranjos subteloméricos, deleção, citogenética, MLPA, FISH.

**RESUMO:****INTRODUÇÃO:**

O atraso mental é uma manifestação variável e heterogénea de uma disfunção do sistema nervoso central. Ocorre na população em geral com uma frequência de 1 a 3% ou mesmo superior.

Cerca de metade dos casos apresentam uma etiologia idiopática, enquanto que os restantes se podem dividir em causas genéticas, ambientais e de causa desconhecida. As alterações cromossómicas são uma causa importante do atraso mental.

A percentagem de atraso mental idiopático associado a alterações subteloméricas varia de 0,5 a 15,3% dos casos, estando dependente da resolução do estudo citogenético convencional de primeira linha.

Actualmente, as técnicas mais usadas para estudo das regiões subteloméricas são a técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) e a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Esta última surge como tendo elevada fiabilidade, especificidade e resolução. Comparativamente à técnica de FISH, o MLPA

permite o estudo simultâneo de vários loci, é mais económico e rápido, sendo ainda uma tecnologia menos laboriosa.

**OBJECTIVOS:**

Este estudo teve por objectivo a avaliação de regiões subteloméricas de 100 pacientes referidos pelo serviço de Genética Médica do Centro Hospitalar de Coimbra E. P. E. que permitiu um diagnóstico e possibilitou o cálculo da recorrência em gestações futuras de familiares de risco.

**METODOLOGIA:**

Todos os casos deste estudo foram submetidos às técnicas de citogenética convencional com bandas de alta resolução, MLPA, FISH, e pesquisa da forma alélica do gene FMR1 associado à síndrome do X frágil. Para a técnica de MLPA foram usados dois painéis de sondas: P036 e P070 (MRC Holland, Amsterdão, Holanda), seguindo o protocolo do fabricante. Na técnica de FISH foi usado o painel ToTelVysion (Vysis – Abbot Molecular) conforme protocolo estabelecido pelo próprio laboratório.

**RESULTADOS:**

Dos 100 casos seleccionados, foram encontradas cinco deleções em cinco pacientes: del(11)(q24.2), del(20)(pter), del(4)(p16.3), del(10)(q26.2) e del(22)(q13.3).

**CONCLUSÕES:**

Na população estudada 5% do atraso mental idiopático é devido a deleções subteloméricas, assumindo-se estas como uma causa importante desta disfunção.

Num dos pacientes, paciente 5, foi detectada uma deleção associada à síndrome de Phelan-McDermid (del(22)(q13)). As alterações dos outros quatro pacientes não foram relacionadas com nenhuma síndrome descrita na literatura.

A importância de um diagnóstico prende-se, não só com o próprio indivíduo, mas também com os progenitores, pela possibilidade de oferecer aconselhamento genético e cálculo de risco de recorrência em futuras gestações, assim como a avaliação do risco para outros membros da família.

**KEYWORDS:** mental retardation, subtelomeric rearrangements, deletion, cytogenetic, MLPA, FISH.

**ABSTRACT:**

**INTRODUCTION:**

Mental retardation is a variable and heterogeneous manifestation of a disfunction of the central nervous system. It occurs in the general population with a frequency of 1 to 3%, although higher frequencies have been reported.

The etiology of the disease is, by large, divided between genetic or environmental causes and unknown events. Chromosomal alterations are associated with mental retardation.

The precise frequency of idiopathic mental retardation due to subtelomeric alterations varies between 0,5 to 15.3% of the cases, being dependent on the resolution of the cytogenetic studies.

Currently, the most frequently used techniques in the study of subtelomeric regions are FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) and MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). The latter is a reliable and specific method with a high resolution. When comparing MLPA with FISH, it is clear that the former allows the concurrent study of multiple *loci*, it is a cheaper and a faster method, with the added advantage of being less laborious.

**OBJECTIVES:**

Our main goal was to evaluate the subtelomeric regions of 100 patients referred by the Clinical Genetics Department of Centro Hospitalar de Coimbra E. P. E., with the ultimate aim of attaining a diagnosis, enabling the calculation of the recurrence risk in a future pregnancy and to identify family members at risk.

**METHODS:**

All cases were studied by high resolution banding techniques, MLPA, FISH and for the fragile X syndrome. The MLPA technique used consisted of two probe sets: P036 e P070 (MRC Holland, Amsterdam, Holland), used according to the manufacture's protocol. The *ToTelVysion* Multi-color FISH Probe Panel (Abbott) was also used following the protocol approved in our laboratory.

**RESULTS:**

Of the 100 cases evaluated there were five subtelomeric deletions: del(11)(q24.2), del(20)(pter), del(4)(p16.3), del(10)(q26.2) and del(22)(q13.3).

**CONCLUSIONS:**

In our study 5% of idiopathic mental retardation was caused by subtelomeric deletions, clearly suggesting that it is an important cause of this dysfunction.

In one of the patients, patient five, the deletion found was previously described as the Phelan McDermid syndrome (del(10)(q26.2)). None of the remaining cases could be correlated with previously published syndromes.

Obtaining a diagnosis is not only important for the proband itself, but also for the parents, given the possibility of genetic counseling and recurrence risk calculation for a future pregnancy, as well as the evaluation of family members at risk.

## Introdução:

O atraso mental apresenta uma incidência de 1 a 3% da população (Stegmann et al, 2008) – dependendo dos critérios de classificação – podendo ter uma etiologia com origem em factores genéticos e/ou ambientais. As suas manifestações proporcionam um diagnóstico mais evidente a partir dos 5 anos (altura em que os testes de desenvolvimento se tornam válidos e de confiança) caracterizando-se como uma manifestação variável e heterogénea de uma disfunção do sistema nervoso central. É a causa mais frequente de limitação grave em crianças e jovens adultos (Battaglia e Cary, 2003). As causas desta disfunção são extremamente heterogéneas mas dividem-se em dois grupos principais: factores ambientais e factores genéticos (anomalias cromossómicas e alterações monogénicas). No entanto, em cerca de metade dos casos, a causa é desconhecida (Stegmann et al, 2008).

