

# MEPI

MESTRADO EM  
EPIDEMIOLOGIA

UNIVERSIDADE DO PORTO  
FACULDADE DE MEDICINA

Márcia de Pinho Martins

## **Regiões Subteloméricas dos Cromossomas: Os Finais (quase) Perfeitos.**

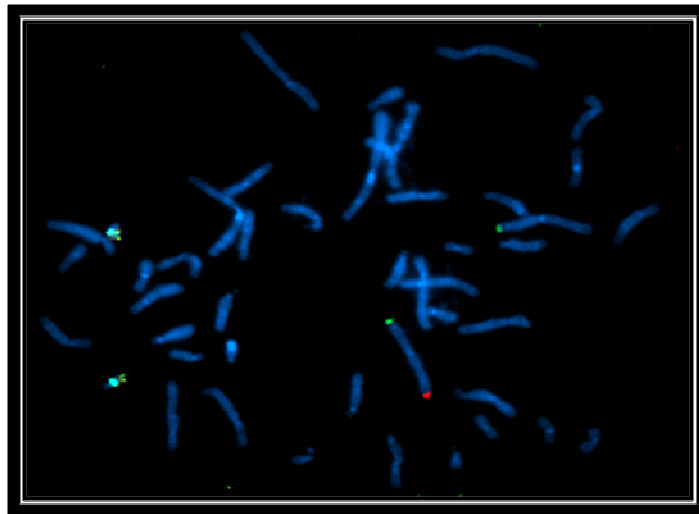
Porto, Fevereiro de 2010

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Epidemiologia, realizada sob orientação científica da Mestre Rosário Pinto Leite e co-orientação da Professora Doutora Teresa Rodrigues.


**Regiões subteloméricas dos cromossomas:**

**“Os Finais (quase) Perfeitos”**

**Detecção de Rearranjos Subteloméricos pela técnica FISH em doentes com atraso mental idiopático**



**U. PORTO**  
FMUP FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

 Centro Hospitalar de  
Trás-os-Montes e Alto Douro. E.P.E.

**Marcia de Pinho Martins**

**Porto, Fevereiro de 2010**

## **O Júri**

**Presidente**

**Doutor José Henrique Dias Pinto de Barros**  
professor catedrático da Faculdade de Medicina Universidade do Porto

**Doutor Jorge Manuel Tavares Lopes Saraiva de Andrade**  
professor catedrático convidado da Faculdade de Medicina  
da Universidade de Coimbra

**Doutora Teresa Maria Alves Rodrigues**  
professora auxiliar convidada da Faculdade de Medicina  
da Universidade do Porto

**Mestre Rosário Pinto Leite**  
responsável do Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética  
do CHTMAD

## Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível pela ajuda e generosidade de muitos, pelo que deixo aqui o meu reconhecimento a todos os que contribuíram para a sua concretização.

Ao Professor Doutor Henrique de Barros e todo pessoal do Serviço de Higiene e Epidemiologia, agradeço a oportunidade e apoio na realização do mestrado.

À Dr<sup>a</sup> Rosário Pinto Leite, expresso a minha gratidão por todo apoio, orientação e disponibilidade. O seu conhecimento, espírito crítico e amizade estão presentes em todo o trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Teresa Rodrigues gostaria de agradecer o apoio e a confiança.

À Dr<sup>a</sup> Eufémia Ribeiro, agradeço pelo desenvolvimento do projecto do serviço de genética em Trás-os-Montes, sem o qual este trabalho não seria possível. Agradeço ainda a amizade, incentivo e dinamismo que sempre demonstrou.

À Dr<sup>a</sup> Maria Luís Cardoso, gostaria de agradecer pela sua amizade, disponibilidade, e pela revisão crítica do trabalho.

À Paula Machado agradeço pela amizade e ajuda nos aspectos informáticos.

À Dr<sup>a</sup> Marta Souto e ao Dr. Pedro Botelho agradeço a atenção e o trabalho realizado na execução deste estudo.

A todos os colegas da região de Trás-os-Montes que referenciaram os doentes, em especial do hospital de Vila Real, muito obrigada pela colaboração e confiança.

De forma muito especial expresso a minha gratidão aos doentes e suas famílias que, com coragem, lutam contra as dificuldades do dia a dia de uma criança com necessidades especiais, enquanto pacientemente continuam a aguardar um diagnóstico etiológico.

Este Projecto foi possível devido ao Prémio de Investigação concedido pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde.

## Resumo

O défice cognitivo (DC) afecta 1 a 3% da população geral e está associado a inúmeras causas, incluindo factores ambientais, anomalias cromossómicas e doenças monogénicas. Actualmente a etiologia ainda permanece desconhecida num número significativo de doentes, podendo atingir 50% nalgumas séries. As anomalias cromossómicas são a causa mais frequente de défice cognitivo e os rearranjos nas regiões subteloméricas, ricas em genes, são uma das principais causas de anomalias congénitas múltiplas e atraso mental, sendo detectados em 5% destes doentes.

Os rearranjos subteloméricos são indetectáveis pelas técnicas convencionais de bandagem cromossómica, quer pelo seu tamanho submicroscópico quer pela similaridade dos segmentos envolvidos. Vários métodos têm vindo a ser desenvolvidos nos últimos anos para aumentar a taxa de detecção de anomalias cromossómicas subtis. Baseados em técnicas de *FISH* (hibridação fluorescente *in situ*), *PCR* (reacção da polimerase em cadeia) e, mais recentemente, em *microarrays*, os estudos que inicialmente eram dirigidos às regiões subteloméricas, rapidamente se desenvolveram de modo a abranger a totalidade do genoma.

Diversos trabalhos publicados atestam a utilidade dos exames de citogenética molecular no estudo destes doentes, começando agora a serem elucidados os mecanismos envolvidos na formação de rearranjos subteloméricos.

O presente trabalho teve como principal objectivo estudar doentes com atraso mental idiopático, associado a características dismórficas e/ou malformações congénitas e/ou história familiar de atraso mental, na população de Trás-os-Montes, por técnica *FISH*. Foram estudados doentes que frequentam a consulta de Genética do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, com DC de causa não determinada que, tendo sido submetidos a todas as análises genéticas protocoladas na investigação de um atraso mental (cariótipo com bandas GTG de alta resolução, estudo molecular X-frágil e, em alguns casos, estudo metabólico, imagiologia cerebral e outros), permaneciam sem diagnóstico etiológico. A maioria foi seleccionada com base na *checklist* publicada por De Vries.

O grupo em estudo incluiu 97 doentes, 61 do sexo masculino e 36 do sexo feminino e a idade dos doentes à data de diagnóstico variou entre 0.1 - 62.3 anos.

Todos os doentes apresentavam DC classificado como ligeiro em 33 casos, moderado em 53 casos, grave em dez casos e profundo num. Existia história familiar de

DC/anomalias em cerca de 70% dos casos (68/91) e 86 doentes eram portadores de duas ou mais dismorfias (88%). Em 60 havia história de atraso de crescimento pré e/ou pós natal (62%).

Em seis doentes foram identificadas anomalias cromossómicas crípticas (6,19%), 4 de novo (3 deleções - 19p, 2p e 4q e uma duplicação 4p) e 2 casos familiares (deleção 3p e deleção 3q). A distribuição do *score* destes doentes (na *checklist*) foi a seguinte: 7 - um caso, 5 - um caso, 4 - dois dos casos e 3 - dois casos.

Foi efectuada comparação estatística entre o subgrupo de portadores de rearranjos subteloméricos (3 do sexo masculino e 3 do feminino) e os restantes 91 com estudo normal (58 do sexo masculino e 33) que funcionou, para este efeito, como grupo controle.

Observou-se uma maior percentagem de casos com história familiar positiva de atraso mental no grupo de portadores de rearranjos subteloméricos (n=5; 83.3%), comparativamente ao grupo controle (n=63; 69.2%). Contudo, a análise estatística inferencial não permite afirmar que a incidência de história familiar de atraso mental seja um factor determinante.

No grupo de portadores de rearranjos subteloméricos não se encontraram casos de atraso mental grave ou profundo, verificaram-se 4 (66.7%) casos de atraso mental moderado e 2 (33.3%) de atraso mental ligeiro.

Numerosos estudos demonstram que desequilíbrios genómicos nas regiões subteloméricas contribuem significativamente para o DC/anomalias congénitas. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura e permitem-nos concluir que o rastreio anomalias subteloméricas por FISH melhora a capacidade diagnóstica quando uma deleção terminal citogenética é a responsável pelo fenótipo. Além disso, o diagnóstico de um rearranjo subtelomérico tem um impacto imediato sobre o aconselhamento genético, particularmente no caso dos rearranjos familiares. Esta continuará a ser uma ferramenta útil, até o cariótipo molecular tornar-se corrente e financeiramente viável na prática clínica.

## **Abstract**

Mental retardation (MR) affects between 1 to 3% of the general population and is associated with several causes including environmental factors, chromosomal abnormalities and monogenic diseases. The underlying cause remains unknown in up to 50% of patients. Chromosomal abnormalities are the most common known cause of mental retardation and rearrangements in the gene rich subtelomeric regions, are a major cause of multiple congenital anomalies and mental retardation, detected in 5% of these patients.

Subtelomeric rearrangements are undetectable by conventional techniques of chromosome banding, due to submicroscopic size or the similarity of the segments involved. Several methods based on FISH (fluorescent *in situ* hybridization), PCR (polymerase chain reaction) and array techniques have been developed over recent years to increase detection rate of subtle aneusomies. Initially targeted to the gene rich subtelomeric regions and currently and rapidly becoming genome wide.

Many studies in the literature confirmed the utility of molecular-cytogenetic screening in patients with MR/MCM and the mechanisms involved in the formation of subtelomeric rearrangements are now beginning to be elucidated.

The objective of this work was to study patients with idiopathic mental retardation associated with dysmorphic features and/or birth defects and/or family history of mental retardation from Trás-os-Montes region of Portugal, using FISH methodology. We studied patients referred to Genetics Outpatient Clinics of Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, with idiopathic mental retardation, with or without positive family history and with or without congenital abnormalities. All patients had previous normal investigation including normal 550 band karyotype and fragile X molecular testing in all cases, as well as metabolic testing, neuroimaging and other studies in particular cases. The patient selection was based in De Vries checklist.

Ninety seven patients, 61 males and 36 females, aged 0.1 to 62.3 years were recruited. All of them presented mental retardation classified as mild in 33 cases, moderate in 53, severe in 10 and profound in one case. There was family history of mental retardation in 70% of the cases (68/91). Eighty six patients presented at least 2 dysmorphisms at physical examination. In 60 cases there was also report of prenatal and/or post natal growth restriction (62%).

Six cryptic chromosomal anomalies have been identified in the cohort (6,19%), 3 *de novo* deletions (19p, 2p e 4q) and one *de novo* duplication (4p) and two familial cases (one deletion 3p and one 3q). These patients scored as follows in the checklist: 7 - one case, 5 - one case, 4 - two cases and 3 - two cases.

Statistic comparative studies were performed between the subgroup with cryptic anomalies (3 males and 3 females) and the remaining 91 patients (58 males and 33 females) considered as control group for this purpose.

There was a higher percentage of cases with positive family history of mental retardation in the group with cryptic chromosomal abnormalities (n=5; 83.3%), compared to the control group (n=63; 69.2%). However, inferential statistical analysis did not show that the incidence of family history of mental retardation was an important factor. Four patients with subtelomeric anomalies (66.7%) presented moderate mental retardation and two (33.3%) showed mild mental retardation.

As many studies demonstrated, genomic imbalances at subtelomeric regions contribute significantly to mental retardation/congenital anomalies. Our results are in agreement with the literature and allowed us to conclude that, screening subtelomeric anomalies by FISH improves the diagnostic ability when a terminal deletion is responsible for the phenotype. Subtelomeric screening by FISH enhances diagnostic yield when a cytogenetic terminal deletion is found. Furthermore, the diagnosis of a subtelomeric rearrangement has an immediate impact on genetic counseling, particularly in the case of familial rearrangements.

We share the conviction that FISH is still a very useful screening tool until molecular karyotyping becomes current and financially feasible in the clinical practice.

<b>Índice</b>	<b>Pág</b>
I - Introdução .....	1
II - Aspectos Clínicos do défice cognitivo .....	1
2.1 Definição .....	1
2.2 Epidemiologia .....	2
2.3 Investigação em crianças com DC .....	5
III - A Citogenética no estudo do défice cognitivo .....	5
3.1 Breve história da citogenética .....	5
3.2 Identificação de síndromes por microdelecção .....	8
IV - Regiões Subteloméricas: os finais (nem sempre) perfeitos .....	10
4.1 Estrutura e Função .....	10
4.2 Importância das regiões subteloméricas no DC .....	12
4.3 Vantagens e limitações da Técnica FISH com sondas subteloméricas. Técnicas alternativas .....	16
V - Projecto de Investigação .....	18
5.1 Motivos do estudo .....	18
5.2 Doentes e Métodos .....	19
VI - Resultados e Discussão .....	20
6.1 Resultados gerais .....	20
6.2 Análise estatística .....	22
6.3 Descrição dos casos clínicos positivos .....	29
6.4 Discussão final .....	42
VII – Conclusões .....	43
VIII - Perspectivas Futuras .....	45
IX - Bibliografia .....	46
X - Anexos .....	55

## Índice de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Nome</b>	<b>Página</b>
1	Cariótipo. (a) bandas GTG de alta resolução; (b) <i>multicolor FISH</i>	7
2	Princípios técnicos da técnica de <i>CGH array</i>	8
3	Esquema da organização dos telómeros e dos domínios subteloméricos	11
4	Estrutura Telomérica dos Cromossomas Humanos	12
5	Área de cobertura do Serviço de Genética do CHTMAD	18
6	Distribuição percentual do resultado do estudo	22
7	Distribuição percentual da incidência de história familiar de atraso mental pelos dois grupos em estudo	24
8	Distribuição percentual do tipo de atraso mental pelos dois grupos em estudo	25
9	Distribuição percentual das variáveis da <i>checklist</i> S1 (A), S2 (B), S3 (C), S4 (D) e S5 (E) pelos grupos em estudo	26
10	Distribuição percentual do resultado da <i>checklist</i> pelos grupos em estudo	27
11	Cariótipo com bandas GTG. A seta assinala a del3q	30
12	Metafase parcial com sondas subteloméricas para o cromossoma 3	30
13	<i>CGH Array</i> - cromossoma 3 com deleção na banda q29	31
14	Cariótipo normal com bandas GTG. O aro assinala os cromossomas 19	33
15	Metafase com sondas subteloméricas para os cromossomas 19	33
16	a) Cariótipo com um der(12) com bandas GTG. b) Zona do ramo curto do cromossoma 12- p13.31	35
17	Metafase parcial com sondas subteloméricas para os cromossomas 4	35
18	a) Cariótipo com inv(2), bandas GTG. b) Par do cromossoma 2	37
19	Metafase com sondas subteloméricas para os cromossomas 2	37
20	Metafase com bandas GTG	39
21	Metafase parcial com sondas subteloméricas para os cromossomas 4	39
22	(a) Cariótipo com bandas GTG. (b) Metafase parcial com sondas subteloméricas para o cromossoma 3	40

## Índice de quadros

<b>Quadro</b>	<b>Nome</b>	<b>Página</b>
1	Classificação do atraso mental com base na DSM IV	2
2	Factores responsáveis pelo DC	3
3	<i>Checklist</i> de De Vries para doentes com rearranjos subteloméricos	15
4	Comparação entre os dois grupos no que respeita às idades dos doentes e às idades das respectivas mães	24
5	Escolaridade da mãe do doente por grupo	24
6	Distribuição percentual dos resultados da <i>checklist</i> pelos dois grupos em estudo	28
7	Sensibilidade e especificidade da <i>checklist</i> para diferentes <i>cut-off</i>	28

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	- ácido desoxirribonucleico
<b>ADPM</b>	- atraso global do desenvolvimento psicomotor
<b>AIG</b>	- adequado à idade gestacional
<b>AM</b>	- atraso mental
<b>BAR</b>	- bandas de alta resolução
<b>CGH array</b>	- <i>array comparative genomic hybridization</i>
<b>CHTMAD</b>	- Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro
<b>CNVs</b>	- <i>copy number variants</i>
<b>Cp</b>	- comprimento
<b>DC</b>	- défice cognitivo
<b>DSM IV</b>	- <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
<b>EASV</b>	- estenose aórtica supra-avalvular
<b>EP</b>	- estatura ponderal
<b>FISH</b>	- <i>Fluorescent in situ hybridization</i>
<b>HIS</b>	- <i>Isotopic in situ hybridization</i>
<b>Kb</b>	- kilobases
<b>LCRs</b>	- <i>low copy repeats</i>
<b>Mb</b>	- megabases
<b>M-FISH</b>	- Multiprobe <i>FISH</i>
<b>MLPA</b>	- <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
<b>P25, 75,95</b>	- percentis de crescimento
<b>PCef</b>	- perímetro cefálico
<b>PCR</b>	- <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PN</b>	- peso ao nascimento
<b>PNN</b>	- período neonatal
<b>QI</b>	- coeficiente de inteligência
<b>RNA</b>	- ácido ribonucleico
<b>R- FISH</b>	- <i>Reverse FISH</i>
<b>SNC</b>	- sistema nervoso central

## **I - INTRODUÇÃO**

O atraso mental (AM) ou défice cognitivo (DC), é uma encefalopatia estática de múltiplas etiologias, com manifestação variável e heterogénea, com uma prevalência estimada de 2 a 3 %. Apesar dos recentes progressos na investigação do DC, especialmente das suas causas genéticas, em cerca de 40-50% dos casos continua a ser classificado como idiopático. Constitui assim um importante problema em Saúde Pública, quer pela sua prevalência, quer pela necessidade de cuidados especiais que acarreta. A correcta orientação destas crianças implica um diagnóstico e intervenção precoces, bem como o acesso a cuidados de saúde e recursos educacionais adequados.

## **II - ASPECTOS CLÍNICOS DO DÉFICE COGNITIVO**

### **2.1 Definição**

Define-se DC como um estado de funcionamento intelectual caracterizado por limitações na inteligência e capacidades adaptativas, com início na infância. (*Definition of Intellectual Disability, at: [www.aamr.org](http://www.aamr.org)*). A classificação mais utilizada é a da DSM IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Ed*), a qual se encontra resumida no quadro 1.

Em crianças com idade inferior a 5 anos a avaliação do QI é difícil e por conseguinte pouco fiável pelo que, perante défices significativos nas capacidades de aprendizagem e adaptativas, são classificadas como afectadas de “atraso global do desenvolvimento psicomotor” (ADPM). Define-se ADPM como um desempenho pelo menos 2 desvios-padrão abaixo da média, avaliado por critérios normalizados adaptados à idade, em pelo menos duas das subescalas de desenvolvimento: motricidade (grosseira/fina), linguagem, conhecimento, pessoal-social, capacidade nas tarefas diárias (Shevell *et al*, 2003; Pivalizza and Miller, 2009). As duas designações não são intermutáveis, isto é uma criança com atraso global não evoluirá necessariamente para um défice cognitivo.

## **DSM IV**

O atraso mental define-se por 3 critérios:

Funcionamento intelectual significativamente abaixo da média

Limitações significativas nas capacidades adaptativas

Início antes dos 18 anos de idade

A gravidade do atraso é definida pelo grau de desvio do QI abaixo de 100 (média estimada da população), sendo considerado o limite inferior 2 desvios-padrão abaixo da média, ou seja um QI de 70:

Ligeiro - 50-55 a 70

Moderado - de 35-40 a 50-55

Grave - de 20-25 a 35-40

Profundo - < 20 a 25

Não especificado – não testado mas presumidamente <70

**Quadro 1** - Classificação do atraso mental com base na DSM IV (adaptado de *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed, Text Revision, American Psychiatric Association, 2000*)

## **2.2 Epidemiologia**

O DC é uma doença crónica com importância familiar e sócio económica, já que afecta 2 a 3 % da população geral. Constitui um dos motivos mais frequentes de referência à Consulta de Genética Médica (Schaefer e Bodensteiner, 1992)

A prevalência de DC varia nos diferentes estudos de acordo com o desenho do mesmo, abordagem diagnóstica, gravidade e características populacionais, sendo maior na idade escolar e no sexo masculino. Se o diagnóstico é baseado apenas no QI a prevalência é de 3%. Em crianças com menos de 5 anos a prevalência de ADPM global é igualmente de 2-3% (Szymanski e King, 1999; Leonard e Wen, 2002).

As causas de DC são múltiplas, de natureza multifactorial, com uma componente hereditária importante e influência de factores ambientais. É por isso difícil e, em muitos casos ainda impossível, a sua identificação. No entanto, a identificação de uma causa permite o correcto aconselhamento genético, intervenções dirigidas, terapias e vigilâncias adequadas, antecipação de possíveis complicações médicas e comportamentais e definição de um prognóstico mais específico. As causas genéticas podem ter implicações

reprodutivas para os progenitores das crianças afectadas e para a família mais alargada.

Em Portugal, tal como em países de Ásia, Africa e América Latina, a falta de estudos epidemiológicos básicos impede a correcta caracterização da população com DC e é uma importante barreira ao desenvolvimento de políticas de saúde e sociais adequadas (Njenga 2009; Jeevanandam 2009; Mercadante *et al*, 2009).

A maioria dos indivíduos com atraso mental (cerca de 80 a 85% dos afectados), apresenta um QI entre os 50-70 (atraso mental ligeiro/ moderado), enquanto que cerca de 10% tem um QI inferior a 50 (atraso mental grave/profundo).

A distribuição das causas de atraso mental está relacionada com a gravidade do mesmo. Assim, os atrasos graves (QI < 50) são causados em cerca de 30-40% dos casos por doenças monogénicas ou cromossómicas, 10-30% por factores ambientais e os restantes 30-40% continuam a ter etiologia desconhecida.

Nos casos de atraso mental ligeiro/moderado apenas 15% são de causa genética, 15% de causa ambiental sendo a maioria, cerca de 70%, de etiologia desconhecida (Schaefer e Bodensteiner,1999; Joyce *et al*, 2002) (Quadro 2).

#### **Causas de DC**

- 1 - Alterações genéticas monogénicas;
- 2 - Anomalias cromossómicas;
- 3 - Agentes externos (traumatismos de parto, infecções; agentes químicos teratogénicos, etc);
- 4 - Multifactorial (combinação de vários dos factores anteriores);
- 5 - Indeterminado

#### **Quadro 2** - Factores responsáveis pelo DC

Estes dados são corroborados por trabalhos epidemiológicos que demonstram que o atraso mental grave é independente da origem, distribuição geográfica ou grupo socio-económico e que está frequentemente associado a anomalias. O atraso mental ligeiro/moderado é mais comum nos grupos sócio-

económicos mais baixos. Por exemplo, o risco de DC ligeiro em filhos de mães com menos de 12 anos de escolaridade é 7 vezes superior ao das mães com educação superior e 3 vezes superior ao das que possuem um curso intermédio. Está ainda ligeiramente aumentado em mães jovens com idades compreendidas entre os 15 e 19 anos enquanto o risco de DC severo a moderado é maior nas maternidades tardias entre os 40 e 44 anos (Schaefer e Bodensteine,1992; Chapman *et al*, 2002 )

Outro factor importante na identificação das causas de DC é a fase em que ocorreu o insulto (pré-natal, perinatal e pós-natal). Algumas destas causas, como as toxinas ambientais ou doenças endócrinas podem actuar em múltiplas fases. Outras, como os problemas genéticos, têm manifestações diferentes durante o desenvolvimento pós-natal.