A avaliação genética assume uma importância fulcral nos pacientes que não apresentam etiologia definida pois muitas vezes há uma sensação de perda de controlo por parte das famílias. Se através de um estudo genético se alcança um diagnóstico há um maior entendimento sobre o que esperar em cada etapa, o tratamento possível e o risco de recorrência.

Nos últimos anos os avanços tecnológicos e científicos na área da citogenética molecular têm promovido um aumento de diagnósticos e conseqüentemente um maior conhecimento relativo à etiologia desta disfunção. Em pacientes com atraso mental idiopático os rearranjos subteloméricos têm sido reportados com uma incidência entre os 5-10% (Monfort et al, 2006) e 0,5-16,3% (Park et al, 2008).

O papel das regiões subteloméricas no atraso mental deve-se ao facto de estas serem particularmente ricas em genes (Park et al, 2008). Para além disso, estas regiões

contêm uma grande proporção de homologias o que favorece a ocorrência de recombinações. No entanto os rearranjos subteloméricos escapam muitas vezes ao nível da resolução das técnicas de citogenética convencional em que se detectam alterações envolvendo segmentos iguais ou superiores a 3-5 Mb. Esta dificuldade não só está associada ao tamanho dos segmentos envolvidos mas também à semelhança do padrão de bandas envolvidas nas alterações. (Park et al, 2008).

Várias técnicas laboratoriais têm sido desenvolvidas para auxiliar um diagnóstico mais sistemático destes rearranjos subteloméricos: a FISH – *Fluorescent In Situ Hybridization* –, MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* –, MAPH – *Multiplex Amplifiable Probe Hybridization* –, PCR em tempo real e *microarrays*. As técnicas mais usadas têm sido a FISH e o MLPA. Vários estudos foram já realizados para comparação entre estas duas técnicas concluindo-se que ambas obtêm resultados semelhantes, quando usados dois painéis de sondas no MLPA (Palomares et al, 2006). Segundo alguns estudos o MLPA poderá mesmo aumentar a detecção de rearranjos (Ahn et al, 2007; Stegmann et al, 2008). Esta técnica apresenta-se com elevada resolução, fiabilidade e especificidade. Permite o estudo de um número elevado de *loci* simultaneamente, é económica, de rápida execução, e menos laboriosa do que a FISH. Assume-se portanto como a melhor técnica no estudo de rearranjos desequilibrados submicroscópicos ao nível dos subtelómeros (Ahn et al, 2007).

A discrepância encontrada na bibliografia em termos de incidências de alterações subteloméricas pode dever-se a vários factores: diferentes critérios clínicos de inclusão usados nos estudos, o nível de resolução do estudo citogenético, o uso de técnicas diferentes de análise e a validação de resultados por outras metodologias. Na tentativa de uniformizar os estudos foi criada em 2001, por Vries, uma *check list* com 5

critérios de inclusão nos estudos (Vries et al, 2001), no entanto a mesma demonstrou não se justificar face às novas tecnologias como o MLPA e o array-CGH.

Este trabalho tem por objectivo avaliar as regiões subteloméricas utilizando os painéis de sondas P036 e P070 (MRC-Holland, Amesterdão, Holanda – [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)) para elucidar o envolvimento destas regiões na etiologia do atraso mental. Com este estudo pretende-se chegar a um diagnóstico para o grupo de pacientes em estudo e possibilitar ainda o cálculo do risco de recorrência para futuras gestações dos progenitores e a eventual necessidade de estudos familiares..

## **Materiais e métodos:**

### **Pacientes:**

O estudo foi desenvolvido analisando 100 pacientes referenciados pelo serviço de Genética Médica do Hospital Pediátrico do Centro Hospitalar de Coimbra E. P. E. Todos os pacientes apresentavam atraso mental ou atraso de desenvolvimento associado a características dismórficas, malformações congénitas e/ou história familiar de atraso mental. O estudo das regiões subteloméricas foi realizado simultaneamente com outros estudos genéticos, nomeadamente o estudo por citogenética convencional com bandas de alta resolução e a pesquisa da forma alélica do gene FMR1 associado à síndrome de X-frágil.

### **Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA):**

Neste estudo foram usados simultaneamente dois conjuntos de sondas, o painel P036 e o P070 (MRC-Holland, Amesterdão, Holanda) que apresentam como região-

alvo *loci* de ambas as regiões subteloméricas (pter e qter) de todos os cromossomas excepto dos cromossomas 13, 14, 15, 21 e 22 em que só foram avaliados os qter uma vez que, sendo cromossomas acrocêntricos, possuem braços curtos constituídos exclusivamente por sequências repetitivas.

Todos os alvos representam genes funcionais ou sequências codificantes de proteínas previamente descritas na literatura. O uso de dois conjuntos de sondas demonstrou melhores resultados confirmados pela bibliografia (Kirchhoff et al, 2005; Palomares et al, 2006) e pelo próprio laboratório.

#### **Métodos:**

Inicialmente procedeu-se ao isolamento do DNA a partir de sangue periférico total (*Genomed – JETQUICK Blood and Cell Culture DNA MIDI Spin Kit*). Posteriormente foi efectuado o procedimento de MLPA conforme o protocolo do fabricante (MRC-Holland) O produto de amplificação foi analisado por electroforese capilar usando um sequenciador ABI 3130 de acordo com o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) sendo os dados analisados pelo programa *GeneMapper* versão 4.1 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Através do programa *Coffalyser* criado pela MRC-Holland foram analisadas as áreas dos picos obtidos no electroferograma após electroforese capilar que representam quantitativamente os produtos de amplificação referentes a cada sonda. A análise dos resultados implica uma comparação das áreas dos picos das amostras dos pacientes com as áreas dos picos das amostras controlo, cujo número de cópias das regiões em estudo é normal. Os genes não afectados apresentam-se assim com um valor de 1.0 enquanto que duplicações aparecem como 1.5 e deleções como 0.5. Os valores *cut-off* usados foram os recomendados pelo fabricante sendo estes abaixo de 0.7 para deleções, acima de 1.3

para duplicações, e entre 0,7 e 1,3 para resultados normais. Quando foram encontrados valores aberrantes a reacção de MLPA foi repetida.

### **Confirmação dos resultados por FISH:**

A detecção de desequilíbrios pela técnica de MLPA foi posteriormente validada por FISH aplicando as sondas do painel ToTelVysion (Vysis - Abbott Molecular) de acordo com o protocolo estabelecido no nosso laboratório de Citogenética e Genómica.

### **Resultados:**

Nesta secção pretende-se mostrar apenas os casos com alterações cromossómicas estruturais. No *Anexo 1* constam os resultados de todos os casos estudados.

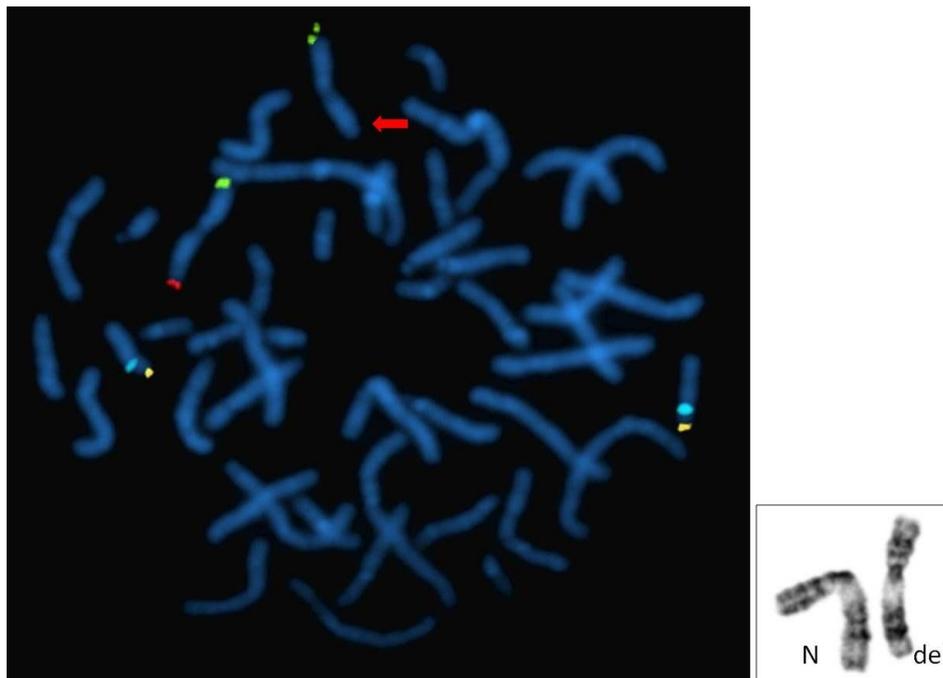
#### **Paciente 1**

Informação clínica: recém-nascido do sexo feminino, com atresia do esófago, fístula traqueo-esofágica, CIV subaórtica, rim esquerdo displásico, baço acessório. Hipocalcémia neonatal. Aparentemente sem alterações vertebrais.

Resultado:

46,XX,del(11)(q24.2)dn.mlpa 11qsubtel(p036,p070)x1.ish del(11)(qter-).

O estudo citogenético mostrou uma deleção do braço longo do cromossoma 11(q24.2→qter) que foi confirmada por MLPA e FISH – Fig. 1. Esta deleção é *de novo*.



**Fig. 1.** Metáfase hibridizada com o painel ToTelVysion (M11) evidenciando deleção da região 11qter (→). Par cromossômico 11 com bandas GTG mostrando a deleção terminal em (11q24.2).

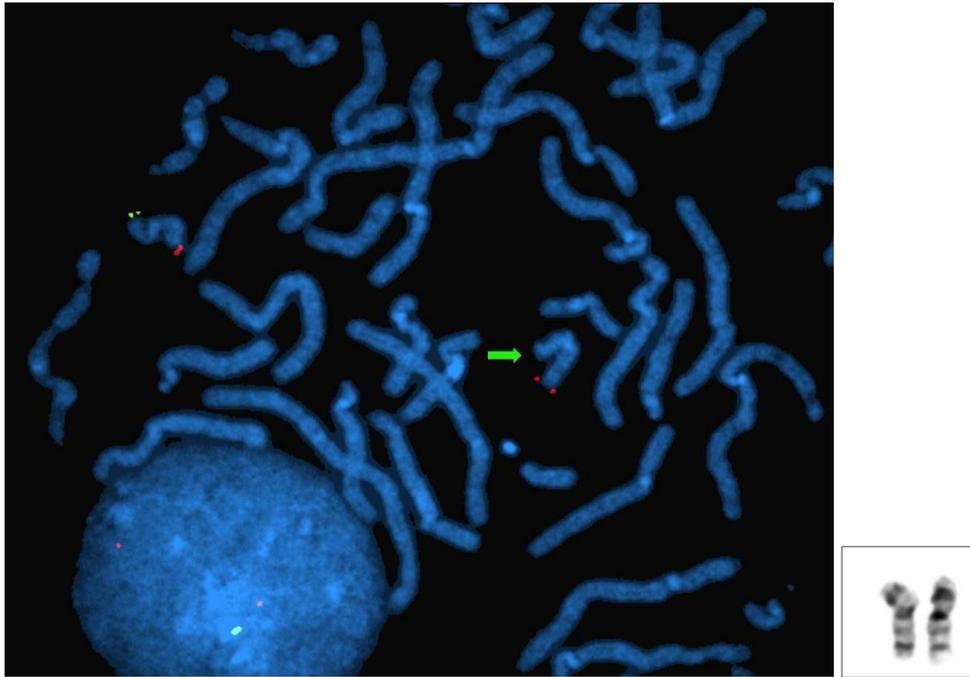
## Paciente 2

Informação clínica: paciente com ADPM (atraso de desenvolvimento psicomotor).

Resultado:

46,XX.mlpA 20psubtel(p036,p070)x1.ish del(20)(pter-).

O estudo citogenético das prometáfases mostrou um resultado normal. A análise por MLPA revelou uma monossomia da região terminal do braço curto (20pter) que foi confirmada por FISH. – Fig. 2. Aguarda-se estudo dos progenitores para determinar a origem desta alteração estrutural.