Nos casos de etiologia conhecida as causas pré-natais são responsáveis pela maioria dos casos, independentemente da gravidade e a maioria são anomalias genéticas. No entanto, a distribuição causal varia com a gravidade fenotípica. A título de exemplo refiro um estudo de base populacional extenso efectuado na Noruega entre 1980-85 (Stromme e Valvatne, 1998) em que em 30 037 nascimentos, foram identificadas 185 crianças com DC, com uma prevalência de 6.2/1000. Nas 178 crianças com DC moderado/grave observou-se a seguinte distribuição em termos de etiologia:

- pré-natal – 70 % dos casos graves e 51% dos casos moderados
- perinatal – 4 e 5%
- pós natal – 5 e 1%
- indeterminado – 18 e 11%

Actualmente, ainda há muitos casos de DC (2/3 em alguns estudos), em que não é possível determinar uma etiologia, mesmo após extensa investigação, ficando rotulados como “idiopáticos”. Daí a importância de se continuar a investir neste tipo de estudos.

### **2.3 Investigação em crianças com DC**

Todas as crianças com DC devem ter acesso à melhor avaliação diagnóstica disponível com o objectivo de melhorar a sua saúde e bem estar físico a nível individual e familiar (Moeschler, 2008 e 2009).

A investigação a ser efectuada nestas crianças deve basear-se nas anomalias identificadas na história familiar e no exame físico (Szymanski e King, 1999; Shevell *et al*, 2003; Battaglia *et al*, 2003; Pivalizza e Miller 2009). Cerca de 4% das crianças com DC/ADPM têm anomalias cromossómicas detectáveis em citogenética convencional, mesmo na ausência de características dismórficas (embora os resultados positivos sejam mais prováveis se estas estão presentes), pelo que o estudo citogenético é fundamental. Assim, o cariótipo com bandas de alta resolução (BAR), deve ser um exame de rotina nestas crianças pois permite excluir a grande maioria das anomalias cromossómicas, inclusivamente algumas subteloméricas (Moeschler e Shevell, 2006; Rauch *et al*, 2006). Nalguns casos estão indicados estudos como a análise molecular de X-Frágil, metabólicos e imagiologia do SNC, entre outros.

## **III - A CITOGÉNÉTICA NO ESTUDO DO DÉFICE COGNITIVO**

### **3.1 Breve história da citogenética**

A citogenética, como uma área especializada da genética, é uma ciência que estuda a estrutura, patologia, função e comportamento dos cromossomas.

Em 1956, Tijo e Levan puseram fim a uma discussão académica de mais de 30 anos ao determinarem 46 como o número correcto de cromossomas humanos. Este trabalho foi realizado em culturas humanas de células embrionárias e rapidamente confirmado em material testicular por Ford e Hamerton no mesmo ano. Nessa altura foi utilizada a 1ª técnica de coloração por orceína que não permitia individualizar os cromossomas sendo estes corados homogeneamente. A trissomia 21 descrita por Lejeune e colegas em 1959 foi a primeira anomalia cromossómica associada a um síndrome, descrito

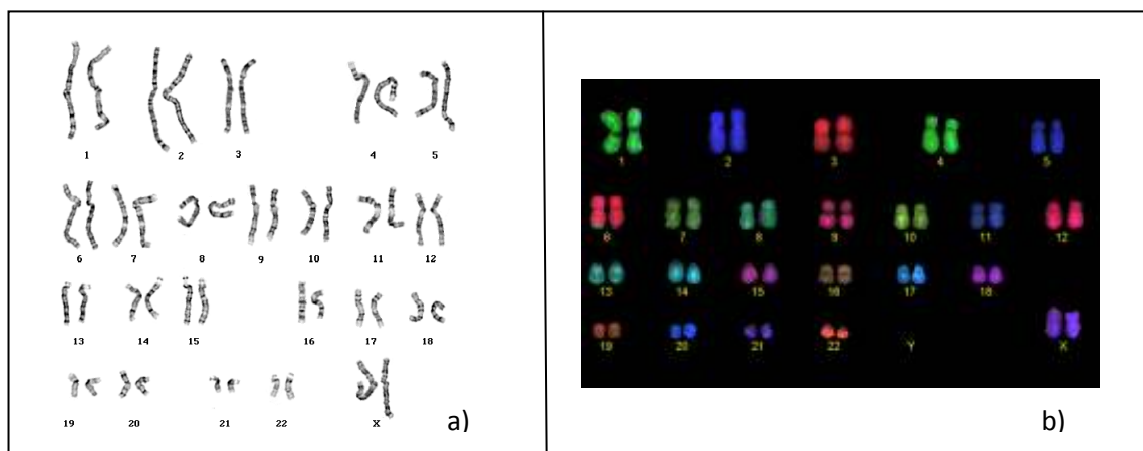
70 anos antes - o Síndrome de Down. O conhecimento de várias anomalias cromossômicas (nomeadamente, o Síndrome de Turner, o Síndrome de Klinefelter e o cromossoma Filadélfia na leucemia mielóide crónica), bem como o desenvolvimento de técnicas de cultura de linfócitos e sua manipulação até observação de cromossomas, proporcionou, nos anos 60, o desenvolvimento de uma nova ciência, a Citogenética Clínica (Lawce e Brown,1997; Rooney e Czepulkowski, 1986; Verma e Babu,1995).

Em 1970 foi publicado o primeiro cariótipo humano com bandas. Nos anos seguintes surgiu uma “explosão” de novas técnicas de bandagem o que permitiu além da classificação dos cromossomas por tamanho e localização de bandas, a identificação dos locais de quebra nas translocações. Yunis, em 1976 e Uta Franke em 1978 introduziram as técnicas de bandagem de cromossomas em prometáfase (cromossomas em alta resolução), permitindo um nível de detecção de anomalias muito superior. A cifra de 200 a 300 bandas até então usada, aumenta 3 a 7 vezes obtendo-se um nível de 2000 bandas que permite detectar rearranjos muito subtis, até então inimagináveis (Figura 1a). Com estas técnicas foi possível a identificação de microdelecções em determinadas patologias, nomeadamente em tumores sólidos, como o Tumor de Wilms, no retinoblastoma e no Síndrome Prader-Willi (Brown e Lawce,1997; Priest,1997; Rooney e Czepulkowski,1997; Tamarin, 2002).

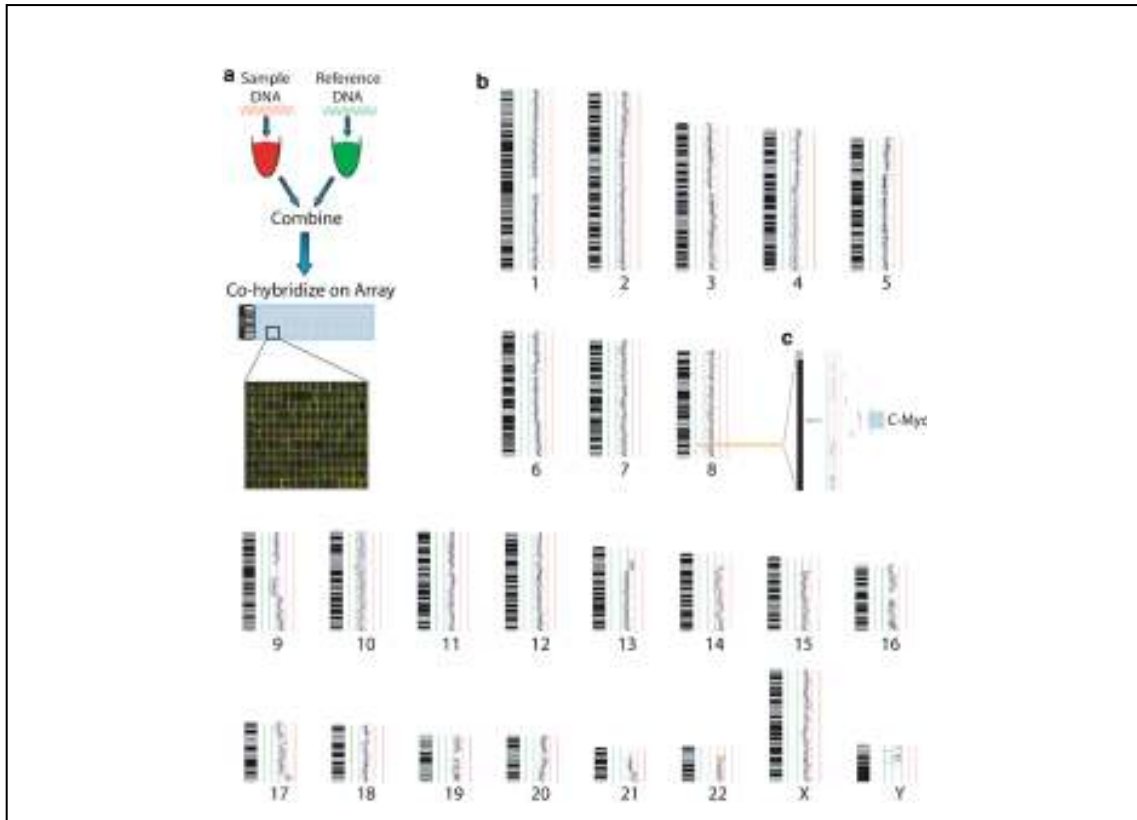
Nos anos 80 os avanços na área da genética molecular abriram novas perspectivas. A hibridização de sondas de ADN radioactivas, hibridização *in situ* isotópica (HIS), com sequências repetitivas de cromossomas de rato e *Drosophila*, começaram a ser usadas em 1969 por Gall e Pardue. Esta técnica evoluiu para a hibridização *in situ* não-isotópica (FISH), a qual tem diversas vantagens relativamente à autorradiografia, incluindo rapidez, segurança (por não utilizar materiais radioactivos) e resolução do sinal. Actualmente a combinação das técnicas da citogenética convencional com a biologia molecular, levou ao aparecimento da Citogenética Molecular, uma vez que utiliza sondas de ADN ou ARN, marcadas com fluorocromos, que contêm porções complementares e específicas da sequência a estudar. As sondas utilizadas podem ser de sequência única, para as zonas subteloméricas dos cromossomas, para as zonas alfa-satélite dos cromossomas ou para todo o cromossoma (Lichter e Ward ,1990; Trask, 1991; Kearney e Buckle, 2001).

Na última década várias técnicas baseadas no FISH (R-FISH, M-FISH) (Figura 1b) têm permitido a identificação de fragmentos cromossômicos, a detecção de sequência específicas de ADN em núcleos em interfase, a classificação de rearranjos subtis não detectados pela citogenética convencional (Wilkie 1993; Verma e Babu, 1995; Montgomery *et al*, 1997; Knight e Flint, 2000; Xu e Chen 2003).

O recente desenvolvimento da técnica de microarrays que permite uma análise global do genoma, parece delinear uma técnica de eleição no futuro. (Shaffer *et al*, 2007) (Figura 2).



**Figura 1** - Cariótipo. (a) bandas GTG de alta resolução; (b) multicolor FISH (adaptado catálogo Vysis)



**Figura 2** - Princípios técnicos da técnica de “array CGH”. (a) A amostra e o ADN de referência são marcados com fluorocromos diferentes (cyanine-3 e cyanine-5). Após combinados, co-hibridizam com o microarray que contém poços com o material genómico. Há uma competição entre a amostra e o ADN de referência nos poços, resultando em diferentes graus de fluorescência que são indicativos da quantidade relativa. (b) Idiograma do genoma total de uma linha celular de cancro do pulmão hibridizado no array com um ADN de referência masculino normal. Reproduzido de: William W Lockwood, Raj Chari, Bryan Chi, and Wan L Lam. (2006) Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *European Journal of Human Genetics* 14, 139–148.

### 3.2 Identificação de síndromes por microdelecção

A identificação de muitos dos síndromes por microdelecção actualmente conhecidos foi estabelecida pela observação de uma delecção, visível pela citogenética convencional, numa coorte de indivíduos com fenótipo sobreponível. As características clínicas típicas estavam já bem definidas, mas a etiologia molecular continuou desconhecida até à descoberta sua base citogenética. Um exemplo bem conhecido é a identificação da delecção 15q12 no síndrome de Prader-Willi (Ledbetter *et al*, 1981). Com a descrição da associação entre a delecção e o fenótipo específico, a revisão de um grande número de doentes permitiu estabelecer a frequência desta delecção em 70%

dos casos (Ledbetter *et al*,1982; Butler *et al*,1986). Os restantes doentes têm dissomia uniparental do cromossoma 15 (Nicholls *et al*, 1989) ou, mais raramente, mutações de *imprinting* (Buiting *et al*, 1998) .

Por vezes, a descrição na literatura de um único caso por si só levou à identificação de um novo síndrome de microdelecção, como sucedeu em 1993 num doente com acrocefalosindactilia, em que ocorreu uma delecção 11p11.2 como resultado de uma inserção entre os cromossomas 11 e 13 familiar (Shaffer *et al*, 1993). As características fenotípicas desde doente eram sobreponíveis às de um doente descrito por Lorenz em 1990 (Lorenz *et al*, 1990). Após a identificação de mais doentes com a delecção 11p11.2 (Bartsch *et al*,1996; Potocki e Shaffer, 1996) e da caracterização molecular mais precisa do doente descrito por Lorenz, confirmou-se que a delecção era responsável pelo conjunto de características fenotípicas descritas estabelecendo-se um novo síndrome por microdelecção.

Em outros casos a microdelecção foi detectada após a identificação inicial de uma translocação, como no caso da delecção 22q11.1 de que se suspeitou em doentes com síndrome de DiGeorge com translocações desequilibradas envolvendo 22q (de La Chapelle *et al*,1981; Kelley *et al*,1982) Análises posteriores com bandas-G de alta resolução e FISH numa grande coorte de doentes demonstrou que mais de 95% deles têm a delecção 22q11.1 (Carey *et al*,1992; Driscoll *et al*, 1992).

Noutros casos os síndromes de microdelecção foram detectados pela observação de segregação de translocações equilibradas associada a características clínicas específicas, de que é exemplo o síndrome de Williams. Este síndrome caracteriza-se por facies típico e, entre outros problemas, estenose aórtica supra-avalvular (EASV). Em 1993 foi descrita uma família com EASV que segregava uma translocação equilibrada entre os cromossomas 6 e 7 (Curran *et al*,1993). O ponto de quebra no cromossoma 7 causava disrupção do gene da elastina localizado em 7q11.23. Investigações posteriores comprovaram microdelecções 7q11.23 em mais de 90% dos doentes com síndrome de Williams (Ewart *et al*,1993; Lowery *et al*,1995; Nickerson *et al*, 1995).

Presentemente a estratégia de estudo de doentes com DC/anomalias envolve um rastreio citogenético molecular mais alargado, procurando identificar novas microdelecções e só depois estabelecer um padrão de

recorrência. Neste modelo de abordagem, o conhecimento das características clínicas dos doentes à priori encontra-se desvalorizado. Esta abordagem pode ser indirecta, sem foco em nenhuma região particular do genoma ou estudando regiões que se sabe estarem frequentemente envolvidas em rearranjos citogenéticos. Ou, mais dirigida, seleccionando segmentos particulares do genoma, como os flanqueados por repetições de pequeno número de cópias - *low copy repeats* (LCRs). No primeiro caso, uma das primeiras abordagens desenvolvidas foi a técnica de FISH com conjunto de sondas para as regiões subtelo méricas dos cromossomas, usada no rastreio de numerosos doentes com atraso mental idiopático, bem como no presente estudo (Knight *et al* 2004; Roberts *et al* 2004; Rodriguez-Revengea *et al* 2004; Yu *et al* 2005; Pinto *et al* 2006; Sogaard *et al* 2005; Rodríguez *et al* 2008; Hyun-Kyung *et al* 2008).

## **IV - REGIÕES SUBTELOMÉRICAS: Os Finais (nem sempre) Perfeitos**

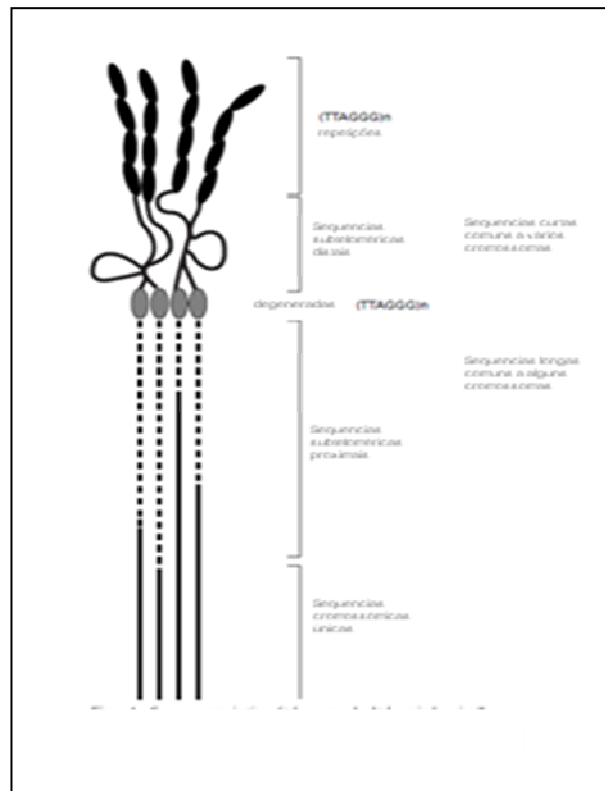
### **4.1 Estrutura e Função**

As regiões subtelo méricas são complexas e ricas em genes.

Em todos os cromossomas eucarióticos estas regiões possuem uma repetição rica em TG, que é (TTAGGG) $n$  em todos os vertebrados, possuindo uma extensão que varia entre 2 a 15 Kb (Moyzis *et al*,1988; Allshire *et al*,1989). Sem esta sequência terminal os cromossomas são instáveis e predispostos a fusões terminal-terminal e a degradação exonucleolítica. Além disso, os telómeros são necessários para a replicação completa do ADN e têm um papel importante na longevidade celular.

Imediatamente adjacente às repetições acima referidas, estão famílias complexas de ADN repetitivo que podem ter uma extensão de várias centenas de kilobases.

Tipicamente este ADN repetitivo está presente, para cada caso, num certo número de cromossomas, restrito às regiões subtelo méricas. (Brown *et al*, 1990) (Figura 3)



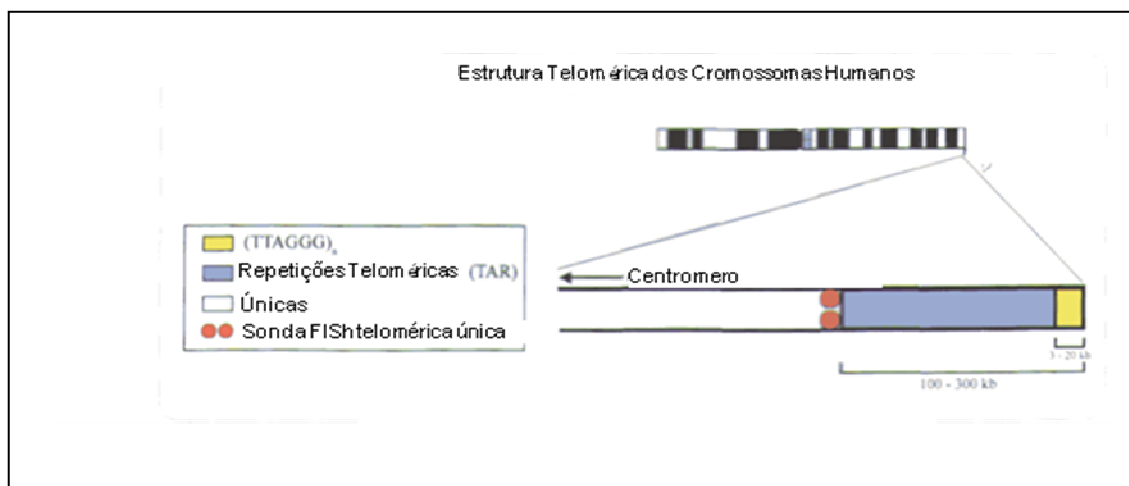
**Figura 3** - Esquema da organização dos telómeros e dos domínios subtelo méricos

Estudos de sequenciação do ADN adjacente às regiões teloméricas 4p, 16p e 22q, mostram que as repetições (TTAGGG)<sub>n</sub> intersticiais degeneradas subdividem as regiões subtelo méricas em subdomínios distal e proximal, com diferentes padrões de homologia em relação às de outros cromossomas.

Os padrões de homologia entre telómeros de diferentes cromossomas reflectem provavelmente a acção de diferentes processos de homogeneização de sequências, enquanto a repetição (TTAGGG)<sub>n</sub> intersticial, sem significado funcional, serve para compartimentar os domínios subtelo méricos no núcleo, limitando assim o tipo e extensão de interacções entre sequências.

Frequentemente a sequência subtelo mérica de um cromossoma é 95% idêntica à de outro e a homologia estende-se, muitas vezes, por muitos kilobases. Algumas sequências subtelo méricas não incluem genes funcionais (Flint *et al*, 1997).

Assim, tanto o tamanho como a complexidade dos domínios subtelo méricos constituíram um obstáculo importante à sua análise a nível molecular. Apesar destas limitações e das dificuldades técnicas em rastrear todo o genoma à procura de rearranjos submicroscópicos, o facto de grande parte destes envolverem as regiões terminais dos cromossomas, levou a que se desenvolvesse uma nova tecnologia capaz de detectar rearranjos nos telómeros usando sondas específicas para essas regiões - sondas subtelo méricas para os 24 cromossomas (22 autossomas, X e Y). Com o desenvolvimento destes verdadeiros mapas génicos (com clones específicos das regiões subtelo méricas em estudo), utilizados em ensaios de FISH, foi possível cobrir regiões com várias centenas de kilobases de extensão na zona distal de cada telómero.



**Figura 4** - Estrutura Telomérica dos Cromossomas Humanos

## 4.2 Importância das regiões subtelo méricas no DC

Até há duas décadas atrás, estimava-se que as anomalias cromossómicas estavam associadas no máximo a 40% dos atrasos mentais graves e a 5-10% dos atrasos mentais moderados (Slavotinek *et al*, 1999). Há cerca 15 anos foi sugerida a importância dos rearranjos cromossómicos submicroscópicos nas regiões terminais (subteloméricas) dos cromossomas, na etiologia do atraso mental "idiopático". As regiões adjacentes aos telómeros são extremamente ricas em genes, por isso rearranjos que envolvam ADN

adjacente aos telómeros têm maior probabilidade de ter consequências fenotípicas do que as que envolvem outras regiões do genoma. Além disso, a maioria das translocações envolve estas regiões cromossómicas e já estão identificados vários síndromes genéticos associados com alterações teloméricas, reforçando a noção que outras alterações, submicroscópicas, poderão ser responsáveis por doenças genéticas.

As alterações teloméricas foram reconhecidas pela primeira vez em 1992 como uma causa importante de DC, confirmando-se desde então que são responsáveis por 3 a 6% destes casos. (Ledbetter 1992; Ledbetter e Martin, 2007).

Em comparação com o síndrome de X Frágil, outra causa bem conhecida de atraso mental (diagnosticada em cerca de 1 a 2% das crianças com DC), as deleções subteloiméricas parecem constituir uma causa mais frequente. (Murray *et al*, 1996; De Vries *et al* 1997; De Vries *et al*, 2003).