**Fig. 2. Metafase hibridizada com o painel ToTelVysion (M15) evidenciando deleção da região 20pter (→). Par cromossômico 20 com bandas GTG, mostrando tratar-se de uma deleção submicroscópica.**

### **Paciente 3**

Informação clínica: paciente do sexo feminino, com 7 anos de idade, com déficit cognitivo, dificuldades de aprendizagem e história familiar positiva para déficit cognitivo.

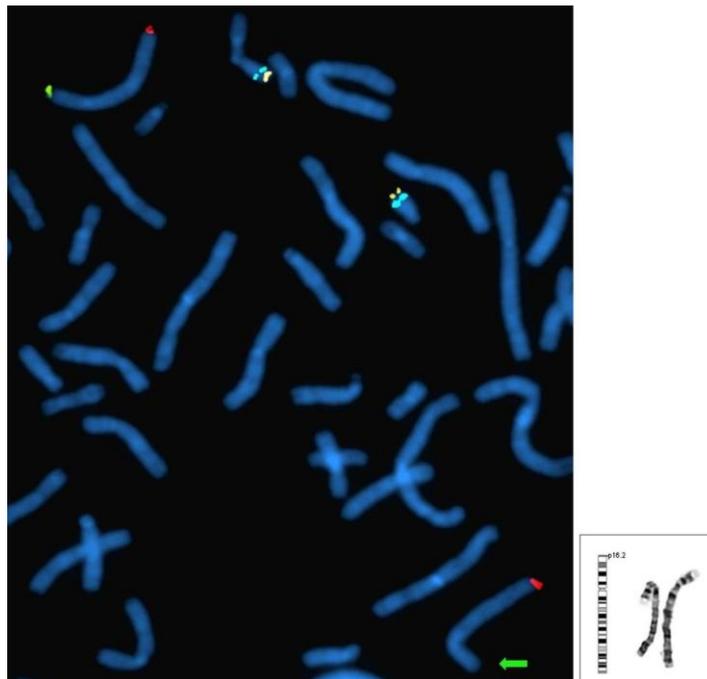
Resultado:

46,XX.mlpA 4psubtel(P036,P070)x1.ish del(4)(p16.3)(D4S3359-,WHSCR1+).

O estudo das prometáfases por citogenética convencional revelou um cariótipo normal. Por MLPA foi identificada uma monossomia da região terminal do braço curto do cromossoma 4. De modo a determinar se a região da síndrome de Wolf-Hirschhorn estava envolvida recorreu-se à FISH que demonstrou que, apesar de haver uma deleção

terminal, a região crítica desta síndrome estava presente (WHSCR1+). Conclui-se que a deleção observada era mais distal – Fig 3.

Aguarda-se o estudo dos progenitores para determinar se a alteração observada é *de novo* ou de origem familiar.



**Fig.3. Metáfase hibridizada com o painel ToTelVysion (M4) evidenciando deleção da região 4 pter (→). Par do cromossoma com bandas GTG mostrando que a região terminal é citogeneticamente normal.**

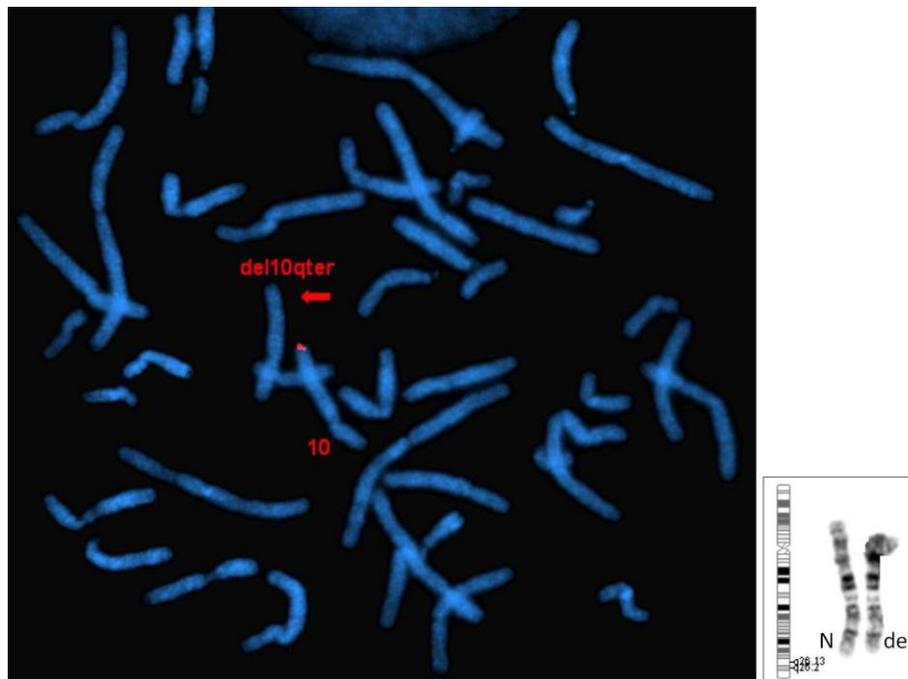
#### **Paciente 4**

Informação clínica: paciente do sexo masculino com microcefalia, baixa estatura, hidronefrose e ADPM.

Resultado:

46,XY,del(10)(q26.2).mlpa 10q subtel(p036,p070)x1.ish del(10)(qter)(D10S2290-)dn.

Foi observada em cromossomas com bandas de alta resolução uma deleção na região terminal do cromossoma 10 (q26.2). Esta alteração é *de novo* e foi confirmada por MLPA e por FISH.



**Fig. 4.** Metafase hibridizada com o painel ToTelVysion (M10) evidenciando deleção da região 10 qter (→). Par cromossômico 10 com bandas GTG mostrando a deleção crítica (10q26.2).

#### Paciente 5

Informação clínica: Paciente do sexo masculino, de 22 anos de idade, com atraso mental e alterações de comportamento.