As técnicas de citogenética convencional devido ao seu baixo poder de resolução, não detectam alterações inferiores a 5 megabases (Mb), o equivalente a uma resolução de 450 a 550 bandas. Mesmo alterações maiores podem passar despercebidas quando ocorrem em regiões onde o padrão de bandas não é suficientemente distinto, como acontece nas regiões subteloiméricas (Knight e Flint, 2000). Assim, os rearranjos subteloiméricos são indetectáveis pelas técnicas convencionais de bandagem cromossómica, quer pelo seu tamanho submicroscópico quer pela similaridade dos segmentos envolvidos.

Nos últimos anos, usando a técnica FISH com sondas subteloiméricas (e outras técnicas mais recentes), tem sido possível, identificar rearranjos cromossómicos subteloiméricos e submicroscópicos - *rearranjos crípticos terminais*, numa percentagem que varia entre os 4 e os 16% (nos vários estudos), e que são responsáveis por casos de atraso mental até então considerado idiopático (Knight *et al* 2004; Roberts *et al* 2004; Rodriguez-Revenga *et al* 2004; Yu *et al* 2005; Sogaard *et al* 2005; Pinto *et al* 2006; Rodríguez *et al* 2008; Hyun-Kyung *et al* 2008; Shao *et al* 2008).

Algumas das deleções subteloiméricas submicroscópicas resultam num fenótipo específico, que pode orientar o diagnóstico clínico. Nestes casos a análise de FISH com uma sonda única e específica será suficiente para confirmar a suspeita clínica. Vários novos síndromes por microdeleção têm

sido descritos de que são exemplo os síndromes de deleção 1p, 1q, 5q, 6p, 9q e 22q13.3 (De Vries et al, 2001; Stewart et al, 2004; Descipio et al 2005; Krantz e Spinner 2007; Bataglia et al, 2008; Stewart e Kleefstra et al, 2006; Falk e Casas 2007; Gajicka et al 2007; Rauch e Dorr 2007; Cusmano-Ozog et al 2007; Martinet et al 2008).

No entanto, nos estudos publicados até à data, a maioria dos doentes tem um fenótipo inespecífico, sendo o atraso mental a característica fenotípica chave. Vários estudos sugerem também que uma história familiar de atraso mental é um forte indicador de desequilíbrio subtelomérico (Riegel et al, 2001; Bocian et al, 2004; Knight et al, 1999; Moog et al, 2005). Neste grupo de doentes um rastreio subtelomérico generalizado é indispensável.

Estão descritos alguns casos de crianças com dismorfia facial /ADPM e rearranjos subteloméricos não evoluem para DC, confirmando que os rearranjos subteloméricos cripticos não resultam sempre em DC, pelo que é necessário prudência na definição de um prognóstico especialmente num contexto de aconselhamento genético pré-natal.

A pré-selecção clínica adequada permite a rentabilização da técnica, pelo que a aplicação de *checklists* como por exemplo a de De Vries pode constituir uma ajuda importante (De Vries et al, 2003; De Vries et al, 2001) (Quadro 3). Esta listagem, desenvolvida com o objectivo de maximizar os resultados do rastreio subtelomérico, baseia-se na existência de história familiar de AM, anomalias de crescimento pré e pós natal, dismorfias faciais e outras anomalias no exame físico. Tem como valor máximo 10.

No entanto, vários autores já se manifestaram contra o interesse desta e outras listas semelhantes publicadas na literatura (Van Karnebeek et al, 2002; Spranger S et al 2002; Baker et al, 2002).

Em 1999 foi publicado o primeiro estudo sistemático, envolvendo 466 crianças, que demonstrou uma frequência de rearranjos subteloméricos de 5%, superior ao esperado na altura e, ainda, que cerca de 50% dos casos eram derivativos de translocações equilibradas nos progenitores. Ou seja, com um risco elevado de recorrência, e de possíveis implicações para outros familiares saudáveis. A taxa de detecção mais elevada ocorreu em crianças com AM moderado a grave (7.4%) versus AM ligeiro (0.5%), realçando a importância de efectuar este estudo sobretudo no 1º grupo (Knight et al, 1999).

Em 2002, Biesecker fez uma revisão dos 14 estudos já publicados com mais de 2000 doentes estudados e em cerca de 6% foram identificados rearranjos subteloméricos, confirmando-se ainda a presença de um progenitor com translocação equilibrada em 50% dos casos.

*Table 2 Checklist for patients with submicroscopic subtelomeric rearrangements*

<i>Items</i>	<i>Score</i>
Family history of mental retardation	
Compatible with Mendelian inheritance	1
Incompatible with Mendelian inheritance (including discordant phenotypes)	2
Prenatal onset growth retardation	2
Postnatal growth abnormalities	2
For each of the following 1 point (max 2)	
Microcephaly (1), short stature (1)	
Macrocephaly (1), tall stature (1)	
≥2 facial dysmorphic features	2
Notably hypertelorism, nasal anomalies, ear anomalies	
Non-facial dysmorphism and congenital abnormalities	2
For each anomaly 1 point (max 2)	
Notably hand anomaly (1), heart anomaly (1), hypospadias +/- undescended testis (1)	

*Table 3 Sensitivity and specificity of the checklist for different cut off scores*

<i>Cut off score</i>	<i>Sensitivity (95% CI)</i>	<i>Specificity (95% CI)</i>
≥3	1.00 (0.87–1.00)	0.27 (0.18–0.39)
≥4	0.89 (0.71–0.98)	0.43 (0.32–0.55)
≥5	0.70 (0.50–0.86)	0.69 (0.57–0.79)
≥6	0.56 (0.35–0.75)	0.88 (0.79–0.95)
≥7	0.33 (0.17–0.54)	0.94 (0.86–0.98)
≥8	0.19 (0.06–0.38)	0.95 (0.87–0.99)
≥9	0.11 (0.02–0.29)	0.99 (0.93–1.00)

**Quadro 3 - Checklist de Vries para doentes com rearranjos subteloméricos**

Estes estudos vieram documentar de forma clara o significado clínico dos rearranjos subteloméricos, cujo estudo se foi tornando, progressivamente, uma rotina em crianças com DC/ADPM quando o cariótipo convencional e restante investigação é negativa (Shevell *et al*, 2003).

Em 2006 um estudo envolvendo quase 12000 testes, evidenciou alterações em cerca de 2.5% dos casos, valor confirmado por um estudo mais recente com 7 000 doentes utilizando tecnologia de *CGH array* (Ravnan *et al*,

2006; Ballif *et al*, 2007). Apesar destes estudos apresentarem uma positividade inferior aos anteriormente descritos na literatura (o que poderá resultar de critérios de inclusão menos estritos), são ainda assim muito significativos. Em Portugal foi publicado até à data um estudo envolvendo 50 doentes, com uma taxa de detecção de 4% (Pinto *et al*, 2006).

#### **4.3 Vantagens e limitações da Técnica FISH com sondas subteloméricas. Técnicas alternativas.**

A técnica FISH é uma técnica de fácil implementação e execução, fornece resultados em 48h e é, actualmente, financeiramente comportável. A interpretação dos resultados é fácil e rápida. Contudo o estudo por FISH não dá informação sobre o tamanho e conteúdo génico dos segmentos deletados/duplicados e não detecta deleções intersticiais ou outros rearranjos que não incluam o clone específico mais distal. Outro problema são as variantes não patogénicas de que é exemplo bem conhecido a deleção terminal 2q (Moog *et al*, 2005; Hengstschlager *et al* 2005).

As novas tecnologias como o *MLPA* e *CGH* baseado em *microarrays*, são métodos igualmente rápidos, mas de maior eficácia (em especial o *CGH* que permite uma análise completa do genoma), sendo uma das suas aplicações a detecção de desequilíbrios subteloméricos (Veltman *et al*, 2002; Harad *et al*, 2004; Rooms *et al*, 2005; Rooms *et al* 2006; Palomares *et al*, 2006; Shao *et al*, 2008; Cheryl *et al* 2008; Auber *et al*, 2009).

A técnica de *CGH array* em particular é uma tecnologia poderosa em que se depositam muitas esperanças. Permite avaliar alterações de uma única cópia (monossomia ou trissomia) em loci alvo, como nos telómeros, ou na totalidade do genoma. Detecta de forma eficiente, o tamanho e conteúdo génico do desequilíbrio bem como deleções intersticiais em qualquer região do genoma que esteja abrangida na concepção do *array*.

Os estudos efectuados até ao momento já permitiram confirmar que no atraso mental de etiologia indeterminada há, de facto, um peso maior de desequilíbrios teloméricos em comparação com as restantes regiões cromossómicas. Tal parece resultar sobretudo das quebras cromossómicas frequentes nesta zona mais susceptível, mais do que de mecanismos

moleculares específicos associados com a arquitectura genómica dos telómeros humanos. Verificou-se também que os desequilíbrios subteloméricos são significativamente maiores em tamanho do que o inicialmente estimado (cerca de 40% têm mais de 5 Mb).

Foi a experiência adquirida com os estudos de FISH sobre as variantes teloméricas benignas - pequenas em comparação com os desequilíbrios patogénicos que são geralmente muito maiores, que permitiu estabelecer um modelo para a abordagem de *CGH array* na prática clínica (Ledbetter and Martin 2007).

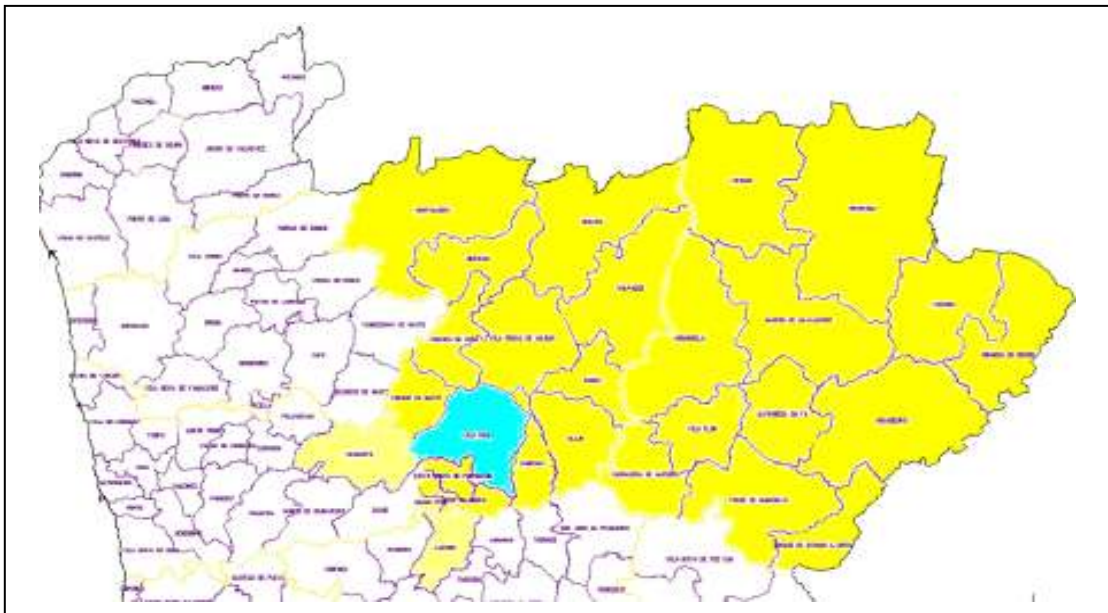
A interpretação dos resultados é ainda muito complicada pelo número crescente de polimorfismos de número de cópias (CNVs) (Moog *et al*, 2005; Koolen *et al*, 2004; Kriek *et al*, 2004; Oostlander *et al*, 2004). No entanto espera-se que num futuro, não muito distante, estes problemas possam ser ultrapassados e a técnica ser torne acessível na prática clínica (Shaffer *et al*, 2007).

Actualmente estima-se que taxa de diagnóstico no DC com estas técnicas será: (i) no *FISH* com sondas subteloméricas 5 a 7% (delecções – mais frequentes), (ii) com *MLPA* 10% e com o (iii) *aCGH* 7 a 20% (delecções intersticiais).

## V - PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO

### 5.1 Motivos do estudo

O Serviço de Genética do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro - CHTMAD presta cuidados assistenciais na área da genética médica e do diagnóstico pré-natal (consultas de genética – patologia a aconselhamento, pré-natal e técnicas de citogenética), a uma população alvo de cerca de 500.000 habitantes, distribuídos pela área incluída na “Associação de Municípios de Trás-os-Montes e Alto Douro” (Figura 5)



**Figura 5** - Área de cobertura do Serviço de Genética do CHTMAD

Com base na evidência já referida, que demonstrou que os rearranjos subteloméricos contribuem significativamente para o DC idiopático, propusemo-nos estudar os doentes seguidos na consulta de genética, seleccionando uma amostra inicial de 50 doentes (posteriormente alargada para incluir 97 doentes), afectados de atraso mental de etiologia indeterminada. Este estudo teve como finalidades, além do melhor estudo de doentes com DC da região de Trás-os-Montes, contribuir para o aumento do conhecimento sobre apresentação clínica de doentes com rearranjos subteloméricos e tentar precisar os critérios clínicos de inclusão de doentes neste tipo de estudo.

Submetemos o projecto ao concurso da Comissão de Fomento de Investigação em Cuidados de Saúde, de 2007, na área de investigação de Epidemiologia Clínica (Anexo I)

## **5.2 Doentes e Métodos**

### **a. Doentes**

Foram estudados 97 doentes que frequentam a consulta de Genética do CHTMAD, com DC de causa não determinada que, já tendo sido submetidos a todas as análises genéticas protocoladas na investigação de um atraso mental (cariótipo com bandas GTG de alta resolução, estudo molecular X-frágil e, em alguns casos, estudo metabólico, imagiologia cerebral e outros), permaneciam sem diagnóstico etiológico. A maioria foi seleccionada com base na *checklist* publicada por De Vries, preferencialmente doentes com pelo menos 3/10 características.

### **b. Amostras biológicas**

Foi colhida uma amostra de 5 ml de sangue periférico aos indivíduos seleccionados. Foram também colhidas amostras de sangue aos pais/familiares dos doentes em que se encontraram alterações.

### **c. Metodologia**

A análise por citogenética molecular com *Fluorescent in situ* hybridization (FISH) com sondas subteloméricas (Chromoprobe Multiprobe-TTM - Vysis), foi realizada em metafases obtidas a partir de culturas sincronizadas de linfócitos, de acordo com as técnicas de rotina utilizadas no laboratório. Para a realização da FISH seguiram-se as instruções do fabricante. (Anexo II).

A metodologia seleccionada permite analisar, numa só lâmina com 41 sondas, as regiões subteloméricas de todos os cromossomas (excepto dos braços curtos dos acrocêntricos, uma vez que estes são constituídos por ADN ribossomal que, quer delectado, quer duplicado, não tem qualquer expressão fenotípica). Para cada par de cromossomas homólogos foram examinadas no mínimo 5 metafases, por dois operadores independentes.

Os estudos dos familiares dos doentes em que se encontraram alterações foram efectuados usando sondas específicas para as regiões subteloméricas dos cromossomas envolvidos.

#### **d. Análise estatística**

No sentido de tentar definir características clínicas correlacionadas com anomalias subteloméricas, os doentes foram então divididos em dois subgrupos de acordo com o resultado do estudo (subgrupo 1: composto por seis indivíduos com atraso mental portadores de anomalias subteloméricas; subgrupo 2: formado por 91 indivíduos com atraso mental com estudo negativo). Foi efectuada análise estatística por comparações entre grupos, com base em variáveis categóricas, realizadas com teste do Qui-quadrado de independência. Nos casos em que as condições de aplicabilidade do teste Qui-quadrado não eram verificadas, usaram-se os resultados do teste exacto, que são consoantes com a Simulação de Monte-Carlo.

Nos casos em que a comparação entre os dois grupos em estudo foi baseada em variáveis contínuas recorreu-se ao teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Para o estudo estatístico foi utilizado o *software* SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Considerou-se uma probabilidade de erro de tipo I ( $\alpha$ ) de 0.05 em todas as análises inferenciais.

## **VI - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Resultados gerais**

Dos 97 doentes estudados, 61 eram do sexo masculino e 36 do sexo feminino (1.7: 1). A idade dos doentes à data de diagnóstico variou entre 0.1 - 62.3 anos.

Todos os doentes apresentavam ADPM/DC classificado, de acordo com avaliação em Psicologia/Psiquiatria Infância e Adolescência, como:

- ligeiro - 33 casos
- moderado - 53 casos
- grave - 10 casos
- profundo - 1

Existia história familiar de DC/anomalias em cerca de 70% dos casos (68/91), 86 doentes eram portadores de duas ou mais dismorfias (88%) e em 60 havia história de atraso de crescimento pré e/ou pós natal (62%).

A idade materna ao nascimento variou da seguinte forma:

- $\leq 18$  A - 6 casos
- 19-34 A - 81 casos
- $\geq 35$  A - 10 casos

A escolaridade materna:

- sem escolaridade - 11
- 1º ciclo - 41
- 2º ciclo - 19
- 3º ciclo - 9
- secundário - 9
- superior - 8

A distribuição de acordo com o *score* na *checklist* variou da seguinte maneira:

- 0 = 1
- 1-2 = 10
- 3-4 = 43
- 5-6 = 23
- 7-8 = 19
- 9 = 1

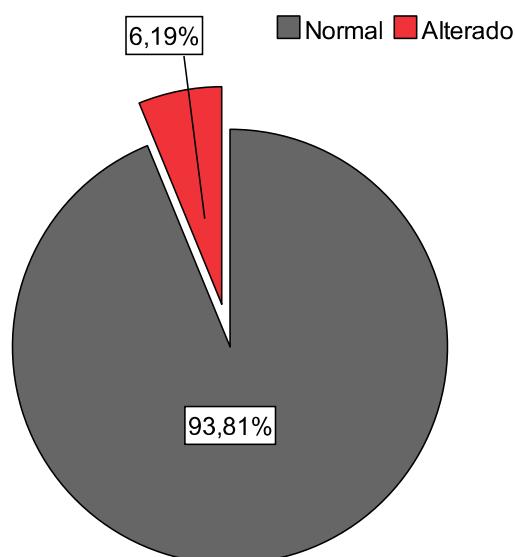
Em seis casos foram identificadas anomalias cromossómicas crípticas (6,19%), quatro de novo (3 deleções - 19p, 2p e 4q e uma duplicação 4p) e duas familiares (deleção 3p e deleção 3q). O *score* destes doentes na *checklist* teve a seguinte distribuição: 7- um caso, 5 - um caso, 4 - dois casos e 3 - dois casos. Foi efectuado o estudo familiar, excepto num caso, tendo sido encontrados mais 3 resultados positivos.

## 6.2 Análise Estatística

Foi efectuada comparação entre o subgrupo de portadores de rearranjos subteloméricos e os restantes doentes com resultado normal.

### a) Caracterização inicial da amostra

Seis indivíduos com atraso mental e portadores de alterações subteloméricas constituem o grupo de estudo (3 indivíduos do sexo feminino e 3 do sexo masculino). Um total de 91 indivíduos com atraso mental (33 do sexo feminino e 58 do masculino), e com resultado normal constituem o grupo controle (Figura 6).



**Figura 6** - Distribuição percentual do resultado do estudo.

Os indivíduos do grupo de estudo apresentaram idades no início do estudo compreendidas entre 0.1 - 62.3 anos, idade média 7.7 anos (desvio padrão 8.0 anos) enquanto que os grupo controle tinham idades no início do estudo compreendidas entre 1.1 - 34.4 anos, idade média 10.1 anos (desvio padrão 12.5 anos).

### b. Comparação entre o grupo controle e o grupo de estudo

No Quadro 4 estão apresentados, para os dois grupos, a mediana, o 1º e o 3º quartis da idade do doente na 1ª consulta, da idade do doente na idade actual, da idade da mãe do doente na 1ª consulta e da idade da mãe do doente na altura do nascimento.

A idade mediana dos doentes do grupo de estudo é ligeiramente superior à idade mediana dos doentes do grupo controle. Por outro lado, a idade da mãe, ao nascimento e na altura da primeira consulta é inferior no grupo de estudo comparativamente ao grupo controle. Contudo, para todas as variáveis estudadas, as diferenças observadas não se revelaram estatisticamente significativas ( $p > 0.05$  nos quatro casos).

Característica	Grupo		p
	Estudo	Controle	
Idade do doente na 1ª consulta	6.6 (1.1 – 16.9)	6.5 (3.3 – 10.0)	0.988
Idade do doente no ano actual	9.3 (3.7 – 18.0)	8.9 (6.2 – 13.6)	0.994
Idade da mãe do doente na 1ª consulta	34.0 (31.5 – 46.5)	35.0 (29.0 – 40.0)	0.534
Idade da mãe na altura do nascimento	27.5 (23.8 – 32.3)	28.0 (22.0 – 31.0)	0.893

**Quadro 4** - Comparação entre os dois grupos no que respeita às idades dos doentes e às idades das respectivas mães. Os valores apresentados são a mediana (1º quartil – 3º quartil) e a unidade é anos.

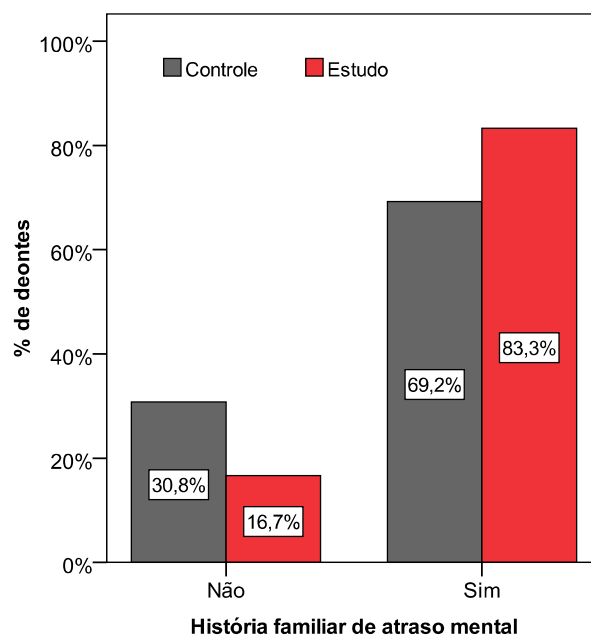
O Quadro 5 apresenta a distribuição percentual da escolaridade da mãe do doente por grupo. Em ambos os grupos, o grau de escolaridade mais frequente foi o 1º ciclo do ensino básico (33.2% - grupo de estudo e 42.9% - grupo controle). Nos dois grupos verificaram-se mães sem escolaridade, 16.7% no grupo de estudo e 10.9% no grupo controle. 33.4% das mães dos doentes do grupo de estudo apresentaram um grau de escolaridade superior ou igual ao secundário, enquanto que no grupo controle essa percentagem foi 16.5%. Finalmente, no grupo de estudo, 16.7% das mães possuíam o 2º ou 3º ciclo de escolaridade, no grupo controle essa percentagem foi 29.7%.