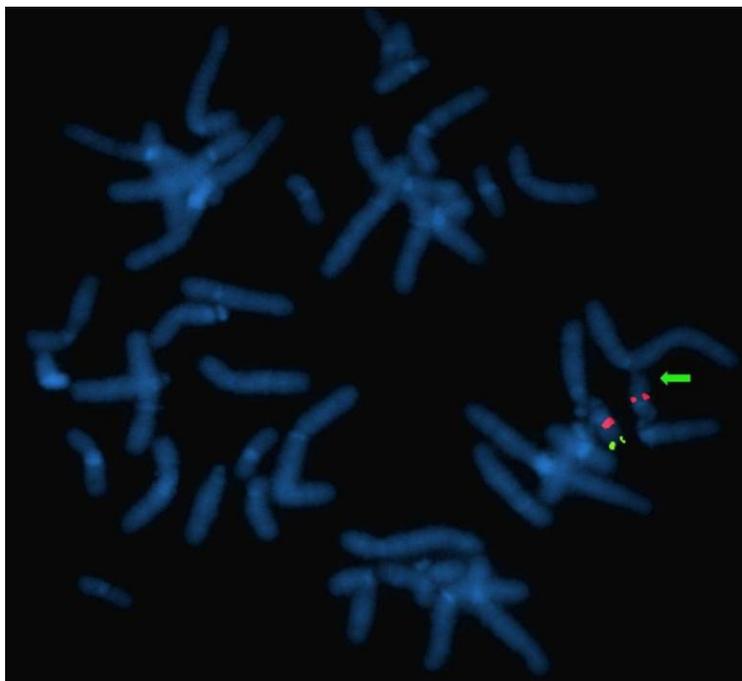
Resultado:

46,XY.mlpa 22qsubtel(p036,p070)x1,ish del(22)(q13.3)(N85A3-)dn.

O estudo por citogenética convencional das prometáfases revelou um cariótipo normal. Recorrendo a dois painéis de sondas para MLPA foi detectada uma

microdelecção na região terminal do braço longo do cromossoma 22 (q13.3) que foi confirmada por FISH.

O estudo dos progenitores demonstrou tratar-se de uma alteração *de novo*.



**Fig. 5. Metáfase hibridizada com sonda subtelomérica 22qter (verde) e da região crítica 22q11.2 (vermelho) evidenciando deleção da região 22qter (→).**

Das cinco deleções encontradas duas foram diagnosticadas primeiro pela citogenética convencional e confirmadas por molecular e três foram inicialmente diagnosticadas por MLPA e confirmadas por FISH. Três são *de novo* e duas aguardam estudo dos progenitores.

### **Discussão:**

Neste estudo usámos dois conjuntos de sondas de MLPA (P036 e P070) para análise de regiões subteloméricas de pacientes com atraso mental. Foram analisados 100

pacientes dos quais 5 apresentaram alterações nas regiões em análise (5%). Estes dados surgem de forma concordante com estudos previamente publicados (Rooms et al, 2004; Moog et al, 2005; Ahn et al, 2007). Alguma literatura descreve uma taxa de detecção substancialmente mais elevada de alterações, no entanto, os critérios clínicos de inclusão de pacientes nesses estudos podem influenciar este aspecto já que não é seguido um modelo de inclusão *standard*. O padrão de bandas na citogenética também é um factor de variação. Consequentemente, a comparação dos resultados obtidos com a literatura deve ser feita de forma cuidada.

Com base nos resultados encontrados podemos concluir que as alterações subteloméricas são uma causa importante de atraso mental, tal como tem sido referido (Ravnan et al, 2006; Mihçi et al, 2009).

### **Paciente 1**

Segundo Wu e colaboradores (2010) a deleção terminal do braço longo do cromossoma 11 está associada a atraso de desenvolvimento, baixa estatura, cardiopatia congénita, trombocitopenia, anomalias urogenitais, estenose do piloro e alterações oftalmológicas. O paciente 1 apresenta cardiopatia e rim esquerdo displásico, enquadrando a descrição clínica da literatura.

### **Paciente 2**

A descrição clínica do caso apenas relata atraso de desenvolvimento psicomotor. Segundo a literatura (Ravnan et al. 2006) esta deleção está associada a atraso de desenvolvimento podendo estar associada a dismorfismos, atraso de crescimento, hipotonia e/ou hipoplasia renal. Os genes envolvidos na deleção do paciente 2 são o

SOX2 e ZCCHC3 (dois factores de transcrição), sugerindo uma relação destes apenas com atraso de desenvolvimento.

### **Paciente 3**

A deleção terminal do braço curto do cromossoma 4 mais conhecida e reportada na literatura está associada à síndrome de Wolf-Hirschhorn (Koolen et al, 2004). Esta síndrome associa-se habitualmente a malformações múltiplas. No entanto, deleções pequenas ( $\leq 3.5$  Mb) estão frequentemente associadas a quadros clínicos mais ligeiros, sem malformações *major*. Foram realizados estudos por FISH neste paciente no sentido de validar e caracterizar o ponto de quebra. Perante os resultados da FISH foi possível concluir que o ponto de quebra desta deleção é distal à região crítica da síndrome de Wolf-Hirschhorn.

Nesta paciente denota-se a ausência de malformações congénitas o que levou ao estudo genético tardio, apenas quando as dificuldades de aprendizagem e défice cognitivo começaram a assumir importância. Na literatura a deleção da região (4pter) está associada a manifestações clínicas não só de atraso de desenvolvimento psicomotor bem como a dismorfismos (Anderlid et al, 2002), neste paciente não foram referidos dismorfismos naturalmente pela sua alteração estrutural ser mais distal.

### **Paciente 4**

Segundo a literatura as deleções 10qter são raras e frequentemente acompanhadas de hipotonia, dismorfismos craniofaciais, atraso de desenvolvimento psico-motor severo e criptorquidia (Teyssier et al, 1992). Num estudo de Scigliano e colaboradores (2004) é descrita a dilatação unilateral da pélvis renal e uretér detectada

às 32 semanas de gestação que evoluem para dilatação vesical, uretrohidronefrose à direita e refluxo bilateral de grau III/IV bilateral. São ainda descritos dismorfismos faciais, hérnia umbilical, clinodactilia e pescoço curto. Não é referida baixa estatura. Neste paciente observou-se atraso de desenvolvimento psicomotor, microcefalia e hidronefrose. Em contraste com as publicações anteriores não foram descritos dismorfismos faciais, hipotonia, baixa estatura ou surdez (referida pela primeira vez por Teyssier et al, 1992).

Apesar de os pais terem um estudo por citogenética convencional e por FISH normal o casal pediu, em consulta de aconselhamento genético, diagnóstico pré-natal por amniocentese para estudo citogenético de uma gestação em curso. Os resultados da amniocentese revelaram um cariótipo e FISH específico par o cromossoma 10 qter normais.

#### **Paciente 5**

A deleção da região 22(q13.3) está comumente associada à síndrome Phelan-McDermid (Phelan, 2008). Esta deleção apresenta uma frequência semelhante em ambos os sexos e é de difícil diagnóstico face à clínica inespecífica. Em mais de 97% dos casos está associada a hipotonia neonatal severa, e em mais de 98% de atraso a desenvolvimento psico-motor e atraso de desenvolvimento da linguagem. O crescimento normal a acelerado está habitualmente presente (em cerca de 95% dos casos). Encontram-se muitas vezes também presentes dismorfismos (ptose, dolicocefalia, entre outros). Num dos estudos são referidas alterações faciais discretas associadas a ombros finos e dedos compridos bem como distúrbio autista e epilepsia (Anderlid et al, 2002). Através do MLPA foi detectada a deleção da região SHANK3, geralmente associada a esta síndrome. Este gene codifica uma proteína estrutural

encontrada na região pós-sináptica, estando envolvida na ligação dos receptores da membrana pós-sináptica ao citoesqueleto e nas vias de transdução do sinal ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)), que não é produzida neste paciente.

O uso de duas tecnologias nestes casos foi importante uma vez que estas duas tecnologias se complementam. Uma das limitações da técnica de MLPA é o facto de não detectar rearranjos equilibrados o que é importante para os portadores nas suas opções reprodutivas. Relativamente à técnica de FISH sem qualquer confirmação, também pode não ser suficiente pois pequenas deleções podem levar a resultados falsos negativos.

Parece-nos importante salientar que uma história clínica cuidada com antecedentes pré-, peri-, e pós-natais; o estudo de pelo menos duas gerações; o exame físico com pesquisa de dismorfismos e anomalias *minor* e o exame neurológico orientam o diagnóstico em cerca de dois terços dos doentes (Moeschler, 2008). Nos cinco pacientes com alterações subteloméricas apenas um (caso 5) se correlacionou com uma síndrome previamente estabelecida na literatura (síndrome Phelan-McDermid). Apesar deste paciente apresentar poucas das alterações descritas como típicas desta deleção, compreendemos a importância que uma história clínica e exame físico completos e dirigidos representam e a necessidade de, perante um genótipo com alteração, fazer uma reavaliação do fenótipo.

Nenhum dos outros pacientes apresentou alterações subteloméricas sobreponíveis a síndromes previamente descritas. Reforçamos a importância de melhores correlações genótipo-fenótipo perante os resultados. É importante também o aconselhamento genético aos progenitores de modo a avaliar o risco de recorrência.

Neste estudo nenhum dos familiares apresentou rearranjos equilibrados o que, apesar de lhes ter sido explicado em consulta de aconselhamento genético que o risco de recorrência eram praticamente nulos, não inviabilizou que uma das famílias (paciente 4) pedisse um diagnóstico pré-natal por ansiedade justificada.

No que concerne aos pacientes com um resultado normal, é actualmente mandatário que se prossiga com estudos de genómica por array-CGH. Esta técnica não usada neste estudo, mas já implementada no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra permite analisar entre 60.000 a 1.000.000 de regiões em todo o genoma com resoluções médias que variam entre 150 Kb e os 10 Kb, respectivamente. Consoante o objectivo do estudo assim é seleccionado o formato a utilizar, tendo em conta o número de regiões e resolução médias.

Em resumo, este estudo revelou que 5% dos pacientes apresentam deleções subteloméricas as quais são, certamente, a causa do atraso de desenvolvimento psicomotor e atraso de desenvolvimento observado. As alterações subteloméricas assumem um grande contributo na etiologia do atraso mental, tal como demonstrado por Fauth e colaboradores (2001). A técnica de MLPA revelou-se uma técnica válida e eficaz para estudo destes pacientes e a sua associação à técnica FISH provou ser uma forma efectiva de validação das alterações subteloméricas contribuindo de forma positiva para uma melhor compreensão da etiologia do atraso mental.

## **Agradecimentos**

Agradeço a toda a equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela colaboração e ajuda na execução de técnicas laboratoriais.

Agradeço à Professora Doutora Isabel Carreira que logo no primeiro ano de curso suscitou o meu interesse pela Biologia e pela Genética de forma entusiasta, e pela disponibilidade e incentivo à realização deste trabalho.

Agradeço ao José Alves Ferrão pela disponibilidade e orientação nas horas passadas no laboratório e pelos conhecimentos e experiência transmitidos. A sua orientação e todo o apoio prestado foram cruciais para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço ao meu irmão pela paciência com que leu as várias versões da tese e aos meus pais pelo apoio incondicional, carinho, compreensão, tolerância e encorajamento prestados, não só no meu percurso académico, como ao longo de toda a minha vida.

**Referências:**

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

Anderlid B., Schoumans J., Annerén G., Sahlén S., Kyllerman M., Vujic M., et al (2002). Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 107: 275-284.

Battaglia A., Carey J. (2003). Diagnostic Evaluation of Developmental Delay/Mental Retardation: An Overview. *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin Med Genet)* 117C:3 – 14.

Fauth C., Zhang H., Harabacz S., Brown J., Saracoglu K., Lederer G., et al (2001). A new strategy for the detection of subtelomeric rearrangements. *Human Genet* 109: 576-583.

Kirchhoff M., Gerdes T., Brunebjerg S., Bryndorf T. (2005). Investigation of patients with mental retardation and dysmorphic features using comparative genome hybridization and subtelomeric multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A* 15:139 (3), 231-233.

Koolen D. A., Nillesen W. M., Versteeg M. H. A., Merkx G. F. M., Knoers N. V. A. M., Kets M., et al (2004). Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 41: 892–899.

Mihçi E., Özcan M., Berker-Karaüzüm S., Keser İ., Taçoy Ş., Hapsolat Ş., et al (2009). Subtelomeric rearrangements of dysmorphic children with idiopathic mental retardation reveal 8 different chromosomal anomalies. *Turk J Pediatr* 51: 453-459.