Grau de escolaridade	Grupo	
	Estudo	Controle
Sem escolaridade	1 (16.7)	10 (10.9)
1º ciclo do ensino básico	2 (33.2)	39 (42.9)
2º ciclo do ensino básico	1 (16.7)	18 (19.8)
3º ciclo do ensino básico	0 (0.0)	9 (9.9)
Secundário	1 (16.7)	8 (8.8)
Superior	1 (16.7)	7 (7.7)
<b>Total</b>	<b>6 (100.0)</b>	<b>91 (100.0)</b>

**Quadro 5** - Escolaridade da mãe do doente por grupo. Os valores apresentados são a frequência absoluta (percentagem).

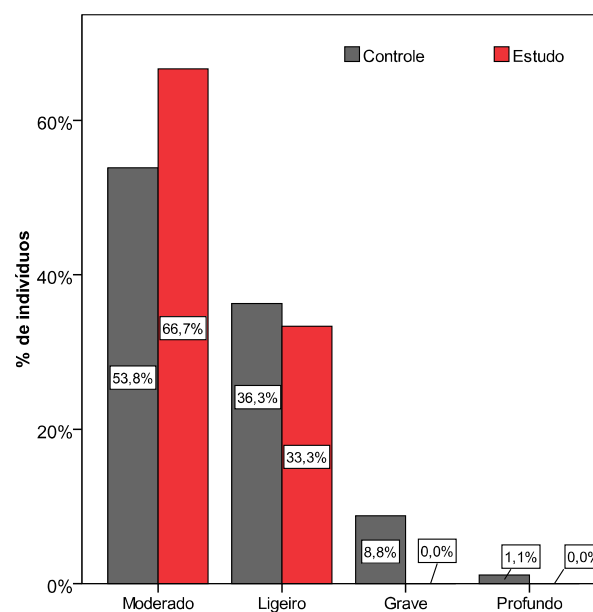
Nota: Neste caso, mesmo recorrendo à simulação de Monte Carlo não foi possível obter o valor p, devido ao elevado número de classes resultantes do cruzamento das duas variáveis.

A Figura 7 ilustra a distribuição percentual da incidência de história familiar positiva de atraso mental para os dois grupos. Observou-se uma maior percentagem de casos com história familiar positiva de atraso mental no grupo de estudo (n=5; 83.3%), comparativamente ao grupo controle (n=63; 69.2%). Contudo, a análise estatística inferencial permite afirmar que a incidência de história familiar de atraso mental é independente do Grupo (p=0.665).



**Figura 7**- Distribuição percentual da incidência de história familiar de atraso mental pelos dois grupos em estudo.

A distribuição percentual do tipo de atraso mental pelos dois grupos em análise está ilustrada na Figura 8. Observou-se que, dos indivíduos do grupo controle, 49 (53.8%) apresentaram um atraso mental moderado, 33 (36.3%) revelaram um atraso mental ligeiro, 8 (8.8%) tinham um atraso mental grave e apenas 1 (1.1%) apresentou um atraso mental profundo. No que respeita aos indivíduos do grupo de estudo, não foram verificados casos de atraso mental grave ou profundo, verificaram-se 4 (66.7%) casos de atraso mental moderado e 2 (33.3%) de atraso mental ligeiro.

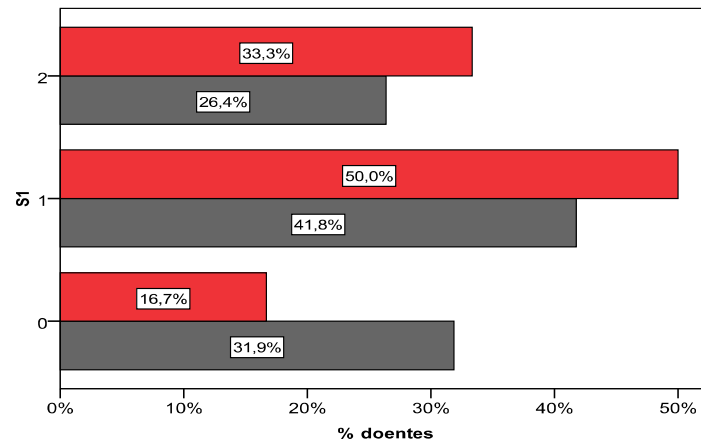


**Figura 8** - Distribuição percentual do tipo de atraso mental pelos grupos em estudo.

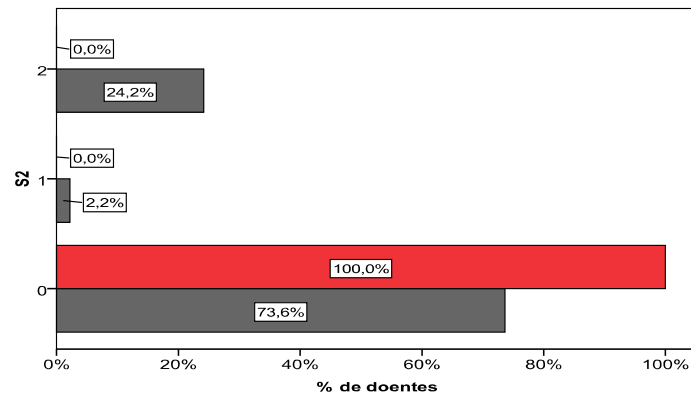
Nota: Neste caso, mesmo recorrendo à simulação de Monte Carlo não foi possível obter o valor p, devido ao elevado número de classes resultantes do cruzamento das duas variáveis.

Na figura seguinte (Figura 9 A,B,C,D,E) ilustram-se as distribuições percentuais das variáveis S1, S2, S3, S4 e S5 pelos grupos em estudo.

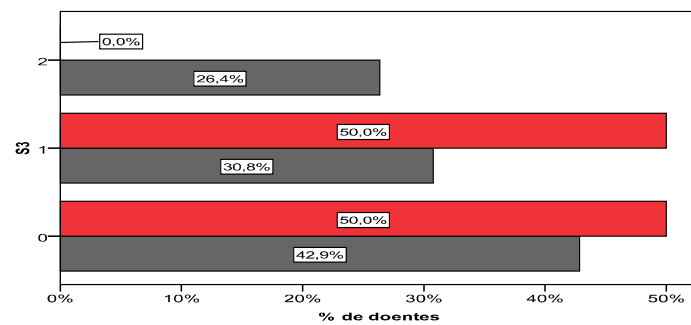
### A – História familiar de atraso mental



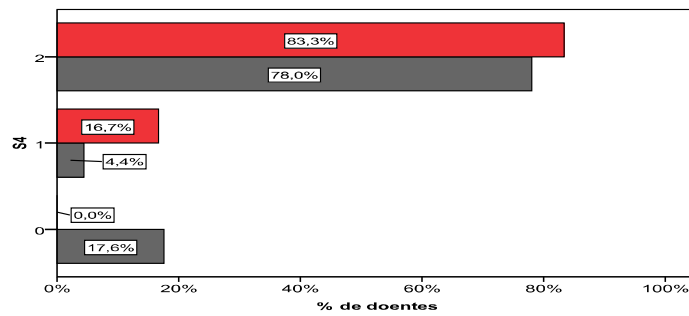
### B – Atraso crescimento pré-natal



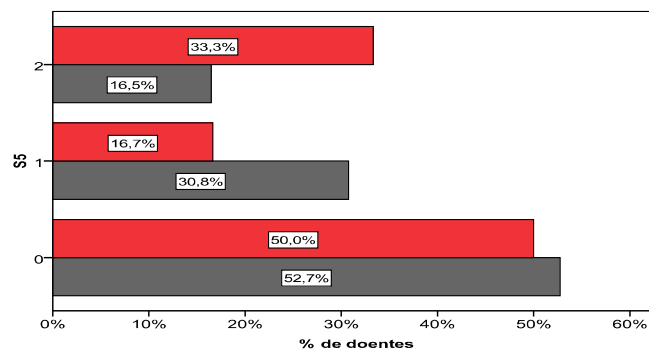
### C – Anomalias crescimento pós-natal



### D - $\geq 2$ dismorfias faciais

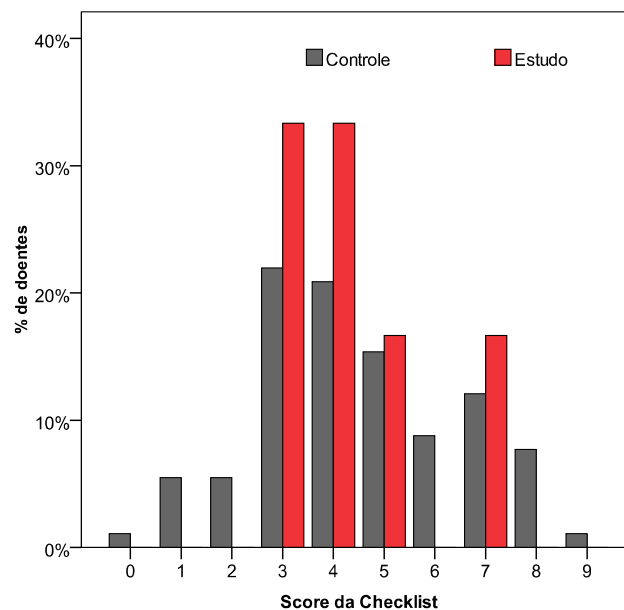


### E - Outras anomalias



**Figura 9** - Distribuição percentual das variáveis S1 (A), S2 (B), S3 (C), S4 (D) e S5 (E) pelos grupos em estudo.

A Figura 10 (e quadro 6) ilustram a distribuição percentual do *Score da checklist* (score total dos 5 itens da *checklist* avaliados) para os dois grupos de estudo.



**Figura 10** - Distribuição percentual do “Score da checklist” pelos grupos em estudo.

Score da checklist	Grupo	
	Estudo	Controle
0	0 (0.0)	1 (1.1)
1	0 (0.0)	5 (5.5)
2	0 (0.0)	5 (5.5)
3	2 (33.3)	20 (22.0)
4	2 (33.3)	19 (20.9)
5	1 (16.7)	14 (15.3)
6	0 (0.0)	8 (8.8)
7	1 (16.7)	11 (12.1)
8	0 (0.0)	7 (7.7)
9	0 (0.0)	1 (1.1)
<b>Total</b>	<b>6 (100.0)</b>	<b>91 (100.0)</b>

**Quadro 6** - Distribuição percentual do “Score da checklist” pelos grupos em estudo.

Cut off	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)
≥ 3	1.00 (0.86 – 1.00)	0.13 (0.02 – 0.28)
≥ 4	0.67 (0.49 – 0.85)	0.34 (0.20 – 0.47)
≥ 5	0.33 (0.18 – 0.53)	0.55 (0.43 – 0.67)

**Quadro 7** - Sensibilidade e especificidade da checklist para diferentes cut off.

Em termos dos valores obtidos no *score* da *ckeclist* no seu total ou por itens, não foi possível obter resultados valorizáveis.

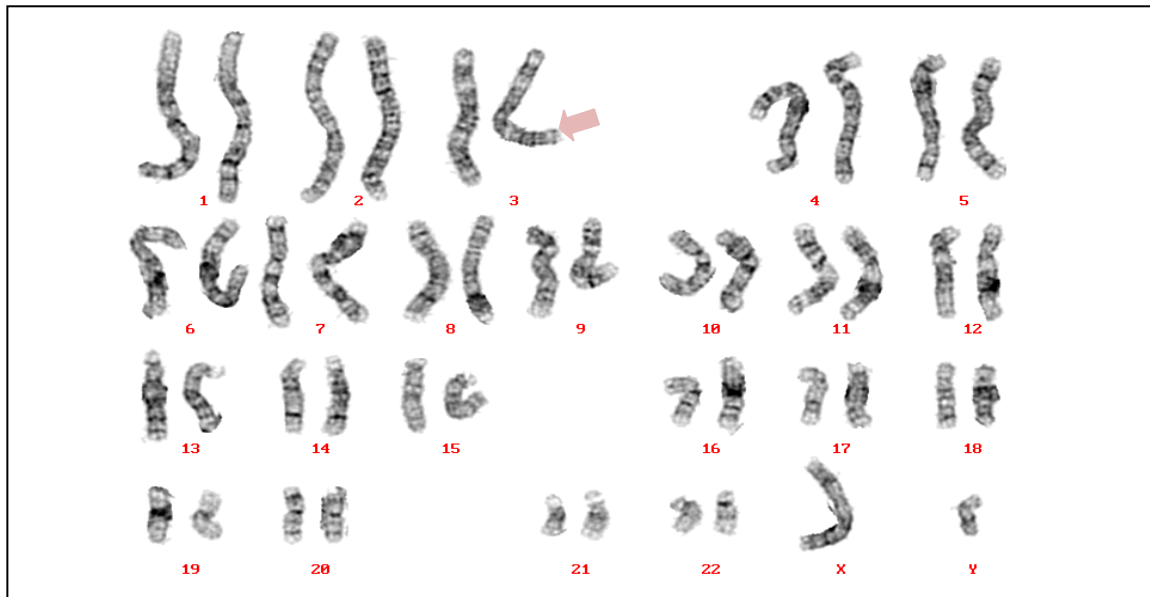
### 6.3 Descrição dos Casos Clínicos Positivos

- **Caso clínico 1 - Síndrome del 3q**

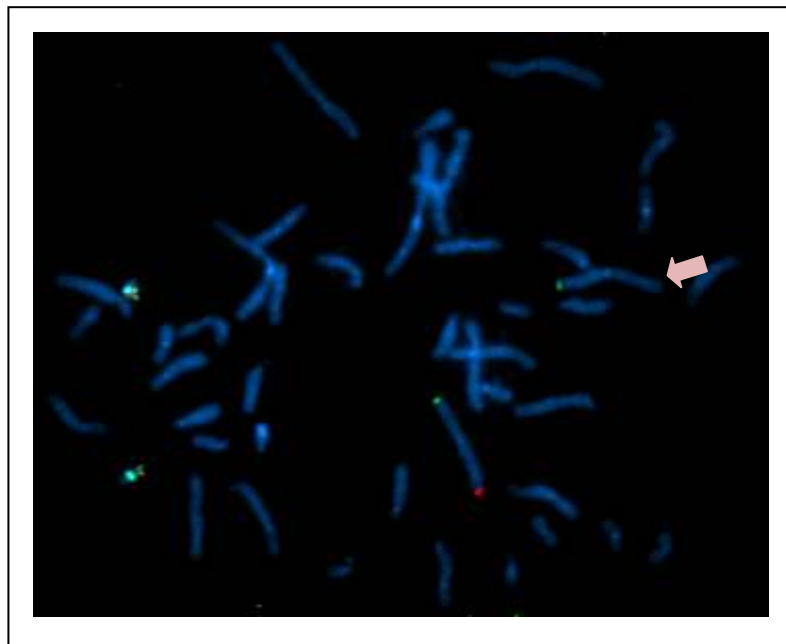
**[46,XY,del(3)(q29).ish del(3)(qter-)]**

Criança do sexo masculino, 13 meses de idade, referenciada à Consulta de Genética por atraso familiar, baixa estatura relativa, macrocefalia e face peculiar. Primeiro e único filho deste casal, jovem e não consanguíneo. Progenitores com atraso (pai - ligeiro, mãe - moderado), mãe com dismorfias. Meio-irmão materno também com atraso que não foi possível precisar (colocado em família de acolhimento) e restante história aparentemente negativa. Gestação complicada por diabetes gestacional e colestase intrahepática, que motivaram cesariana electiva às 34 semanas de idade gestacional. Parto e período neonatal (PNN) sem problemas. Somatometria ao nascimento AIG (PN: 2350g, Cp 43 cm e PCef 33.5cm). Evolução estatura ponderal com peso no P50-75, estatura no P25 e PCef P75 a P>95. ADPM global moderado. Fenotipicamente a referir macrocefalia (PCef 49.5cm >P95); peso no P75 (11kg) e estatura no P25 (74cm). Cardiopatia: estenose aórtica sem compromisso hemodinâmico. Dismorfia facial com face quadrangular larga, metópica proeminente, hipertelorismo, olhos fundos, arcada supraciliar saliente, pavilhões auriculares displásicos, boca pequena com lábio superior fino, filtro longo, ponte nasal proeminente, narinas pequenas e antevertidas, microretrognatia. Pescoço curto e largo, braquidactilia das mãos, palmas com dermatoglifos profundos, dedos dos pés mal posicionados e com unhas hipoplásicas; escroto em xaille.

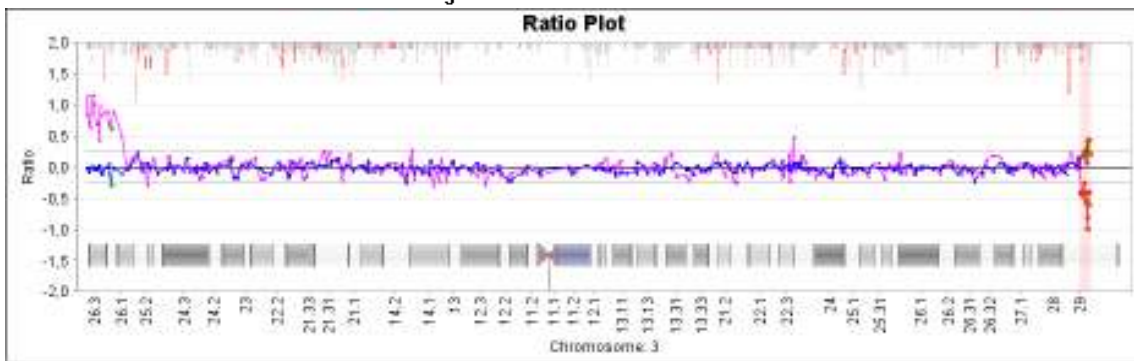
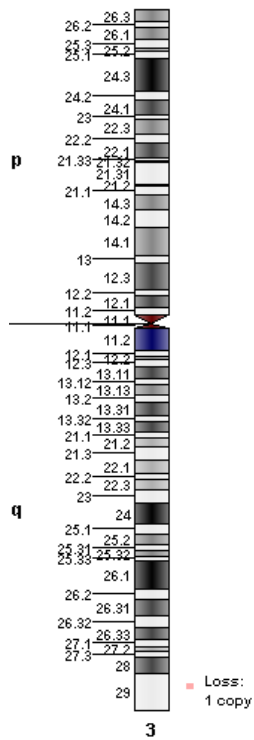
O estudo citogenético com bandas de alta resolução foi normal. Aplicando a técnica FISH com sondas subteloméricas detectou-se uma deleção na banda 3q29. Revendo as metafases analisadas confirmou-se o diagnóstico (Figuras 11, 12). O estudo dos progenitores demonstrou que a mãe é portadora da deleção. A análise por *CGH array* (Figura 13) confirmou o diagnóstico na mãe e no filho.



**Figura 11** - Cariótipo com bandas GTG. A seta assinala a del3q.



**Figura 12** - Metafase parcial com sondas subteloméricas para o cromosoma 3 (p a verde e q a vermelho). A seta, assinala a del3q29 (não há marcação a vermelho).



**Arr cgh 3q29** (197207063 bp-> 198742794 bp)x1.Loss of 1.00 copy(ies), Ratio=.76, Region=197.03-198.73

1	Loss	3	197032016	198732400	0.164	100%	3q29	3q29	15 Pub. G:85 L:76
---	------	---	-----------	-----------	-------	------	------	------	----------------------

**Figura 13 - CGH Array - cromossoma 3 com deleção na banda q29.**

## Comentários

A síndrome de deleção 3q é uma doença genética rara que cursa habitualmente com atraso mental, atraso de crescimento e características dismórficas. A região crítica localiza-se em 3p26. Encontramos 8 casos descritos na literatura, todos com atraso mental. No entanto a variabilidade clínica do síndrome 3q29 pode ir da ausência total de alterações fenotípicas até ao aparecimento de um padrão dismórfico incomum (Brueeton *et al* 1989; Chitayat *et al* 1996; Rossi *et al* 2001).

- **Caso clínico 2 - Síndrome del 19p**

**[46,XX,del(19)(q13.42).ish del(19)(qter-)]**

Criança do sexo feminino, referenciada à Consulta de Genética com 11 anos de idade, por atraso familiar e face peculiar. Segunda filha deste casal, saudável e não consanguíneo. Progenitores com atraso ligeiro/dificuldades de aprendizagem (mãe fez 1º ano de escolaridade, mas não sabe ler nem escrever e o pai o 2º ano). Uma irmã de 6 anos aparentemente saudável. Restante história familiar compatível com outros casos de atraso ligeiro a moderado. Sem história de abortamentos ou anomalias congénitas. História de alcoolismo crónico nos avós maternos.

Gestação de evolução normal e parto de termo por cesariana, sem sofrimento fetal. PNN sem problemas. Somatometria ao nascimento AIG (PN: 2810g, Cp 48 cm e PCef 34cm). Evolução EP no P25 e PCef P50-75. ADPM global moderado ("andou e falou tarde").

Fenotipicamente a referir PCef no P75 (54 cm); peso no P50 (48.5kg) e estatura no P25 (151cm). Dismorfia facial com face longa, assimetria facial com hemiface direita maior que esquerda incluindo narina, discreta ptose palpebral bilateral implantação baixa cabelo na frente com estreitamento, pavilhões auriculares implantação normal mas displásicos, palato estreito e assimétrico, nariz longo e estreito com asas hipoplásicas e columela baixa e larga. Ponta nasal proeminente – globosa. Mãos com dedos fusiformes.

O cariótipo com bandas GTG foi normal. O estudo por FISH revelou uma deleção subtelomérica do ramo curto de cromossoma 19 (Figuras 14 e 15). O

estudo por CGH array foi negativo, mas a repetição por técnica FISH em confirmou a presença de deleção 19p. O estudo dos progenitores foi normal.

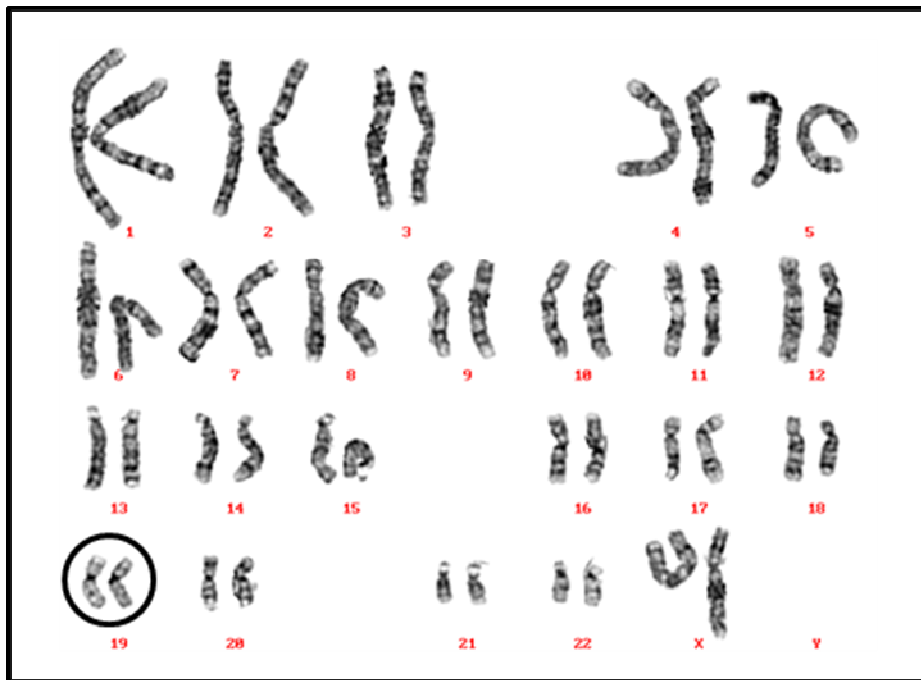


Figura 14 - Cariótipo normal com bandas GTG. O aro assinala os cromossomas 19.