Moeschler J. (2008). Genetic evaluation of Intellectual Disabilities. *Semin Pediatr Neurol* 15:2-9.

Monfort S., Orellana C., Oltra S., Roselló M., Guitart M., Martínez F. (2006). Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med* 147 (6): 295-300.

Moog U., Arens Y. H. J. M., van Lent-Albrechts J. C. M., Huijts P. E. A., Smeets E. E. J., Schrandt-Stumpel C. T. R. M., et al (2005). Subtelomeric chromosome aberrations: still a lot to learn. *Clin Genet* 68:397-407.

Palomares M., Delicado A., Lampunzina P., Arjona D., Amiñoso C., Arcas J., et al (2006). MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet* 69 (3): 228-33.

Park H., Kim H., Kim H., Han S., Kim Y., Kim S. (2008). Screening of Subtelomeric Rearrangements in 100 Korean Pediatric patients with unexplained Mental Retardation and Anomalies Using subtelomeric FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), *J Korean Med Sci* 23: 573-8

Phelan M. (2008). Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 3:14.

Ravnan J. B., Tepperberg J. H., Papenhausen P., Lamb A. N., Hedrick J., Eash D., et al (2006). Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the

frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478–489.

Rooms L., Reyniers E., Luijk R., Scheers S., Wauters J., Ceulemans B., et al (2004). Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat* 23: 17-23.

Scigliano S., Grégoire M. J., Schmitt M., Jonveaux P. H., LeHeup B. (2004). Terminal deletion of the long arm of the chromosome 10. *Clin Genet*: 65: 294–298.

Stegmann A. P. A., Jonker L. M. H., Engelen J. J. M. (2008). Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet* 51(2): 93-105.

Teyssier M., Charrin C., Dutruge J., Rousselle C. (1992). Monosomy 10qter: a new case. *Med Genet* 29: 342-343.

Vries B. B. A., White S. M., Knight S. J. L., Regan R., Homfray T., Young I. D., et al (2001). Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 38: 145-150.

Wu Y., Ji T., Wang J., Xiao J., Wang H., Li J., et al (2010). Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med Genet* 11; 11:72.

## Anexo I – Tabela de todos os resultados obtidos

<b>Idade (anos)</b>	<b>Informação clínica</b>	<b>Resultado</b>
<b>12</b>	ADPM + hipoactividade	<b>46,XY</b>
<b>5</b>	ADPM + dismorfismos	<b>46,XY</b>
<b>2</b>	ADPM grave + autismo	<b>46,XY</b>
<b>1</b>	Atraso mental materno + ADPM	<b>46, XX</b>
<b>2</b>	Macrocraneo + hipotonia + ADPM	<b>46, XX</b>
<b>3</b>	ADPM	<b>46,XX</b>
<b>7</b>	ADPM + estigmas neurocutâneos	<b>46,XX</b>
<b>7</b>	ADPM + hiperactividade	<b>46,XY</b>
<b>14</b>	ADPM + obesidade	<b>46,XX</b>
<b>0A + 1M</b>	RCIU + macrocraneo + hemiatrofia.  Peso actual: 600 g	<b>46,XX</b>
<b>6</b>	ADPM + Macrosomia	<b>46,XX</b>
<b>14</b>	Estudo de síndrome polimalformativo	<b>46,XY</b>
<b>1</b>	Microcefalia + fendas palatinas oblíquas para cima	<b>46,XY</b>
<b>24</b>	ADPM + baixa estatura	<b>46,XX</b>
<b>5</b>	ADPM + microcefalia	<b>46,XY</b>
<b>9</b>	ADPM + problemas de comportamento	<b>46,XX</b>
<b>0A + 1M</b>	Atrésia do esófago, fístula traqueo-esofágica, CIV subaórtica, rim esquerdo displásico, baço acessório.  Hipocalcémia neonatal. Aparentemente sem alterações vertebrais	<b>46,XX,del(11)(q24.2)dn.  mlpa  11qsubtel(p036,p070)x1.  ish del(11)(qter-)</b>
<b>17</b>	Atraso desenvolvimento grave	<b>46,XY</b>

<b>12</b>	ADPM + macrossomia	<b>46,XY</b>
<b>3</b>	ADPM + microcefalia	<b>46,XX</b>
<b>13</b>	Baixa estatura + déficit visual + ADPM	<b>46,XY</b>
<b>9</b>	Atraso mental grave + alterações do sono	<b>46,XY</b>
<b>3</b>	ADPM grave	<b>46,XX</b>
<b>6</b>	ADPM ligeiro + obesidade + macrossomia + problemas de comportamento	<b>46,XY</b>
<b>10</b>	ADPM	<b>46,XY</b>
<b>0A + 11M</b>	ADPM + hipotonia + pouca força muscular + estrabismo convergente + dismorfismos craneo- faciais	<b>46,XX</b>
<b>0A + 2M</b>	CIA + apêndice pré-auricular + rim multiquístico	<b>46,XY</b>
<b>7</b>	Dificuldade de aprendizagem + epilepsia + macrossomia + dismorfismos faciais	<b>46,XX</b>
<b>34</b>	Atraso mental + epilepsia	<b>46,XX</b>
<b>9</b>	ADPM	<b>46,XY</b>
<b>4</b>	ACIU + déficit cognitivo + características de autismo	<b>46,XY</b>
<b>9</b>	ADPM + epilepsia	<b>46,XY</b>
<b>8</b>	ADPM moderado + antecedentes familiares de atraso mental	<b>46,XY</b>
<b>6</b>	Déficit cognitivo com fâcies grosseiro + atraso mental em familiares do sexo masculino	<b>46,XY</b>
<b>6</b>	ADPM + microcefalia	<b>46,XX</b>
<b>2</b>	ADPM + fâcies peculiar + má progressão estato- ponderal	<b>46,XX</b>

<b>9</b>	Dificuldade moderada de aprendizagem + baixa estatura + obesidade	<b>46,XY</b>
<b>7</b>	ADPM + dismorfismo	<b>46,XY</b>
<b>8</b>	ADPM	<b>46,XX.mlpa 20psubtel(p036,p070)x1. ish del(20)(pter-)</b>
<b>0A + 4M</b>	Estudo de síndrome polimalformativa	<b>46,XY</b>
<b>5</b>	ADPM + cardiopatia + pé-boto	<b>46,XX</b>
<b>10</b>	Dificuldade de aprendizagem + alteração do comportamento + hipoplasia das asas do nariz	<b>46,XY</b>
<b>0A + 2M</b>	RCIU + CIA + má progressão ponderal	<b>46,XX</b>
<b>11</b>	Dificuldade de aprendizagem + macrocefalia relativa + obesidade	<b>46,XY</b>
<b>1</b>	Hipospádias + Perímetro cefálico P5 + dismorfismos faciais + criptorquidia	<b>46,XY</b>
<b>10</b>	Défice cognitivo moderado + dismorfismos faciais	<b>46,XX</b>
<b>14</b>	ADPM + baixa estatura	<b>46,XX</b>
<b>13</b>	ADPM familiar sem dismorfismos	<b>46,XY</b>
<b>1</b>	Atraso desenvolvimento + assimetria facial	<b>46,XY</b>
<b>4</b>	ADPM global	<b>46,XX</b>
<b>14</b>	Défice mental	<b>46,XY</b>
<b>4</b>	ADPM familiar	<b>46,XX</b>
<b>11</b>	Défice cognitivo + base nariz alargada + orelhas grandes	<b>46,XY</b>
<b>12</b>	Défice cognitivo + autismo	<b>46,XX</b>

<b>11</b>	ADPM grave + dismorfismo menor	<b>46,XY</b>
<b>2</b>	ADPM global + macrocrânio + fâcies grosseira	<b>46,XY</b>
<b>10</b>	Défice mental familiar	<b>46,XX</b>
<b>28</b>	ADPM grave + epilepsia	<b>46,XX</b>
<b>6</b>	ADPM + malformação cerebelosa + hipoacúsia	<b>46,XY</b>
<b>2</b>	Atraso desenvolvimento	<b>46,XX</b>
<b>13</b>	ADPM	<b>46,XX</b>
<b>13</b>	Défice cognitivo	<b>46,XY</b>
<b>15</b>	Deficiência mental + autismo + epilepsia	<b>46,XX</b>
<b>1</b>	ADPM + má progressão ponderal + infecções de repetição	<b>46,XY</b>
<b>5</b>	Défice cognitivo	<b>46,XY</b>
<b>9</b>	ADPM + macrocefalia + hipospádias + hipolaxidez articular	<b>46,XY</b>
<b>5</b>	ADPM + dismorfismos ligeiros	<b>46,XX</b>
<b>2</b>	ADPM + epilepsia + dismorfismos	<b>46,XY</b>
<b>12</b>	Dificuldade de aprendizagem	<b>46,XX</b>
<b>6</b>	Dificuldade de aprendizagem + défice da acuidade visual + imaturidade para a idade cronológica	<b>46,XX</b>
<b>10</b>	ADPM	<b>46,XY</b>
<b>4</b>	ADPM	<b>46,XX</b>
<b>10</b>	ADPM	<b>46,XY</b>
<b>8</b>	ADPM + dismorfismos + obesidade	<b>46,XX</b>
<b>8</b>	Dificuldade de linguagem e atraso de desenvolvimento	<b>46,XX</b>

<b>9</b>	ADPM + puberdade precoce	<b>46,XX</b>
<b>12</b>	ADPM	<b>46,XX</b>
<b>10</b>	RCIU + displasia cerebral	<b>46,XY</b>
<b>9</b>	ADPM + dismorfismo	<b>46,XY</b>
<b>6</b>	ADPM	<b>46,XX</b>
<b>17</b>	ADPM familiar	<b>46,XY</b>
<b>10</b>	Dificuldades de aprendizagem + déficit cognitivo	<b>46,XY</b>
<b>0A + 20d</b>	Estudo de síndrome polimalformativa	<b>46,XY</b>
<b>2</b>	RCIU + ADPM + microcefalia	<b>46,XY</b>
<b>7</b>	Déficit cognitivo + dificuldades de aprendizagem + história familiar positiva para déficit cognitivo	<b>46,XX.mlpa</b> <b>4psubtel(P036,P070)x1.</b> <b>ish</b> <b>del(4)(p16.3)(D4S3359-,</b> <b>WHSCR1+)</b>
<b>0A + 2M</b>	RCIU + agenesia do corpo caloso + hipospádias	<b>46,XY</b>
<b>10</b>	Déficit intelectual	<b>46,XX</b>
<b>8</b>	ADPM familiar	<b>46,XY</b>
<b>28</b>	Atraso mental idiopático	<b>46,XY</b>
<b>2</b>	ADPM	<b>46,XY</b>
<b>11</b>	ADPM pessoal e familiar	<b>46,XX</b>
<b>26</b>	ADPM	<b>46,XY</b>
<b>13</b>	Microcefalia + baixa estatura + hidronefrose + ADPM	<b>46,XY,del(10)(q26.2).</b> <b>mlpa</b> <b>10qsubtel(p036,p070)x1.</b> <b>ish</b>

		<b>del(10)(qter)(D10S2290-)</b> <b>dn</b>
<b>17</b>	ADPM	<b>46,XY</b>
<b>11</b>	Défice cognitivo + macrocefalia	<b>46,XX</b>
<b>0A + 6M</b>	Pregas palmares transversais + cardiopatia congénita	<b>46,XX</b>
<b>14</b>	ADPM	<b>46,XY</b>
<b>22</b>	Atraso mental e alterações de comportamento	<b>46,XY.mlpa</b> <b>22qsubtel(p036,p070)x1,</b> <b>ish</b> <b>del(22)(q13.3)(N85A3-)</b> <b>dn</b>
<b>0A + 1M</b>	ADPM + dismorfismo + má progressão estato-ponderal + microcefalia	<b>46,XX</b>
<b>6</b>	ADPM + macrocefalia + dismorfismo	<b>46,XY</b>

Legenda: ADPM – atraso de desenvolvimento psicomotor; RCIU – restrição crescimento intra-uterina; CIV – comunicação inter-ventricular; CIA – Comunicação inter-auricular