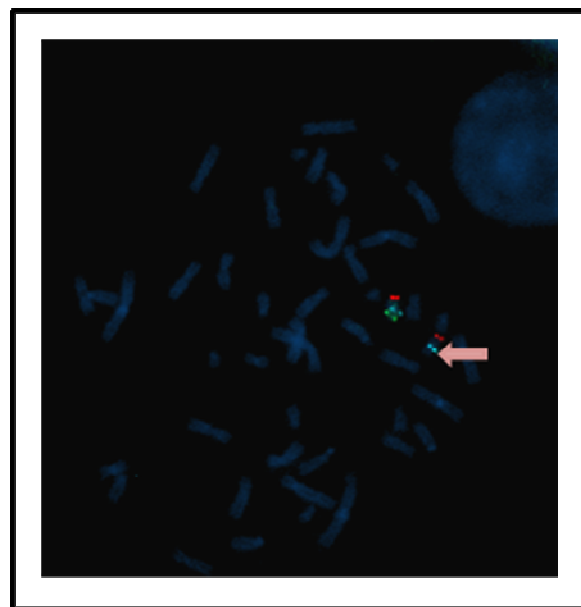


Figura 15 - Metáfase com sondas subtelo méricas para os cromossomas 19 (p a verde, q a vermelho e centrómero a azul). A seta assinala a del19p (não há marcação do sinal verde).

## Comentários

Não encontramos referências na literatura sobre anomalias semelhantes envolvendo o cromossoma 19, excepto relacionadas com oncogenética. As únicas excepções são a descrição de Hurgoiu *et al* (1984), que outros autores consideraram inconclusiva, e a de Aten *et al* (2009), com um fenótipo muito mais grave. O fenótipo mais ligeiro desta doente poderá resultar de uma deleção de menor tamanho ou de mosaicismo.

O estudo negativo por CGH array corrobora a hipótese de um padrão de mosaicismo (não detectável no *CGHarray*).

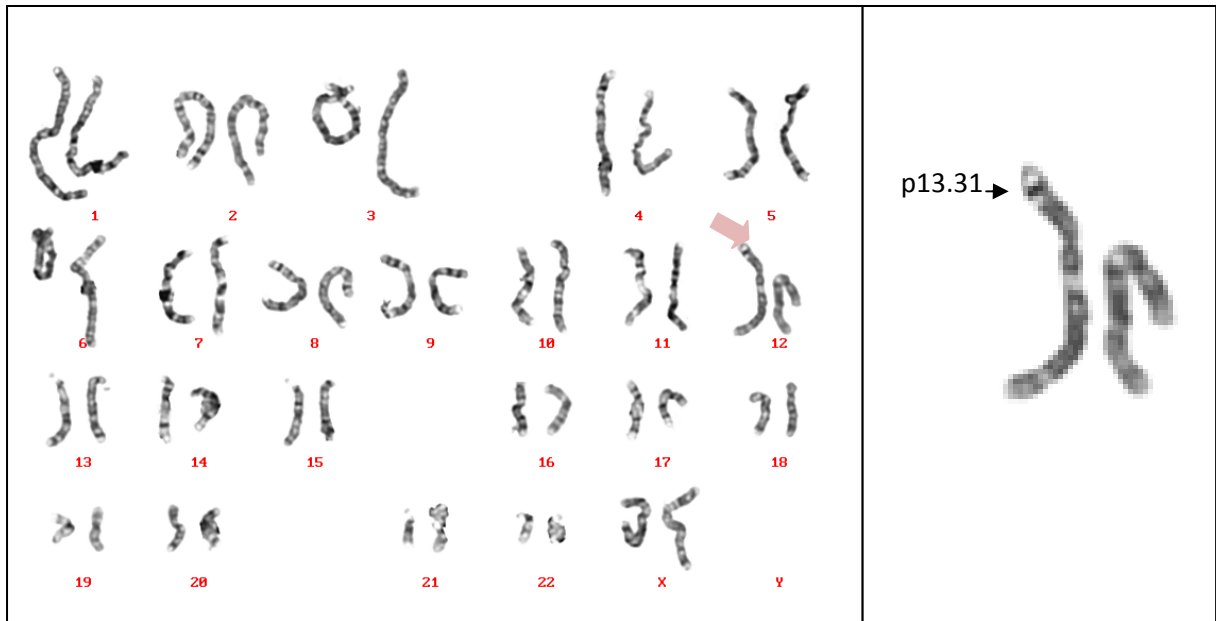
- **Caso clínico 3 - Síndrome dup 4p**

**[46,XX,der(12)t(4;12)(p14;p13.31). ish der(12)t(4;12)(pter+, pter-)]**

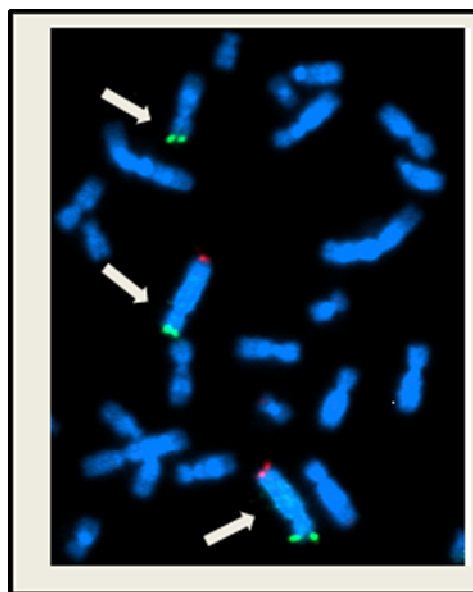
Criança do sexo feminino, referenciada à Consulta de Genética com 8 anos de idade, por atraso e dismorfias. Primeira e única filha deste casal saudável e não consanguíneo. Progenitores com dificuldades de aprendizagem (mãe fez 4º ano de escolaridade e o pai o 7º ano). Restante história familiar aparentemente irrelevante.

Gestação de evolução normal, parto eutócico de termo, sem sofrimento fetal. Somatometria ao nascimento AIG (PN: 3690g, Cp: 51 cm e PCef: 35.5cm). PNN sem problemas. Evolução do peso no P75 e da estatura no 50. PCef no P50. Atraso cognitivo só valorizado após a entrada na escola. Fenotipicamente a referir dismorfia facial com estreitamento bitemporal e olhos fundos, pavilhões auriculares implantação normal, rodados posteriormente, nariz com ponta globosa e larga. Malposicionamento dos dentes com incisivo superior extra. Mento proeminente. Mãos com dedos fusiformes, encurtamento das falanges distais e 5º dedo mais curto. Unhas 5º dedo pés distróficas e hipoplásicas.

O cariótipo com bandas GTG revelou material extra no braço curto do cromossoma 12 (Figura 16) que a técnica *FISH* demonstrou tratar-se do ramo curto do cromossoma 4 (Figura 17). O estudo dos progenitores foi normal.



**Figura 16** - a) Cariotipo com um der(12)(seta) com bandas GTG. b) Zona do ramo curto do cromossoma 12 - p13.31 - em que foi adicionado material extra.



**Figura 17** - Metáfase parcial com sondas subtelo méricas para os cromosomas 4 (p a vermelho e q a verde). As seta, assinalam 3 ramos curtos do cromossoma 4.

## Comentários

Existem vários casos descritos de trissomia parcial 4p, com grande variabilidade clínica e fenotípica. Esta variabilidade depende em parte do tamanho e localização do segmento duplicado. Além do atraso mental geralmente grave, as anomalias craniofaciais, dos pés e mãos e as dificuldades alimentares são frequentes. (Keren *et al* 1982; Oorthys *et al* 1989; Tschernigg *et al* 2002; Hastings *et al* 2008; Zhang *et al*, 2010).

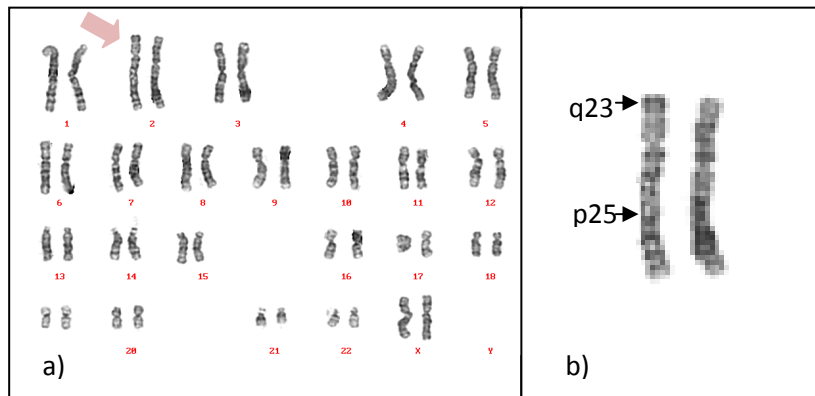
Neste caso a técnica FISH foi indispensável na identificação do material cromossómico extra.

- **Caso clínico 4 - Síndrome del 2p**

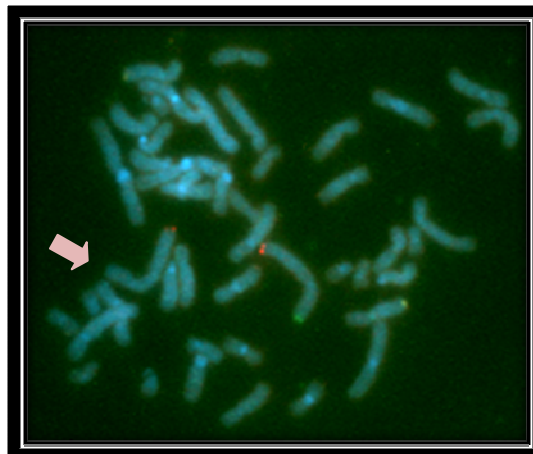
**[46,XX,inv(2)(p25q23).ish del(2)(qter-)]**

Doente do sexo feminino, referenciada à Consulta de Genética aos 34 anos de idade, por patologia psiquiátrica, traços autistas e défice cognitivo. História familiar de atraso (?), antecedentes pessoais aparentemente irrelevantes (?). Atraso cognitivo moderado. Baixa estatura, hipotricose, face peculiar com fronte estreita e nariz largo; palato alto e estreito, pescoço curto, pavilhões auriculares de implantação baixa, grandes e descolados, fendas palpebrais estreitas, micrognatia, mãos pequenas com dedos finos e fusiformes e clinodactilia 5º dedo. O estudo citogenético com bandas de alta resolução revelou uma inversão 2p (Figura 18) que habitualmente não tem significado patológico. Aplicando a técnica FISH com sondas subteloméricas detectou-se uma deleção no braço curto do cromosoma 2 (Figura 19).

Não foi possível estudar os progenitores.



**Figura 18** - a) Cariotipo com inv(2) (seta) com bandas GTG. b) Par do cromossoma 2 (assinalado as zonas de quebra no cromossoma 2 com inversão)



**Figura 19** - Metafase com sondas subtelo méricas para os cromossomas 2 (p a verde e q a vermelho) e Xq (verde). A seta assinala o cromossoma a del 2 p (não há marcação a verde) no inv(2).

## Comentários

As monossomias 2p "puras" são situações extremamente raras. São geralmente observadas como parte de anomalias cromossómicas complexas envolvendo outros cromossomas. Encontramos algumas referências na literatura mas de fenótipos associados a deleções intersticiais e um caso com fenótipo grave associado a uma deleção 2p25 *de novo*. (Gruchy *et al* 2007; Rajcan-Separovic *et al* 2007; Lo Castro *et al* 2009)

- **Caso clínico 5 - Síndrome del 4q**

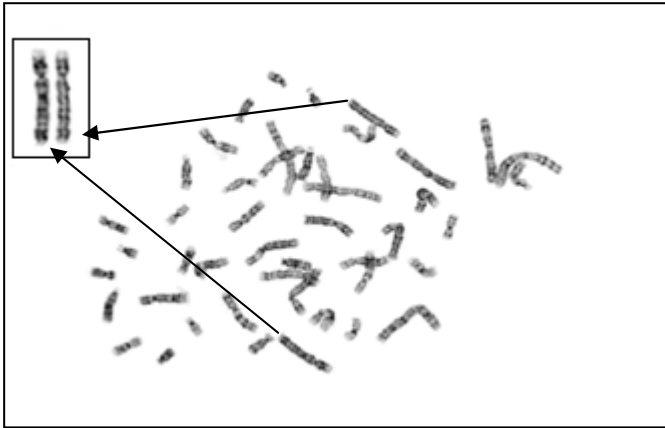
**[46,XY,del(4)(q35).ish del(4)(qter-)]**

Criança do sexo masculino, referenciado à Consulta de Genética aos 14 meses de idade, por atraso desenvolvimento psicomotor, dismorfias e crises convulsivas (controladas com valproato de sódio). Terceiro filho deste casal, saudável e não consanguíneo. Tem 2 irmãos saudáveis. Mãe com história de dois abortamentos espontâneos no primeiro trimestre. Na história familiar a salientar primo paterno em primeiro grau com epilepsia e atraso ligeiro e terceiro primo, materno, já falecido com DC e anomalias ("Síndrome Down").

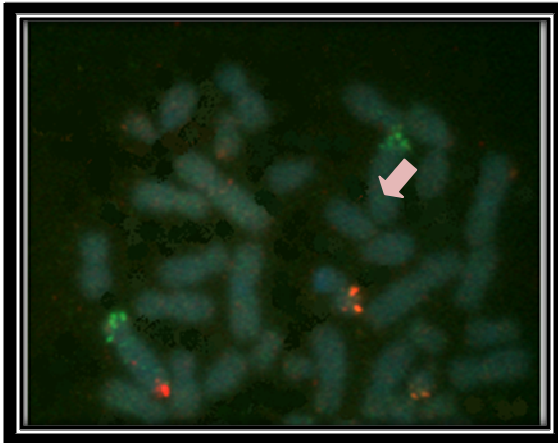
Gestação complicada por metrorragias no primeiro trimestre, sem outros problemas. Parto eutócico de termo, sem necessidade de reanimação. PNN sem problemas. Evolução do peso, estatura e PCef no P75. ADPM global moderado. Fenotipicamente a referir face peculiar sem macrocefalia. Estrabismo intermitente. Hipotonia global com ROT's normais. Dismorfia facial com face larga e longa, sobrancelhas arqueadas, largas e esparsas no 1/3 externo, fronte alta, glabella proeminente, cabelo recuado, bico viúva; hipertelorismo, pavilhões auriculares displásicos, de baixa implantação com curva hélice muito enrolada, boca pequena em tenda, filtro longo, ponte nasal achatada, narinas pequenas, ponta nasal globosa, columela rasa. Pescoço curto e largo, discreta micrognatia. Criptorquidia direita. Ânus anterior. Mãos grandes com dedos longos, sem hiperlaxidez.

O estudo citogenético com bandas de alta resolução foi normal (Figura 20). Aplicando a técnica FISH com sondas subteloméricas detectou-se uma deleção no braço longo do cromosoma 4 (Figura 21).

O estudo dos progenitores foi normal.



**Figura 20** - Metáfase com bandas GTG. Caixa com os dois cromossomas 4 emparelhados em que não é possível observar a deleção num dos cromossomas 4.



**Figura 21** - Metáfase parcial com sondas subtelo méricas para os cromossomas 4 (p a verde e q a vermelho) e 21q (a vermelho). A seta assinala o cromossoma 4 com deleção (não há marcação a vermelho)

## Comentários

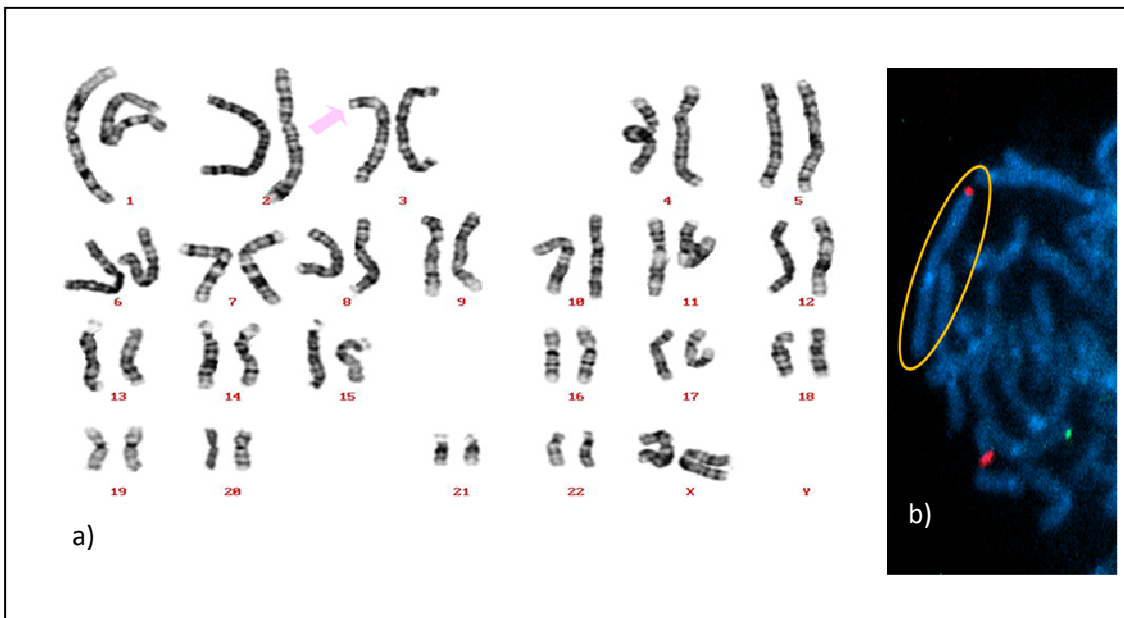
A monossomia 4q é uma alteração cromossómica rara, com grande variabilidade clínica e fenotípica. Esta variabilidade depende em parte do tamanho e localização do segmento duplicado. Além do atraso mental geralmente grave, as anomalias craniofaciais, dos pés e mãos e as dificuldades alimentares são frequentes (Vogt *et al* 2006; Sensi *et al* 2007; South *et al* 2007; Kaalund *et al*, 2008).

- **Caso clínico 6 - Del 3p**

**[46,XX,del(3)(p26.2).ish del(3)(pter-)]**

Grávida de 32 anos, terceira gestação, com antecedentes de um nado morto polimalformado, sem diagnóstico etiológico e um filho de 4 anos com ADPM ligeiro, sem dismorfias importantes (pavilhões auriculares rodados posteriormente, displasicos, hipertelorismo) e com crescimento estatura ponderal normal. História familiar de patologia psiquiática/DC em tio da grávida e primo marido. Realizou amniocentese às 17 semanas de gestação por ansiedade materna.

A análise citogenética de duas culturas de amniócitos independentes, com bandas GTL revelou um cariótipo feminino com suspeita de uma pequena deleção no braço curto do cromosoma 3. Esta alteração foi confirmada por técnica de FISH (sonda subtelo mérica para o cromosoma 3 – VYSIS). É nessa altura referenciado à consulta de Genética. O estudo citogenético e de FISH efectuado ao casal e ao outro filho, (Figura 22), revelou que a mãe e a criança eram igualmente portadoras da deleção. O casal decidiu prosseguir com a gravidez.



**Figura 22** - (a) Cariótipo com bandas GTG. (b) Metáfase parcial com sondas subtelo méricas para o cromosoma 3 (p a verde e q a vermelho). O aro assinala o cromossoma com del3p25 (não há marcação a verde)

## Comentários

O síndrome de deleção 3p, por deleção das bandas p25 a pter, é uma situação genética rara e geralmente associada a anomalias congénitas. Na literatura estão descritos 42 casos e apenas em 2 (mãe e filha), não existem consequências fenotípicas.

No entanto, conforme anteriormente referido, as anomalias subteloméricas nem sempre têm implicações fenotípicas, especialmente quando estão associadas a zonas de densidade génica moderada, sendo difícil estabelecer uma correlação genotipo-fenótipo. Aproximadamente 0,5% de todos os rearranjos subteloméricos (deleções, duplicações e derivados) detectadas com técnicas de FISH são variantes normais sem significado clínico. Assim, antes de diagnosticar uma anomalia telomérica, especialmente nas de pequeno tamanho, é fundamental pensar na possibilidade de se tratar de uma variante do normal. Nesta família o atraso ligeiro que o filho mais velho apresenta, poderá ou não evoluir para défice cognitivo com as respectivas implicações diagnósticas, pelo que se mantém em vigilância na consulta (De Vries *et al*, 2003; Ravnán *et al*, 2006; Barber *et al* 2008; Fernandez *et al* 2008; Shiubs *et al* 2009; Pohjola *et al* 2010).

## 6.4 Discussão Final

Os estudos subteloméricos por FISH ou suas variantes, têm permitido a identificação de novas síndromes e a confirmação ou melhor delimitação citogenética de outras já conhecidas. Ainda há um longo caminho a percorrer na interpretação destas anomalias, nomeadamente: na variabilidade clínica, ocorrência de variantes sem significado patológico e conhecimento sobre o fenótipo das novas síndromes. Assim, a identificação de novos casos e a sua divulgação na literatura, com a descrição da apresentação clínica destas anomalias críticas torna-se de grande importância. São também fundamentais descrições sobre o tamanho das anomalias subteloméricas em crianças com desenvolvimento normal de modo a ser possível determinar quais os loci subteloméricos implicados em DC sindrómico.

A citogenética convencional (apesar do seu baixo poder de resolução), continua a ser a única técnica que permite, visualizando todo o genoma, detectar algumas anomalias cromossómicas subteloméricas e detectar rearranjos como as translocações, no que não pode ser substituída pelo *CGH array*.

A identificação de uma etiologia para o DC permite ao clínico informar a família de forma correcta sobre prognóstico, antecipação de necessidades futuras, aconselhamento genético e, em alguns casos, tratamento específico (ex: terapia de substituição com biotina).

Mesmo na ausência de um diagnóstico específico, a exclusão de algumas patologias genéticas mais frequentemente associadas ao AM é importante para a família.

O diagnóstico de uma anomalia cromossómica subtelomérica tem um impacto imediato em termos de aconselhamento genético em particular no caso de um rearranjo familiar, embora possa ser difícil prever o prognóstico ou o fenótipo esperado.

## VII - CONCLUSÕES

O AM ou DC constitui uma encefalopatia estática com manifestação variável e heterogénea, afectando 2 a 3 % da população geral, com múltiplas etiologias. As alterações teloméricas foram reconhecidas pela primeira vez em 1992 como uma causa importante de DC, confirmando-se desde então que são responsáveis em média por 5% destes casos.

Na pesquisa bibliográfica efectuada não se encontrou referência a estudos epidemiológicos básicos em Portugal, o que impede a correcta caracterização da população com DC e constitui uma importante barreira ao desenvolvimento de políticas de saúde e sociais adequadas.

De acordo com dados do INE, em 2001 foram recenseados 10 356 117 indivíduos residentes em Portugal, dos quais 636 059 são cidadãos com deficiência. Destes, 11.2% foram classificados como afectados de deficiência mental (Fonte: INE, Recenseamento Geral da População 2001).

Todos os doentes com DC (com ou sem anomalias associadas) devem ser investigadas do ponto de vista etiológico.

Finalizado este estudo podemos concluir que:

- A percentagem de alterações subteloméricas encontradas neste estudo, está de acordo com os dados publicados da literatura;
- As anomalias/dismorfias presentes nesses doentes não são específicas e não permitem ainda definir critérios clínicos fiáveis para selecção de candidatos a estes estudos, sendo o DC a característica chave a determinar investigação;
- A utilização de uma *ckecklist* embora útil na selecção dos doentes necessita de reajustes face aos dados mais actuais que demonstram que os desequilíbrios subteloméricos podem estar associados com um fenótipo muito variável;
- Em qualquer das abordagens referidas, o clínico tem um papel chave na avaliação e orientação destes doentes;

- A taxa de detecção de anomalias cromossómicas depende geralmente da gravidade do fenótipo (de acordo com a probabilidade que uma anomalia cromossómica sendo responsável por disrupção complexa do desenvolvimento resulte por exemplo em dismorfias faciais relevantes). No nosso estudo os casos positivos surgiram em doentes com atraso ligeiro a moderado, sem malformações graves. Assim, embora a selecção clínica cuidadosa permita uma maior taxa de detecção, os estudos de citogenética molecular devem ser equacionados, no âmbito de uma consulta de Genética, em todos os doentes com AM e história familiar positiva;
- Embora o tamanho da amostra estudada não tenha permitido estabelecer conclusões estatisticamente significativas, os resultados estão de acordo com o descrito na literatura e permitem reforçar a importância de prosseguir com este tipo de estudos em amostras de maiores dimensões e mesmo a nível nacional com implementação de um registo e definição de um protocolo faseado para estudo de doentes com DC;
- Combinando os resultados do presente estudo com os de um (único) estudo anterior efectuado em Portugal, que envolveu 50 doentes (Pinto *et al*, 2006), foram investigados um total 147 doentes com DC tendo sido identificados 8 (casos index) portadores de alterações subteloméricas (5.44%). A partir destes dados podemos estimar no nosso país um número de indivíduos com DC variando entre 200 000 e 300000 e, destes, entre 10.000 a 16.000 por alterações subteloméricas;
- Enquanto outras tecnologias mais simples e mais rápidas para estudo de anomalias cromossómicas submicroscópicas, não se encontrarem acessíveis ou forem demasiado caras, a técnica de *FISH* utilizada neste estudo deverá ser uma análise de rotina, em segunda linha, para o estudo do atraso mental idiopático;
- A falta de acessibilidade a familiares para serem testados, a penetrância incompleta e a variabilidade clínica das anomalias cromossómicas submicroscópicas são factores condicionantes no diagnóstico clínico destas anomalias. Daí a grande importância de mais descrições na literatura, e da contribuição com a divulgação destes novos casos.

## VIII - PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretendemos no futuro próximo alargar a nossa amostra de estudo de modo a incluir progressivamente todos os doentes com DC idiopático seguidos na consulta de Genética do CHTMAD e do Centro Hospitalar do Porto. Até outros métodos se tornarem acessíveis na prática clínica (incluindo sob o ponto de vista financeiro), a técnica de FISH continuará a ser uma ferramenta importante no estudo de casos seleccionados de AM/ anomalias, bem como na confirmação das alterações detectadas por outras técnicas. Ponderamos, contudo modificar a abordagem metodológica caso se venha a implementar, no Laboratório de Citogenética do CHTMAD, uma técnica menos laboriosa (como o MLPA ou CGH array).

Nos casos com resultado negativo em que do ponto de vista clínico a etiologia cromossómica é muito provável, pretendemos prosseguir com o estudo recorrendo aos *microarrays*.

Pretendemos ainda publicar os casos clínicos descritos nesta tese contribuindo assim para a divulgação do conjunto de fenótipos associados a deleções cromossómicas subteloméricas (em preparação).

Considerando a importância de criar um registo nacional de doentes afectados de DC, de modo a uniformizar o estudo destes doentes e garantir equidade no acesso aos estudos e consultas adequados, fomentar e participar na sua realização, procurando com o apoio da Sociedade Portuguesa de Genética Humana e da Sociedade Portuguesa de Pediatria iniciar esse registo a partir das várias consultas de Genética e Pediatria do país.

## IX - BIBLIOGRAFIA

- Allshire RC, Dempster M, Hastie ND (1989). Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distribution non-randomly. *Nucleic Acids Res*; 17: 4611-27.
- Aten E, den Hollander N, Ruivenkamp C, Knijnenburg J, van Bokhoven H, den Dunnen J, Breuning M (2009). Split hand-foot malformation, tetralogy of Fallot, mental retardation and a 1mb 19p deletion – evidence for heterogeneity? *Am J Med Genet PartA* 149: 975-981.
- Auber B, Bruemmer V, Zoll B, Burfeind P *et al* (2009). Identification of subtelomeric genomic imbalances and breakpoint mapping with quantitative PCR in 296 individuals with congenital defects and/or mental retardation. *Molec Cytogenet* 2:10.
- Baker E, Hinton L, Callen DF *et al* (2002). Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 107: 285-293.
- Ballif BC, Sulpizio SG, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG (2007). The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet PartA* 143A: 1850-1857.
- Barber J (2008). Correspondence. Terminal 3p Deletions: Phenotypic Variability, Chromosomal Non-Penetrance, or Gene Modification?. *Am.J Med Genet A*; 146A:1899-1901.
- Barch M J, Knutsen T, Spurbeck JL (1997). *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual 3rd Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia.
- Battaglia A, Carey JC (2003). Diagnostic Evaluation of developmental delay/ mental retardation: An overview. *Am J Med Genet C (Semin Med Genet)*, 117C:3-14.
- Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-MacGinn D *et al* (2008). Further Delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics*, 121: 404-410.
- Biesecker LG (2002). The end of the beginning of chromosome endings. *Am J Med Genet* 107: 263-266.
- Bocian E, Helias-Rodzewicz Z, Suchenek K *et al* (2004). Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. *Med Sci Monit* 10(4): CR 143-151.
- Brown MG & Lawce, H. J. (1997). *Cytogenetics – Peripheral blood cytogenetic methods*. In: Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3rd Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia.
- Brown WRA, MacKinnon PJ, Villasanté A, Spurr N, Buckle VJ, Dodson MJ (1990). Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 63: 119-32.
- Brueton LA, Barber JC, Huson SM, Winter RM (1989). Partial monosomy 3q in a boy with short stature, developmental delay, and mild dysmorphic features. *J Med Genet* 1989;26:729-730.

- Buiting K, Gross S, Lich C, Farber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Burger J et al (1998). Sporadic imprinting defects in Prader-Willi and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling and prenatal diagnosis. *Am J Human Genet* 63: 170-180.
- Butler MG, Meaney FG, Palmer CG (1986). Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 23: 793-809.)
- Carey AH, Kelly D, Halford S, Wadey R, Wilson D, Goodship J, Burn J, Paul T, Sharkey A, Dumanski J Nordenskjold M, Williamson R, Scambler PT (1992). Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q11 in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 51: 964-970.
- Chapman DA, Scott KG, Mason CA (2002). Early Risk factors for mental retardation: role of maternal age and maternal education. *Am J Mental Retard* 107(1): 46-59.
- Chitayat D, Babul R, Silver MM, Jay V, Teshima IE, Babyn P, Becker LE (1996). Terminal deletion of the long arm of chromosome 3. *Am J Med Genet* 61: 45-8.
- Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, LeppertMF, Keating MT (1993). The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supraaortic stenosis. *Cell* 73: 159-168.
- Cusmano-Ozog, Manning MA, Hoyme E (2007). 22q13.3 Deletion Syndrome.: a recognizable malformation syndrome associated withb marked speech and language delay. *Am J Med Genet* 145C: 393-398.
- de La Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P (1981). A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet* 57: 253-256.
- De Vries BBA, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, van Rijn M, Halley DJ, Sandkuijl LA, Oostra BA, Tibben A, Niermeijer MF (1997). Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* 61:660-7
- De Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OWJ, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcom S, Flint J, Hurst JA, Winter RM (2001). Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 38: 145-150.
- De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C (2003). Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*, 40: 385-398.
- DeScipio C (2007). The 6p Subtelomere Deletion Syndrome. *Am J Med Genet, Part C*, 145C: 377-382.
- DeScipio C, Schneider L, Young TL, Wasserman N, Yaeger D, Lu F, Wheeler PG, Williams MS, Bason L, Jukofsky L, Menon A, Geschwindt R, Chudley AE, Saraiva J *et al.* (2005). Subtelomeric deletions of chromosome 6p: Molecular and cytogenetic characterization of three new cases with phenotypic overlap with Ritscher-Schinzel (3C) syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 134A: 3-11.
- DeScipio C, Spinner NB, Kaur M, Yaeger D, Conlin LK *et al* (2008). Fine-Mapping Subtelomeric Deletions and Duplications by Comparative Genomic Hybridization in 42 Individuals. *Am J Med Genet Part A* 146A: 730-739.

- Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS (1992). A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet* 50: 924-933.
- Drumheller T, McGillivray BC, Behrner D, MacLeod P, Mc Fadden DE, Roberson J, Venditti C, Chorney K, Chorney M, Smith DI (1996). Precise localisation of 3p25 breakpoints in four patients with 3p - syndrome. *J Med Genet* 33: 842-847.
- Ewart AK, Morris CA, Atkinson DL, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT (1993). Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 5: 11-16.
- Falk RE, Casas KA (2007). Chromosome 2q37 Deletion: Clinical and Molecular aspects. *Am J Med Genet Part C*, 145C: 357-371.
- Fernandez TV, Garcia-Gonzalez IJ, Mason CE, Hernández-Zaragoza G *et al.* (2008). Molecular Characterization of a patient with 3p deletion syndrome and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 146A: 2746-2752.
- Flint J, Thomas K, Micklem G *et al* (1997). The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat Genet* 15: 252-7.
- Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG (2007). Monosomy 1p36 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet Part C*, 145 C: 346-356.
- Gruchy N, Jacquemont ML, Lyonnet S, Labrune P, El KameL I, Siffroi JP, Portnoi MF (2007). Recurrent inverted duplication of 2p with terminal deletion in a patient with the classical phenotype of trisomy 2p23-pter. *Am J Med Genet* 15;143A(20):2417-22.
- Harad N, Hatchwell E, Okamoto N *et al* (2004). Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: a rapide detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 41: 130-136.
- Hasting R, Hamer B, Roth S, Lucas M (2008). Partial trisomy 4p resulting from a balanced intrachromosomal insertion, 4(q313p14p16). *Clinical Genetics*, 38(2): 121-25.
- Hengstschlager M, Prusa A, Repa C, Deutinger J, Pollak A, Bernaschek G (2005). Subtelomeric Rearrangements as Neutral Genomic Polymorphisms. *Am J Med Genet* 133A:48-52.
- Hurgoiu V, Suci S (1984). Occurrence of 19p- in an infant with multiple dysmorphic features. *Ann Genet* 27: 56-7.
- Hyun-Kyung P, Hee-Jim K, Hyun-Jun K, Sung-Hee H, Young-Jae K, Sun-Hee K (2008). screening of Subtelomeric Rearrangements in 100 Korean Pediatric patients with Unexplained Mental retardation and Anomalies Using Subtelomeric FISH. *J Korean Med Sci* 23: 573-8.
- Jeevanandam L (2009). Perspectives of intellectual disability in Asia: epidemiology, policy, and services for children and adults. *Curr Opin Psychiatry* 22: 462-468.
- Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE (2001). Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet* 109:440-51.
- Kaalund SS, Møller RS, Tészás A, Miranda M, Kosztolanyi G, Ullmann R, Tommerup N, Tümer Z (2008). Investigation of 4q-deletion in two unrelated patients using array CGH. *Am J Med Genet Part A* 146A:2431-2434.

- Kearney L, Buckle VJ (2001). *The application of fluorescence in situ hybridization to chromosome analysis*. In: Rooney DE. *Human Cytogenetics – Constitutional analysis 3rd Edition*. Oxford University Press.
- Kelley RI, Zackai EH, Emanuel BS, Kinstenmacher M, Greenberg F, Punnett HH (1982). The association of DiGeorge anomaly with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr* 101: 197-200.
- Keren G, Chaki R, Katznelson M, Goldman B (1982). The trisomy 4p syndrome: A case report. *European Journal of Pediatrics*, 138 (3): 273-275.
- Kleefstra T, Koolen DA, Nillesen WM; de Leeuw N, Hamel BC, Veltman JA et al (2006). Interstitial 2.2 Mb deletion at 9q34 in a patient with mental retardation but without classical features of the 9q subtelomeric deletion syndrome. *Am J Med Genet*, 140: 618-623.
- Knight JLS, Flint J (2000). Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37: 401-409.
- Knight SJ, Flint J (2004). The use of subtelomeric probes to study mental retardation. *Cell Biol* 75: 799-831.
- Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J (1999). Subtle chromosome rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354: 1676-1681.
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH *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.
- Krantz ID, Spinner NB (2007). Novel Microdeletions Syndromes. *Am J Med Genet, Part C, 145C*: 323-326.
- Kriek M, White SJ, Bouma Mc *et al* (2004). Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet*: 41: 249-255.
- Lawce, H. J. & Brown, M. G. (1997). *Cytogenetics – An Overview*, In: Barch,
- Ledbetter DH (1992). Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet* 51: 451-456;
- Ledbetter DH, Martin CL (2007). Cryptic telomere imbalance: A 15-year update. *AM J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:327-334.
- Ledbetter DH, Mascarello JT, Riccardi VM, Harper VD, Airhart SI, Strobel RJ. (1982). Chromosome 15 abnormalities and the Prader-Willi syndrome. A follow-up report of 40 cases. *Am J Hum Genet* 34: 278-285.
- Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, Keenan BS; MCarwford JD. (1981). Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* 304: 325-329.
- Leonard H, Wen X (2002). The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millenium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 8:117-134.
- Lichter P, Ward DC (1990). Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature* 345: 93-94.

- Lo-Castro A, Giana G, Fichera C, Grillo L, Musumeci SA, Galasso C, Curatolo P (2009). Deletion 2p25.2: A cryptic chromosome abnormality in a patient with autism and mental retardation detected using aCGH. *European Journal of Medical Genetics*, 52(1): 67-70.
- Lorenz R, Rupprecht E, Tellkamp H (1990). An unusual type of acrocephalosyndactyly with bilateral parietal "encephalocele", micropenis and severe mental retardation. *Am J Med Genet* 36: 265-268.
- Lowery MC, Morris CA, Ewart A, Brothman LJ, Zhu XL, Leonard CO, Carey JC, Keating M, Brothman AR (1995). Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. *Am J Hum Genet* 57: 49-53.
- Martinet D, Filges I, Schumtz NB, Morris MA, Gaide A *et al* (2008). Subtelomeric 6p deletion: clinical and Array-CGH characterization in two patients. *Am J Med Genet Part A*, 146a: 2094-2102.
- Mercadante MT, Evans-Lacko S, Paula CS (2009). Perspectives of intellectual disability in Latin American countries: epidemiology, policy, and services for children and adults. *Curr Opin Psychiatry* 22: 469-474.
- Moeschler JB, Shevell M (2006). Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delay. *Pediatrics*; 117: 2304 - 2316.
- Moeschler, JB (2008). Genetic Evaluation of Intellectual Disabilities. *Semin Pediatr Neurol* 15: 2-9.
- Montgomery K D, Keitges E A, Meyne J (1997). *Molecular Cytogenetics: Definitions, clinical aspects, and protocols*, In: Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3rd Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia.
- Moog U, Arens YHJM, van Lent-Albrechts JCM, Huijts PEA, Smeets EEJ, Schrandt-Stumpel CTRM, Engelen JJM (2005). Subtelomeric chromosome aberrations: still a lot to learn. *Clin Genet* 68: 397-407.
- Mowrey PN, Chorney MJ, Venditti CP, Latif F, Modi WS, Lerman MI, Zber B, Robins DB, Rogan PK, Ladda RL (1993). Clinical and molecular analysis of deletion 3p25-pter syndrome. *Am J Med Genet* 46: 623-629.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS *et al* (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Academy Sci Usa* 85: 6622-6.
- Murray A, Young S, Dennis N, Latsky L, Lineham P, McKechnie N, Macpherson J, Pound M, Jacobs P (1996). Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet*; 5:727-35.
- Neas KR, Chia N, Clarke M, Peters G, Adès LC (2003). A case of partial trisomy 4p syndrome presenting as severe hydronephrosis in utero. *Clin Dysmorphol*, 12(3):179-81.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M (1989). Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 342: 281-285.
- Nickerson E, Greenberg F, Keating MT; McCaskill C, Shaffer LG (1995). Deletions of the elastin gene at 7q11.23 occur in approximately 90% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet* 56: 1156-1161.

- Njenga F (2009). Perspectives of intellectual disability in Africa: epidemiology and policy services for children and adults. *Curr Opin Psychiatry* 22: 457-461.
- Oorthuys J W Gerssen-Schoorl , K B, de Pater J M, de France H F (1989). A third case of de novo partial trisomy 4p. *J Med Genet*,26(5): 344-345).
- Oostlander AE, Meijer JA, Ylstra B (2004). Microarray–based comparative hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet*: 66: 488-4956.
- Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Aminosos 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: 228-233.
- Pinto MR; Lima MR; Fortuna AM; Mota MC; Silva MLF; Teles NO; Freitas MMM (2006). Aplicação de uma Técnica Inovadora de FISH na Investigação do Atraso Mental Idiopático. *Arquivos de Medicina*, 20(1-2): 19-24.
- Pivalizza P, Miller G. Intellectual Disability (mental retardation) in children: definition, causes and diagnosis. Evaluation. Management, outcomes and prevention (2009). Uptodate ([www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)).
- Pohjola P, de Leeuw N, Penttinen M, Kääriäinen H (2010). Terminal 3p deletions in two families–correlation between molecular karyotype and phenotype. *Am J Med Genet A*.152A(2):441-6.
- Potocki L, Shaffer LG (1996). Interstitial deletion of 11 (p11.2p12): A newly described contiguous gene deletion syndrome involving the gene for hereditary multiple exostoses (EXT2). *Am J Med Genet* 62: 319-325.
- Priest JH (1997). *General cell culture principles and fibroblast culture*. In: Barch, MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3rd Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia.
- Rajcan-Separovic E, Harvard C, Liu X, McGillivray B, Hall JG, Qiao Y, Hurlburt J, Hildebrand J, Mickelson EC, Holden JJ, Lewis ME (2007). Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. *J Med Genet*44(4):269-76.
- Rauch A, Dorr HG (2007). Chromosome 5q subtelomeric deletion syndrome. *Am J Med Genet, Part C*, 145C: 372-376.
- Rauch A, Hoyer J, Guth Sabine *et al* (2006). diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 140A: 2063-2074.
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrik J, Eash D, Ledbetter DH; Martin CL (2006). Subtelomere FISH analysis of 11688 cases. An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43: 478-489.
- Riegel M, Baumer A, Jamar M *et al* (2001). Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 109: 286-294.

- Roberts AE, Cox GF, Kimonois V, Lamb A, Irons M (2004). Clinical Presentation of 13 patients with subtelomeric rearrangements and a review of the literature. *Am J Med Genet* 128A: 352-363.
- Rodríguez L, Martínez-Fernández ML, Mansilla E, Mendioroz J, Arteaga RM, Toral JF, Guardia NM, García A, Centeno F, Pantoja J, Jovani C, Martínez-Frías ML (2008). Screening for subtelomeric chromosome alteration in a consecutive series of newborns with congenital defects. *Clin Dysmorphol* 17(1):5-12.
- Rodriguez-Reventa L, Badenas C, Sánchez A, Mallolas J *et al* (2004). Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet* 65:17-23.
- Rooms L, Reyniers E, Kooy F (2005). Subtelomeric Rearrangements in the Mentally Retarded: A comparison of detection Methods. *Human Mutation* 25: 513-514.
- Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Lwijk R, Scheers S *et al* (2006). Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet* 69: 58-64.
- Rooney D E, Czepulkowski BH (1986). *Human Cytogenetics: a practical approach*. IRL Press Ltd, Oxford.
- Rossi E, Piccini F, Zolino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R *et al* (2001). Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 38: 417-20.
- Schaefer GB, Bodensteiner JB (1992). Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. *Pediat Clin of North Am*;39:929-43.
- Sensi A, Prontera P, Buldrini B, Palma S, Aiello V, Gruppioni R, Calzolari E, Volinia S, Martini A (2007). Cytogenetic and array CGH characterization of an intrachromosomal complex rearrangement of 4q in a patient with a 4q-phenotype. *Am J Med Genet Part A* 146A:110-115.
- Shaffer LG (2005). American College of Medical Genetics Professional Practice and Guidelines Committee. Guideline on evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med* 7: 650-654.
- Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC (2007). The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetics methods of the past, new Technologies for the future. *Am J Med Genet Part C Seminar Med Genet* 145C: 335-345.
- Shaffer LG, Hecht JT, Greenberg F (1993). Familial interstitial deletion 11 (p11.12p12) associated with parietal foramina, brachymicrocephaly and mental retardation. *Am J Hum Genet* 45: 581-583.
- Shao L, Shaw CA, Lu X-Y, Sahoo T, Bacino A, Lalani SR, Stankiewicz P *et al* (2008). Identification of Chromosomal Abnormalities in Subtelomeric Regions by Microarray Analysis: A Study of 5.380 cases. *Am J Med Genet Part A* 146A: 2242-2251.
- Shevell L, Ashwal, S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Masjnemer A, Noetzel M, Sheth RD (2003). Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of

- Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 60: 367-380.
- Shuib S, McMullan D, Rattenberry E, Barber RM, Rahman F, Zatyka M, Chapman C, Macdonald F, Latif F, Davison V, Maher ER (2009) . Microarray based analysis of 3p25-p26 deletions (3p- syndrome). *Am J Med Genet A*. 149A(10):2099-105.
- Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S *et al* (1999). Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for chromosome telomeres. *J Med Genet* 36 405-11.
- Sogaard M, Tumer Z, Hjalgrim H, Hahnemann J *et al* (2005). Subtelomeric study of 132 patients with mental retardation reveals 9 chromosomal anomalies and contributes to the delineation of submicroscopic deletions of 1pter, 2qter, 4pter, 5qter and 9qter. *BMC Medical Genet* 6: 21.
- South ST, Bleyl SB, Carey JC (2007). Two unique patients with novel microdeletions in 4p16.3 that exclude the WHS critical regions: Implications for critical region designation. *Am J Med Genet Part A* 143A:2137-2142.
- Spranger S, Mehl B, Wagner M *et al* (2002). Subtelomeric screening in clinical practice. *Med Genet*: 14. A251
- Stewart R, Kleefstra T (2007). The Chromosome 9q Subtelomere Deletion Syndrome. *Am J Med Genet, Part C*, 145C: 383-392.
- Strømme P, Valvatne K (1998). Mental retardation in Norway: prevalence and sub-classification in a cohort of 30 037 children born between 1980 and 1985. *Acta Paediatrica*, vol 87, 3: 291-296.
- Stewart DR, Huang A, Ravelli F, Anderlid BM, Medne L, Ciprero K *et al* (2004). Subtelomeric deletions of chromosome 9q: a novel microdeletion syndrome. *Am J Med Genet* , 128: 340-351.
- Szymanski L, King BH (1999). Practice parameters for the assessment and treatment of children, adolescents and adults with mental retardation and comorbid mental disorders. American Academy of Child and Adolescent Psychiatry Working Group on quality Issues. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*; 38:5S.
- Tamarin RH (2002). *Principles of Genetics 7th Edition*. McGraw-Hill. NewYork.
- Trask, B. J. (1991). *Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping*. *T.I.G* 7: 149-154.
- Tschernigg M, Petek E, Wagner K, Kroisel PM (2002). Mild phenotype due to inverse duplication 4p16.3 - P15.3 including the Wolf-Hirschhorn critical region. *Genet Couns*. 2002;13(1):29-33.
- Van Karnebeek CDM, Koevoets C, Sluijter S *et al* (2002). Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown etiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet*; 39: 546-553.
- Veltman JA, Schoenmakers EFPM, Eussen BH *et al* (2002). High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array- based comparative genomic hybridization. *Am J Human Genetic*: 70: 1269-1276.
- Verma RS, Babu A (1995). *Human Chromosomes – Principles and Techniques 2nd Edition*. McGraw-Hill. USA.

- Vogt J, Ryan E, Tischkowitz MD, Reardon W, Brueton LA (2006). The tale of a nail sign in chromosome 4q34 deletion syndrome. *ClinDysmorphol*.Jul;15(3):127-32.
- Wilkie AO (1993). Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: a general strategy using hypervariable subtelomeric DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet*: 53: 688-701.
- Xu J and Chen Z (2003). Advances in Molecular Cytogenetics for the Evaluation of Mental Retardation. *Am J Med Genet Part C (Semin Med Genet)*, 117C: 15-24.
- Yu S, Baker E, Hinton L, Eyre HJ, Waters W, Higgins S, Sutherland GR, Haan E (2005). Frequency of truly cryptic subtelomere abnormalities - a study of 534 patients and literature review. *Clin Genet* 68: 436-441.
- Zhang YL, Dai Y, Tu ZG, Li QY (2010). 'Pure' Partial Trisomy 4q26-->q35.2 Resulting from a Familial Unbalanced Translocation t(4;10)(q26;q26.3). *Cytogenet Genome Res*. Feb 9. [Epub ahead of print].

## ANEXOS



## Projecto Investigação Aplicada na Área de Cuidados de Saúde



### COMISSÃO DE FOMENTO DA INVESTIGAÇÃO EM CUIDADOS DE SAÚDE CONCESSÃO DE PRÉMIO DE INVESTIGAÇÃO

PROJECTO n.º 5/2007

**TÍTULO:** Detecção de arranjos subteloméricos pela técnica FISH em doentes com atraso mental idiospático da região de Trás-os-Montes

**INVESTIGADOR RESPONSÁVEL:** Dra. Maria do Rosário Lima Viseu Carvalho Pinto Leite

**INSTITUIÇÃO À QUAL ESTÁ VINCULADO:** Centro Hospitalar Vila Real/Peso da Régua, E.P.E.

**VALOR DO PRÉMIO:** 5.000,00 €

**PRAZO:** 12 meses com início na data de pagamento do prémio

**RELATÓRIO DE EXECUÇÃO FINANCEIRA:** até ao último dia do prazo

**COMPROMISSO:** Nos termos do Edital de abertura deste concurso n.º 388/2005, publicado no DR II Série, n.º 42 de 01/03/2005 e da rectificação n.º 931/2005 publicada no DR II Série, n.º 104 de 31/05/05. O Investigador premiado assume o compromisso de publicar os resultados da investigação premiada em revista científica com a menção expressa de “trabalho premiado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde, Ministério da Saúde P.I. n.º.5/2007” devendo remeter à Comissão dois exemplares, juntamente com o relatório de prestação de contas.

O investigador premiado declara que se responsabiliza pelo cumprimento deste compromisso.

Lisboa, 21. SET. 2007

O Presidente do INSA, I.P.

O Investigador

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE Av.º Padre Cruz  
Dr. RICARDO JORGE 1649-016 Lisboa, Portugal

Tel. +351 217 519 200  
Fax +351 217 526 400

info@insa.min-saude.pt  
www.insa.pt

Título: ” **Deteção de rearranjos subteloméricos pela técnica FISH em doentes com atraso mental idiopático da região de Trás-os-Montes**”

Área de Investigação: **3.1.1 - EPIDEMIOLOGIA CLÍNICA**

**Candidatura a um projecto de trabalho de investigação aplicada na área cuidados de saúde determinada na alínea 3.1.1 – Epidemiologia Clínica, nos termos do disposto no editorial n.º 388/2005, (2ª Série), páginas 3120 e 3121, publicado no DR- II Série n.º 42 de 01 de Março de 2005.**

### **3.2.2- Resumo Estruturado do Projecto**

**Introdução:** O atraso mental é uma condição que afecta entre 1 a 3% da população geral. A etiologia do atraso em 50% dos casos não tem diagnóstico, estando associado a causas variáveis incluindo factores ambientais, anomalias cromossómicas e doenças monogénicas. Recentemente foi associado o atraso mental a anomalias submicroscópicas das regiões subteloméricas dos cromossomas.

**Objectivo:** Estudar, pela técnica FISH ( Fluorescent *in situ* Hybridization), doentes com atraso mental idiopático associado a características dismórficas e/ou malformações congénitas e/ou história familiar de atraso mental, da região de Trás-os-Montes, iniciando uma área de trabalho numa zona geograficamente afastada dos grandes centros médicos e possibilitando aos doentes o acesso aos mesmos parâmetros de avaliação existentes nos grandes centros de genética.

**Material e Métodos:** Pretende-se aplicar a técnica FISH, com sondas subteloméricas, para tentar identificar a causa do atraso mental em aproximadamente 25 doentes em que a investigação efectuada foi negativa. Serão aplicadas as técnicas de rotina do laboratório para a obtenção de metafases. Para a aplicação da técnica FISH vão ser utilizadas sondas específicas para as regiões subteloméricas dos cromossomas. As sondas são comerciais e vão ser adquiridas as que permitem obter melhores sinais de hibridização.

**Anexo II**  
**Divulgação de Resultados**

**Apresentações**  
**Trabalhos enviados para publicação**

## **Divulgação de Resultados**

### **I - Apresentações em Reuniões Científicas**

#### **1. XXXIV Jornadas da Sociedade Portuguesa de Genética**

Lisboa, Abril de 2009

"Detecção de arranjos subteloméricos pela técnica FISH em doentes com atraso mental idiopático da região de Trás-os-Montes"

Rosário Pinto Leite, Marta Souto, Pedro Botelho, Márcia Martins, Eufémia Ribeiro

##### **Comunicação Oral**

*Abstract* publicado in "Arquivos Portugueses das Ciências Biológicas" - Tomos XXX e XXXI, 2009.

#### **2. European Human Genetics Conference 2009**

Viena - Austria, Maio 2009

"Subtelomeric rearrangements in patients with idiopathic mental retardation"

Rosário Pinto Leite, Marta Souto, Pedro Botelho, Márcia Martins, Eufémia Ribeiro

##### **Poster**

*Abstract* publicado in "European Journal of Human Genetics", Vol 17, supplement 2, May 2009.

## **II - Publicações**

1. Artigo aceite para publicação in **"Progresos en Diagnóstico y Tratamiento Prenatal"**

**Anomalías teloméricas: cuidado con las variantes de la normalidad sin efecto fenotípico.**

**Telomeric anomalies: warning with normal variants without phenotypic effects.**

**Pinto Leite R<sup>1</sup>, Lloveras E, Martins M<sup>1</sup>, Barranco L, Severo R<sup>1</sup>, Palau N, Moutinho O<sup>1</sup>,  
Ribeiro E<sup>1</sup>, Herrero M, Català V, Plaja A**

1 - Serviço de Genética/CDPN, Centro Hospitalar de Tras-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

2 - Departament de Citogenètica General Lab Laboratoris d'Anàlisi Barcelona.

3 - Unitat de Genètica Clínica i Citogenètica de l'Hospital Materno infantil de la Vall d'Hebron.

2. Enviado para publicação in **"Revista Nascer e Crescer"**

**Detecção de Rearranjos Subteloméricos pela técnica FISH em doentes com atraso mental idiopático**

**Subtelomeric FISH analysis in patients with idiopathic mental retardation**

**Martins M<sup>1</sup>, Soares I<sup>2</sup>, Pereira A<sup>2</sup>, Gonçalves J<sup>3</sup>, Pereira F<sup>4</sup>, Marques J<sup>4</sup> Moutinho O<sup>1</sup>,  
Souto M<sup>1</sup>, Botelho P<sup>1</sup>, Ribeiro E<sup>1</sup>, Pinto Leite R<sup>1</sup>**

## **1. Anomalías teloméricas: cuidado con las variantes de la normalidad sin efecto fenotípico.**

### **RESÚMEN**

Las reorganizaciones subteloméricas en los cromosomas humanos son una causa importante de retraso mental. Sin embargo, su interpretación se ve complicada por la existencia de variantes de la normalidad.

Presentamos dos casos de anomalías teloméricas sin efectos fenotípicos: una deleción telomérica 3p detectada prenatalmente y una deleción 2p secundaria a una adición de material heterocromático detectada postnatalmente.

### **PALABRAS CLAVE**

retraso mental, deleciones subteloméricas, FISH.

### **ABSTRACT**

Subtelomeric rearrangements in human chromosomes are a major cause of mental retardation.

However, their interpretation is complicated by the existence of variants of normal.

We report two cases of telomeric abnormalities without phenotypic effects: a telomeric 3p deletion detected prenatally and a 2p deletion secondary to an addition of heterochromatic material detected postnatally.

### **KEY WORDS**

mental retardation, subtelomeric deletions, FISH.

### **Introducción**

El retraso mental es un problema sanitario de primer orden, ya que afecta a un 3% de la población general (Flint y Wilkie, 1996). Las técnicas de citogenética convencional detectan anomalías numéricas y estructurales de más de 5 Mb en un 9-36% de estos pacientes (Schreppers-Tijdink y col., 1988) (Stevenson y col., 1996).

Utilizando zonas repetitivas del DNA denominadas VTNR (Variable Tandem Number Repeat), Flint y colaboradores (1995) demostraron que aproximadamente un 6% pacientes con retraso mental y/o retraso de crecimiento muestran reorganizaciones subteloméricas no visibles con técnicas de cariotipo convencional. La tecnología utilizada es de difícil aplicación fuera del contexto de investigación, pero en 1997 Knight y colaboradores desarrollaron un ensayo de FISH con 41 sondas subteloméricas apto para un uso de rutina y detectaron reorganizaciones

subteloméricas en un 7,4% de los pacientes con retraso mental moderado o severo de etiología desconocida, estimando su incidencia en la población general en un 2,1/10.000 (Knight y col, 1999).

Recientemente se han propuesto tecnologías alternativas, tales como la amplificación múltiple dependiente de ligasa (MLPA) (Koolen y col., 2004) (Rooms., 2004), o los CGH array (Pinkel y col, 1998) (Ylstra y col., 2006) (Friedman y col, 2008).

Sin embargo, las anomalías subteloméricas no siempre tienen implicaciones fenotípicas, especialmente cuando están asociadas a zonas de densidad génica moderada, siendo la difícil establecer la correlación entre el genotipo y el fenotipo (de Vries et al, 2003). Aproximadamente un 0,5% de todas las reorganizaciones subteloméricas (deleciones, duplicaciones y derivados) detectadas con técnicas de FISH podrían ser variantes de la normalidad desprovistas de significado clínico (Ravnan et al., 2006).

Presentamos dos casos de anomalías teloméricas sin efectos fenotípicos: una deleción telomérica 3p detectada prenatalmente y una deleción 2p secundaria a una adición de material heterocromático detectada postnatalmente.

## **MÉTODOS**

**Caso clínico 1:** Gestante de 32 años, (tercigesta, dos recién nacidos) IIIIGIIP, con un recién nacido polimalformado muerto y un niño sano en la que se efectúa una amniocentesis a las 17 semanas de gestación.

El análisis citogenético de dos cultivos independientes de amniocitos con bandas GTL [Verma and Babu , 1995] muestra un cariotipo femenino con una pequeña deleción en el brazo corto del cromosoma 3, a nivel de la banda p25. La anomalía se confirma mediante la técnica de FISH (sonda subtelomérica para el cromosoma 3 – VYSIS). Se realiza el estudio citogenético y de FISH a la pareja y el otro hijo, demostrándose que son portadores de la misma deleción subtelomérica..

**Caso clínico 2:** Varon de 34 años estudiado debido a infertilidad con inteligencia y fenotipo normales y sin antecedentes relevantes. El estudio realizado en sangre periférica realizado con bandas G y C de acuerdo a los protocolos publicados en la literatura [Verma and Babu , 1995] mostró una adición de material heterocromático en el extremo del brazo corto del cromosoma 2 en las quince metafases analizadas. Para descartar una translocación con el cromosoma Y que pudiera determinar un riesgo de descendencia cromosómicamente desequilibrada se realizó un estudio de FISH con sondas VYSIS con los protocolos suministrados por el fabricante que demostró una deleción subtelomérica en el brazo pequeño del cromosoma 2. No fue posible el estudio de los progenitores del paciente.

## DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Flint y colaboradores (1995) demostraron que las reorganizaciones subteloméricas en los cromosomas humanos son una causa importante de retraso mental. Sin embargo, su interpretación se ve complicada por el hallazgo ocasional de reorganizaciones teloméricas cuya compatibilidad con un fenotipo normal obliga a catalogarlas de variantes de la normalidad. En este contexto, es importante validar siempre con un estudio familiar las anomalías subteloméricas detectadas FISH, MLPA u otros métodos y comunicar los nuevos hallazgos a fin de poder establecer un catálogo de posibles variantes de la normalidad. Este tipo de información es especialmente útil en el contexto del diagnóstico prenatal.

Presentamos dos pacientes con anomalías subteloméricas sin efectos fenotípicos: una deleción telomérica 3p detectada prenatalmente y una deleción 2p secundaria a una adición de material heterocromático detectada postnatalmente.

Las deleciones de la banda 3p25 se asocian retraso mental, retraso de crecimiento, hipotonía, polidactilia, anomalías renales, gastrointestinales y cardíacas (Fernandez et al., 2008). La variabilidad fenotípica observada en estos pacientes se ha explicado como una consecuencia de las diferencias en el tamaño de la deleción (Barber,2008). La deleción 3p detectada en nuestros pacientes ha sido detectada mediante citogenética convencional, lo que implica un tamaño superior a 5 Mb. La ausencia de efecto fenotípico de una anomalía citogenética de este tamaño es difícil de explicar, si bien existen precedentes: Balikova y col, 2007, describen una anomalía superior a 7 Mb que implica más de 70 genes en individuos normales.

La aparente falta de efecto fenotípico en anomalías de gran tamaño se puede explicar mediante varios mecanismos. En primer lugar es bien conocida la variabilidad en la expresión fenotípica que presentan muchos de las deleciones/duplicaciones recurrentes como la asociada a la región 22q11.2 (McDonald-McGinn y col., 2001) o la región 1q21.1 (Mefford y col, 2008). Una segunda posibilidad es que la deleción desenmascare una mutación recesiva presente sólo en alguno de los portadores [Lesnik Oberstein et al., 2006]. Finalmente, la presencia de un mosaicismo somático o modificaciones epigenéticas pueden explicar las diferencias fenotípicas entre pacientes.

De forma muy infrecuente deleciones terminales del brazo corto del cromosoma 3 pacientes fenotípicamente normales (Balikova et al 2007).

Las deleciones terminales del brazo pequeño del cromosoma 2 son muy infrecuentes y hasta el momento no se han descrito deleciones en individuos con fenotipo normal (Balikova et al 2007). En un caso con un anillo del cromosoma 2 y deleción 2p, el paciente presentaba dismofias leves, retraso de crecimiento, microcefalia y retraso mental [Dee et al., 2001]. Parte de la sintomatología puede deberse a la presencia del anillo (síndrome del anillo) (Kosztolányi, 1987). Mas recientemente, la deleción 2p ha sido descrita en dos pacientes (Ravnan et al., 2006), una hembra con un fenotipo similar al síndrome de Angelman y un varón con retraso de

desarrollo y dismorfias. Nuestro caso es un varón adulto de inteligencia normal con problemas de fertilidad. En ausencia de estudios familiares es difícil demostrar o descartar una relación entre la deleción y la infertilidad del paciente. Sin embargo, esta relación es altamente improbable ya que la presencia de grandes bloques de heterocromatina en el brazo pequeño de los cromosoma 15 y 22 es una característica frecuente y desprovista de consecuencias clínicas (Gardner y Shuterland, 2004).

En conclusión, antes de diagnosticar una anomalía teloméricas, especialmente las de pequeño tamaño, es de suma importancia tratar de descartar la posibilidad de una variante de la normalidad.

El procedimiento más habitual incluye el estudio de los progenitores con el doble objetivo de descartar una variante de la normalidad heredada y detectar la presencia de translocaciones que pudiera determinar un riesgo de recurrencia en posteriores gestaciones.

## **BIBLIOGRAFIA**

Adeyinka A, Adams SA, Lorentz CP, Van Dyke DL, Jalal SM. Subtelomere deletions and translocations are frequently familial. *Am J Med Genet A*. 2005; 135(1):28-35.

Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjold M. Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet*. 2002; 107(4):275-84.

Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C, Thienpont B, Urbina M, Doco-Fenzy M, de Rademaeker M, Portier G, Kooy F, Den Ende J, Devriendt K, Fryns J-P, Speleman F, Vermeesch J R. Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals *Hum Mut*. 2007; 28: 958-967.

Barber J. *Correspondence* Terminal 3p Deletions: Phenotypic Variability, Chromosomal Non-Penetrance, or Gene Modification?. *Am.J Med Genet A*. 2008; 146A:1899-1901

Bocian E, Helias-Rodzewicz Z, Suchenek K, Obersztyn E, Kutkowska- Kazmierczak A, Stankiewicz P, Kostyk E, Mazurczak T. Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. *Med Sci Monit*. 2004; 10(4):CR143-51.

Dalton KL and Abbott M-A. A mother and son with an isolated 6q subtelomere deletion and comparison to other reported cases. 2008. Poster at Am College of Med Genet annual meeting, March 13-16, 2008, Phoenix, Az.

De Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OWJ, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med*

Genet. 2001; 38:145-150.

De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet.* 2003; 40:385-398.

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

Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006; 79:500–13.

Gardner R. J. M. and Sutherland G. R., *Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling* (3rd Edition, Oxford University Press (2004).

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

Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* 1999; 354:1676-1681.

Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MHA et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004; 41: 892–899.

Lesnik Oberstein SA, Kriek M, White SJ, Kalf ME, Szuhai K, den Dunnen JT, Breuning MH, Hennekam RC. Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALTL, a putative glycosyltransferase. *Am J Hum Genet.* 2006. 79:562–566.

McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med.* 2001; 3: 23–9

Mefford H C, Sharp A J, Baker C, Itsara A, Jiang Z., Karen Buysse K y col. Recurrent Rearrangements of Chromosome 1q21.1 and Variable Pediatric Phenotypes. *N Engl J Med.* 2008; 359: 1685–1699.

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20:207–11.

Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. 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.* 2006; 43:478- 489.
- Rooms L, Reyniers E, van Luijk R et al. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat* 2004; 23: 17–21.
- Samanich JM, Carter SM, Delgado S, Pope KO, Shanaham M, Suri V, Dar P, Gross SJ. Ascertainment of terminal deletion of chromosome 5p in a mother, son and fetus; cytogenetic and clinical findings. *Am College of Medical Genetics annual meeting, Poster #128, March 13-26, 2008.*
- Schreppers-Tijdink GA, Curfs LM, Wiegers A, Kleczkowska A, Fryns JP. A systematic cytogenetic study of a population of 1170 mentally retarded and/or behaviourally disturbed patients including fragile X-screening. The Hondsberg experience. *J Genet Hum.* 1988; 36:425–446.
- Shaffer LG. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual developmental delay or mental retardation. *Genetics In Medicine.* 2005; 7(9):650-654.
- Stevenson RE, Massey PS, Schroer RJ, McDermott S, Richter B. Preventable fraction of mental retardation: analysis based on individuals with severe mental retardation. *Ment Retard.* 1996; 34:182–188.
- Thomas V. Fernandez. et al. Molecular Characterization of a Patient With 3p Deletion Syndrome and a Review of the Literature. *Am.J Med Genet A.* 2008; 146A:2746-2752.
- Knight LA, Yong MH, Tan M, Ng ISL., 1995. Del(3)(p25.3) without phenotypic effect. *J Med. Genet* 30:613.
- Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G, Sitska M, Utermann B, Viertel P, Kalscheuer V and others. Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. *Am J Med Genet A.* 2004; 128(4):364-73.
- Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 2006;34:445–50.

## 2. Detecção de Rearranjos Subteloméricos pela técnica FISH em doentes com atraso mental idiopático

### Subtelomeric FISH analysis in patients with idiopathic mental retardation

Martins M<sup>1</sup>, Soares I<sup>2</sup>, Pereira A<sup>2</sup>, Gonçalves J<sup>3</sup>, Pereira F<sup>4</sup>, Marques J<sup>4</sup>, Moutinho O<sup>1</sup>, Souto M<sup>1</sup>, Botelho P<sup>1</sup>, Ribeiro E<sup>1</sup>, Pinto Leite R<sup>1</sup>

1 - Serviço de Genética/CDPN, Centro Hospitalar de Tras-os-Montes e Alto Douro, EPE

2 - Serviço de Pediatria, Centro Hospitalar de Tras-os-Montes e Alto Douro, EPE

3 - Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Centro Hospitalar de Tras-os-Montes e Alto Douro, EPE

4 - Serviço de Pediatria, Centro Hospitalar do Nordeste, EPE

#### Resumo:

Background: O Défice Cognitivo (DC) afecta cerca de 1 a 3% da população geral e continua a ser um problema importante em Saúde Pública, quer pela sua prevalência, quer pela necessidade cuidados especiais que acarreta. Estima-se que cerca de metade dos casos sejam devidos a causas genéticas, sendo os rearranjos crípticos das regiões subteloméricas dos cromossomas responsáveis por cerca de 5 a 7% dos casos de DC idiopático.

Métodos: Foi efectuado o estudo de rearranjos subteloméricos por técnica FISH a 97 doentes com défice cognitivo/ADPM associado a anomalias congénitas/dismorfias faciais, sem diagnóstico etiológico (com estudo, incluindo cariótipo convencional, normal). A selecção clínica baseada na *checklist* de De Vries.

Resultados: Em seis doentes foram identificadas anomalias cromossómicas crípticas (6,19%), 4 de novo (3 deleções - 19p, 2p e 4q e uma duplicação 4p) e 2 casos familiares (delecção 3p e deleção 3q).

Conclusões: A avaliação clínica criteriosa é uma ferramenta essencial na selecção de doentes para estudo por técnicas de citogenética molecular, aumentando a taxa de detecção de anomalias cromossómicas. A técnica FISH continuará a ser uma ferramenta útil no rastreio de anomalias cromossómicas submicroscópicas, até o cariótipo molecular tornar-se corrente e financeiramente viável na prática clínica.

Palavras Chave: défice cognitivo, rearranjos subteloméricos, técnica FISH

**Abstract:**

Background: Intellectual Disability (ID) affects approximately 1 to 3% of the general population and remains a major problem in public health due to its prevalence and the need for special care. It is estimated that about half of cases are due to genetic causes, and the cryptic rearrangements of the subtelomeric regions of chromosomes responsible for about 5 to 7% of cases of idiopathic DC.

Methods: We performed subtelomeric FISH analysis on 97 patients with developmental delay or intellectual disability, associated with congenital malformations, facial dysmorphisms with previous normal investigation (including conventional karyotype,). The selection was based on De Vries on clinical checklist.

Results: Six cryptic chromosomal anomalies have been identified in the cohort (6,19%), 3 *de novo* deletions (19p, 2p e 4q) and one *de novo* duplication (4p) and two familial cases (one deletion 3p and one 3q).

Conclusions: Careful clinical evaluation is an essential tool in selecting patients for study by molecular cytogenetic techniques, increasing the detection rate of chromosomal abnormalities. FISH is still a very useful screening tool until molecular karyotyping becomes current and financially feasible in the clinical practice.

Key words: intellectual disability, subtelomeric rearrangements, FISH technique

**Introdução:**

O atraso mental ou défice cognitivo (DC), é uma encefalopatia estática de múltiplas etiologias, com manifestação variável e heterogénea. É uma situação relativamente comum que afecta 1 a 3% da população geral. Continua a ser um problema importante em Saúde Pública, quer pela sua prevalência, quer pela necessidade cuidados especiais que acarreta. Estima-se que cerca de metade dos casos sejam devidos a causas genéticas (1-3). A trissomia 21 e o Síndrome de X Frágil com prevalências de 5 a 16% e 1 a 2% respectivamente, são as causas genéticas conhecidas mais frequentes de DC (4).

As anomalias cromossómicas são a causa mais frequente de défice cognitivo e os rearranjos crípticos nas regiões subteloméricas, ricas em genes, são uma das principais causas de anomalias congénitas múltiplas e atraso mental, sendo detectados em 5 a 7% destes doentes. Estas alterações são indetectáveis pelas técnicas convencionais de bandagem cromossómica, quer pelo seu tamanho submicroscópico quer pela similaridade dos segmentos envolvidos. Vários métodos têm vindo a ser desenvolvidos nos últimos anos para aumentar a taxa de detecção de anomalias cromossómicas subtis. Baseados em técnicas de *FISH* (hibridação fluorescente *in situ*), *PCR* (reação da polimerase em cadeia) e, mais recentemente, em *microarrays*, os estudos que inicialmente eram dirigidos às regiões subteloméricas, rapidamente se desenvolveram de modo a abranger a totalidade do genoma. (5,6,7). A presença de anomalias congénitas, dismorfias, atraso de crescimento pré e pós natal e história familiar positiva pode ser observada na maioria dos doentes portadores destas anomalias. A pré selecção clínica

destes doentes melhora a taxa de detecção, sendo sugerido o uso de *check lists* como a de De Vries et al (Figura 1) (6,8). Além disso o estudo da correlação genótipo-fenótipo destas anomalias tem permitido a definição de novos fenótipos cromossómicos (9).

## **Doentes e Métodos**

### **e. Doentes**

Foram estudados 97 doentes que frequentam a consulta de Genética do CHTMAD, com DC de causa não determinada que, já tendo sido submetidos a todas as análises genéticas protocoladas na investigação de um atraso mental (cariótipo com bandas GTG de alta resolução, estudo molecular X-frágil e, em alguns casos, estudo metabólico, imagiologia cerebral e outros), permaneciam sem diagnóstico etiológico. A maioria foi seleccionada com base na *checklist* publicada por De Vries, preferencialmente doentes com pelo menos 3/10 características.

### **f. Amostras biológicas**

Foi colhida uma amostra de 5 ml de sangue periférico aos indivíduos seleccionados. Foram também colhidas amostras de sangue aos pais/familiares dos doentes em que se encontraram alterações.

### **g. Metodologia**

A análise por citogenética molecular com *Fluorescent in situ hybridization* (FISH) com sondas subteloméricas (Chromoprobe Multiprobe-TTM - Vysis), foi realizada em metafases obtidas a partir de culturas sincronizadas de linfócitos, de acordo com as técnicas de rotina utilizadas no laboratório. Para a realização da FISH seguiram-se as instruções do fabricante.

A metodologia seleccionada permite analisar, numa só lâmina com 41 sondas, as regiões subteloméricas de todos os cromossomas (excepto dos braços curtos dos acrocêntricos, uma vez que estes são constituídos por ADN ribossomal que, quer delectado, quer duplicado, não tem qualquer expressão fenotípica). Para cada par de cromossomas homólogos foram examinadas no mínimo 5 metafases, por dois operadores independentes.

Os estudos dos familiares dos doentes em que se encontraram alterações foram efectuados usando sondas específicas para as regiões subteloméricas dos cromossomas envolvidos.

### **h. Análise estatística**

No sentido de tentar definir características clínicas correlacionadas com anomalias subteloméricas, os doentes foram então divididos em dois subgrupos de acordo com o resultado do estudo (subgrupo 1: composto por seis indivíduos com atraso mental portadores de anomalias subteloméricas; subgrupo 2: formado por 91 indivíduos com atraso mental com estudo negativo). Foi efectuada análise estatística por comparações entre grupos, com base em variáveis categóricas, realizadas com teste do Qui-quadrado de independência. Nos casos em que as condições de aplicabilidade do teste Qui-quadrado não eram verificadas, usaram-se os resultados do teste exacto, que são consoantes com a Simulação de Monte-Carlo.

Nos casos em que a comparação entre os dois grupos em estudo foi baseada em variáveis contínuas recorreu-se ao teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Para o estudo estatístico foi utilizado o *software* SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Considerou-se uma probabilidade de erro de tipo I ( $\alpha$ ) de 0.05 em todas as análises inferenciais.

## Resultados e Discussão

### Resultados gerais

Dos 97 doentes estudados, 61 eram do sexo masculino e 36 do sexo feminino (1.7: 1). A idade dos doentes à data de diagnóstico variou entre 0.1 - 62.3 anos.

Todos os doentes apresentavam ADPM/DC classificado, de acordo com avaliação em Psicologia/Psiquiatria Infância e Adolescência, como:

- ligeiro - 33 casos
- moderado - 53 casos
- grave - 10 casos
- profundo - 1

Existia história familiar de DC/anomalias em cerca de 70% dos casos (68/91), 86 doentes eram portadores de duas ou mais dismorfias (88%) e em 60 havia história de atraso de crescimento pré e/ou pós natal (62%).

A idade materna ao nascimento variou da seguinte forma:

- $\leq 18$  A - 6 casos
- 19-34 A - 81 casos
- $\geq 35$  A - 10 casos

A escolaridade materna:

- sem escolaridade - 11
- 1º ciclo - 41
- 2º ciclo - 19
- 3º ciclo - 9
- secundário - 9
- superior - 8

A distribuição de acordo com o *score* na *checklist* variou da seguinte maneira:

- 0 = 1
- 1-2 = 10
- 3-4 = 43
- 5-6 = 23
- 7-8 = 19
- 9 = 1

Em seis casos foram identificadas anomalias cromossómicas crípticas (6,19%), quatro de novo (3 deleções - 19p, 2p e 4q e uma duplicação 4p) e duas familiares (deleção 3p e deleção 3q). O *score* destes doentes na *checklist* teve a seguinte distribuição: 7- um caso, 5 - um caso, 4 - dois casos e 3 - dois

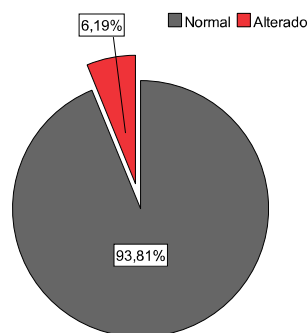
casos. Foi efectuado o estudo familiar, excepto num caso, tendo sido encontrados mais 3 resultados positivos.

### **Análise Estatística**

Foi efectuada comparação entre o subgrupo de portadores de rearranjos subteloméricos e os restantes doentes com resultado normal.

#### **a) Caracterização inicial da amostra**

Seis indivíduos com atraso mental e portadores de alterações subteloméricas constituem o grupo de estudo (3 indivíduos do sexo feminino e 3 do sexo masculino). Um total de 91 indivíduos com atraso mental (33 do sexo feminino e 58 do masculino), e com resultado normal constituem o grupo controle (Figura 2).



**Figura 2** - Distribuição percentual do resultado do estudo.

Os indivíduos do grupo de estudo apresentaram idades no início do estudo compreendidas entre 0.1 - 62.3 anos, idade média 7.7 anos (desvio padrão 8.0 anos) enquanto que os grupo controle tinham idades no início do estudo compreendidas entre 1.1 - 34.4 anos, idade média 10.1 anos (desvio padrão 12.5 anos).

#### **c. Comparação entre o grupo controle e o grupo de estudo**

No Quadro 1 estão apresentados, para os dois grupos, a mediana, o 1º e o 3º quartis da idade do doente na 1ª consulta, da idade do doente na idade actual, da idade da mãe do doente na 1ª consulta e da idade da mãe do doente na altura do nascimento.

A idade mediana dos doentes do grupo de estudo é ligeiramente superior à idade mediana dos doentes do grupo controle. Por outro lado, a idade da mãe, ao nascimento e na altura da primeira consulta é inferior no grupo de estudo comparativamente ao grupo controle. Contudo, para todas as variáveis estudadas, as diferenças observadas não se revelaram estatisticamente significativas ( $p > 0.05$  nos quatro casos).

Característica	Grupo		p
	Estudo	Controle	
Idade do doente na 1ª consulta	6.6 (1.1 – 16.9)	6.5 (3.3 – 10.0)	0.988
Idade do doente no ano actual	9.3 (3.7 – 18.0)	8.9 (6.2 – 13.6)	0.994
Idade da mãe do doente na 1ª consulta	34.0 (31.5 – 46.5)	35.0 (29.0 – 40.0)	0.534
Idade da mãe na altura do nascimento	27.5 (23.8 – 32.3)	28.0 (22.0 – 31.0)	0.893

**Quadro 1** - Comparação entre os dois grupos no que respeita às idades dos doentes e às idades das respectivas mães. Os valores apresentados são a mediana (1º quartil – 3º quartil) e a unidade é anos.

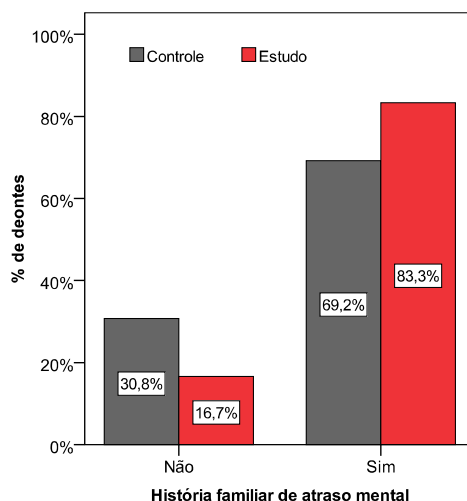
O Quadro 2 apresenta a distribuição percentual da escolaridade da mãe do doente por grupo. Em ambos os grupos, o grau de escolaridade mais frequente foi o 1º ciclo do ensino básico (33.2% - grupo de estudo e 42.9% - grupo controle). Nos dois grupos verificaram-se mães sem escolaridade, 16.7% no grupo de estudo e 10.9% no grupo controle. 33.4% das mães dos doentes do grupo de estudo apresentaram um grau de escolaridade superior ou igual ao secundário, enquanto que no grupo controle essa percentagem foi 16.5%. Finalmente, no grupo de estudo, 16.7% das mães possuíam o 2º ou 3º ciclo de escolaridade, no grupo controle essa percentagem foi 29.7%.

Grau de escolaridade	Grupo	
	Estudo	Controle
Sem escolaridade	1 (16.7)	10 (10.9)
1º ciclo do ensino básico	2 (33.2)	39 (42.9)
2º ciclo do ensino básico	1 (16.7)	18 (19.8)
3º ciclo do ensino básico	0 (0.0)	9 (9.9)
Secundário	1 (16.7)	8 (8.8)
Superior	1 (16.7)	7 (7.7)
<b>Total</b>	<b>6 (100.0)</b>	<b>91 (100.0)</b>

**Quadro 2** - Escolaridade da mãe do doente por grupo. Os valores apresentados são a frequência absoluta (percentagem).

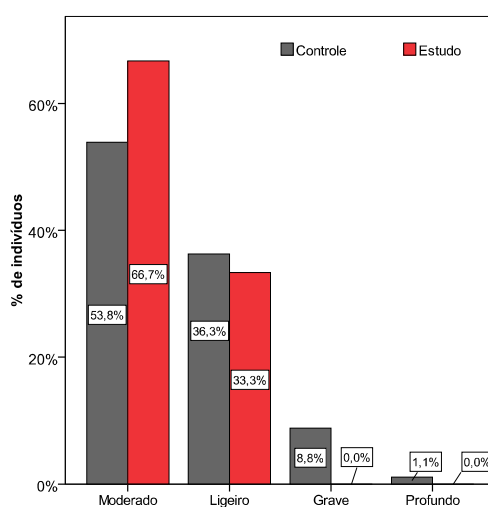
Nota: Neste caso, mesmo recorrendo à simulação de Monte Carlo não foi possível obter o valor p, devido ao elevado número de classes resultantes do cruzamento das duas variáveis.

A Figura 3 ilustra a distribuição percentual da incidência de história familiar positiva de atraso mental para os dois grupos. Observou-se uma maior percentagem de casos com história familiar positiva de atraso mental no grupo de estudo (n=5; 83.3%), comparativamente ao grupo controle (n=63; 69.2%). Contudo, a análise estatística inferencial permite afirmar que a incidência de história familiar de atraso mental é independente do Grupo (p=0.665).



**Figura 3-** Distribuição percentual da incidência de história familiar de atraso mental pelos dois grupos em estudo.

A distribuição percentual do tipo de atraso mental pelos dois grupos em análise está ilustrada na Figura 4. Observou-se que, dos indivíduos do grupo controle, 49 (53.8%) apresentaram um atraso mental moderado, 33 (36.3%) revelaram um atraso mental ligeiro, 8 (8.8%) tinham um atraso mental grave e apenas 1 (1.1%) apresentou um atraso mental profundo. No que respeita aos indivíduos do grupo de estudo, não foram verificados casos de atraso mental grave ou profundo, verificaram-se 4 (66.7%) casos de atraso mental moderado e 2 (33.3%) de atraso mental ligeiro.

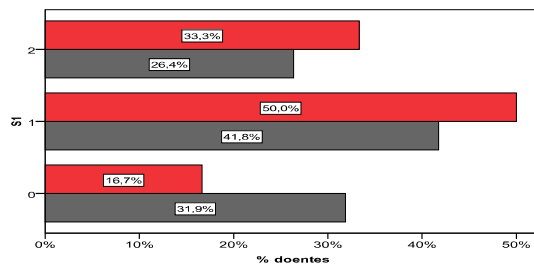


**Figura 4 -** Distribuição percentual do tipo de atraso mental pelos grupos em estudo.

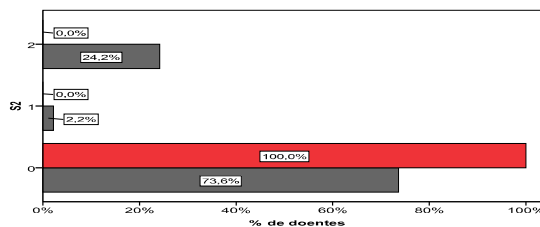
Nota: Neste caso, mesmo recorrendo à simulação de Monte Carlo não foi possível obter o valor p, devido ao elevado número de classes resultantes do cruzamento das duas variáveis.

Na figura seguinte (Figura 5 A,B,C,D,E) ilustram-se as distribuições percentuais das variáveis S1, S2, S3, S4 e S5 pelos grupos em estudo.

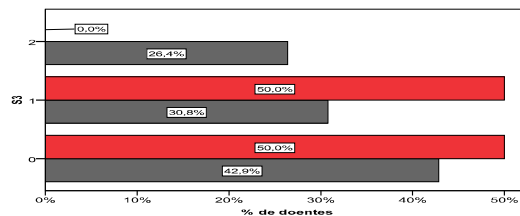
A – História familiar de atraso mental



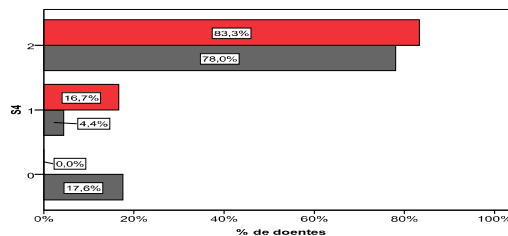
B – Atraso crescimento pré-natal



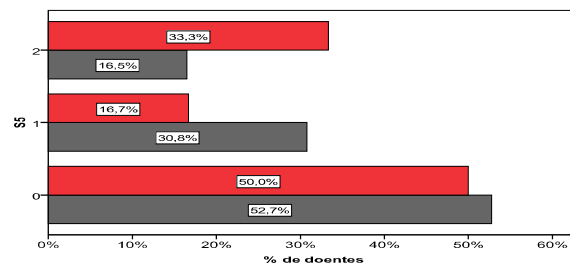
C – Anomalias crescimento pós-natal



D - ≥ 2 dismorfias faciais

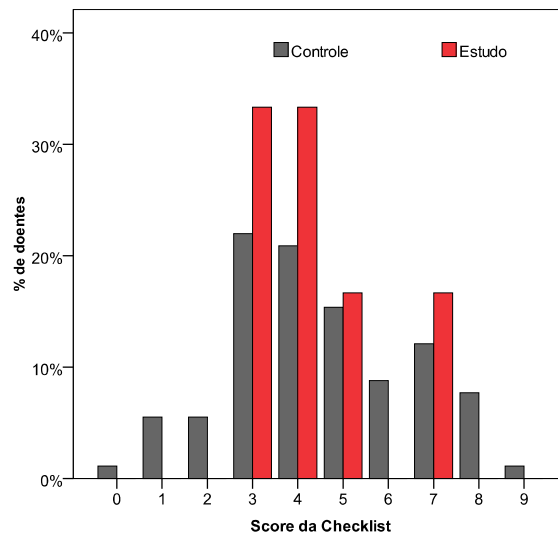


E - Outras anomalias



**Figura 5** - Distribuição percentual das variáveis S1 (A), S2 (B), S3 (C), S4 (D) e S5 (E) pelos grupos em estudo.

A Figura 6 (e quadro 3) ilustram a distribuição percentual do *Score da checklist* (score total dos 5 itens da *checklist* avaliados) para os dois grupos de estudo.



**Figura 6** - Distribuição percentual do “Score da checklist” pelos grupos em estudo

Score da checklist	Grupo	
	Estudo	Controle
0	0 (0.0)	1 (1.1)
1	0 (0.0)	5 (5.5)
2	0 (0.0)	5 (5.5)
3	2 (33.3)	20 (22.0)
4	2 (33.3)	19 (20.9)
5	1 (16.7)	14 (15.3)
6	0 (0.0)	8 (8.8)
7	1 (16.7)	11 (12.1)
8	0 (0.0)	7 (7.7)
9	0 (0.0)	1 (1.1)
<b>Total</b>	<b>6 (100.0)</b>	<b>91 (100.0)</b>

**Quadro 3** - Distribuição percentual do “Score da checklist” pelos grupos em estudo.

Cut off	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)
≥ 3	1.00 (0.86 – 1.00)	0.13 (0.02 – 0.28)
≥ 4	0.67 (0.49 – 0.85)	0.34 (0.20 – 0.47)
≥ 5	0.33 (0.18 – 0.53)	0.55 (0.43 – 0.67)

**Quadro 4** - Sensibilidade e especificidade da checklist para diferentes cut off.

Em termos dos valores obtidos no *score* da *ckeelist* no seu total ou por itens, não foi possível obter resultados valorizáveis.

### Descrição dos Casos Clínicos Positivos

**Tabela 1. Características Clínicas dos Doentes com anomalias subteloméricas**

**Figura 7. Fotos dos doentes**

### Discussão

Os estudos subteloméricos por FISH ou suas variantes, têm permitido a identificação de novos síndromes e a confirmação ou melhor delineação citogenética de outros já conhecidos. Diversos trabalhos publicados atestam a utilidade dos exames de citogenética molecular no estudo destes doentes, começando agora a serem elucidados os mecanismos envolvidos na formação de rearranjos subteloméricos. De facto as anomalias subteloméricas cromossómicas são uma causa importante de DC e anomalias congénitas (6, 10). Algumas das mais frequentes caracterizam-se por um fenótipo específico e têm permitido definir novos síndromes subteloméricos de que são exemplos os síndromes de deleção 1p (11, 12) ou del 9q (13, 14) ou del 1q (8, 14). Ainda há um longo caminho a percorrer na interpretação destas anomalias, nomeadamente: na variabilidade clínica, ocorrência de variantes sem significado patológico e conhecimento sobre o fenótipo dos novos síndromes.

Em alguns casos crianças com dismorfia facial /ADPM e rearranjos subteloméricos não evoluem para DC, confirmando que os rerranjos subteloméricos cripticos não resultam sempre em DC, pelo que é necessário prudência na na definição de um prognóstico especialmente num contexto de aconselhamento genético pré-natal.

Assim, a identificação de novos casos e a sua divulgação na literatura, com a descrição da apresentação clínica destas anomalias crípticas torna-se de grande importância. São também fundamentais descrições sobre o tamanho das anomalias subteloméricas em crianças com desenvolvimento normal de modo a ser possível determinar quais os loci subteloméricos estão implicados em DC síndrómico.

A citogenética convencional (apesar do seu baixo poder de resolução), continua a ser a única técnica que permite, visualizando todo o genoma, detectar algumas anomalias cromossómicas subteloméricas e detectar rearranjos como as translocações, no que não pode ser substituída pelo *CGH array*.

A identificação de uma etiologia para o DC permite ao clínico informar a família de forma correcta sobre prognóstico, antecipação de necessidades futuras, aconselhamento genético e, em alguns casos, tratamento específico (ex: terapia de substituição com biotina).

Mesmo na ausência de um diagnóstico específico, a exclusão de algumas patologias genéticas mais frequentemente associadas ao AM é importante para a família.

O diagnóstico de uma anomalia cromossómica subtelomérica tem um impacto imediato em termos de aconselhamento genético em particular no caso de um rearranjo familiar, embora possa ser difícil prever o prognóstico ou o fenótipo esperado.

Todos os doentes com DC (com ou sem anomalias associadas) devem ser investigadas do ponto de vista etiológico.

Com este estudo podemos concluir que:

- A percentagem de alterações subteloméricas encontradas, está de acordo com os dados publicados da literatura;
- As anomalias/dismorfias presentes nesses doentes não são específicas e não permitem ainda definir critérios clínicos fiáveis para selecção de candidatos a estes estudos, sendo o DC a característica chave a determinar investigação;
- A utilização de uma *ckecklist* embora útil na selecção dos doentes necessita de reajustes face aos dados mais actuais que demonstram que os desequilíbrios subteloméricos podem estar associados com um fenótipo muito variável;
- A taxa de detecção de anomalias cromossómicas depende geralmente da gravidade do fenótipo (de acordo com a probabilidade que uma anomalia cromossómica sendo responsável por disrupção complexa do desenvolvimento resulte por exemplo em dismorfias faciais relevantes). No nosso estudo os casos positivos surgiram em doentes com atraso ligeiro a moderado, sem malformações graves. Assim, embora a selecção clínica cuidadosa permita uma maior taxa de detecção, os estudos de citogenética molecular devem ser equacionados, no âmbito de uma consulta de Genética, em todos os doentes com AM e história familiar positiva;
- Embora o tamanho da amostra estudada não tenha permitido estabelecer conclusões estatisticamente significativas, os resultados estão de acordo com o descrito na literatura e permitem reforçar a importância de prosseguir com este tipo de estudos em amostras de maiores dimensões e mesmo a nível nacional com implementação de um registo e definição de um protocolo faseado para estudo de doentes com DC;
- Combinando os resultados do presente estudo com os de um (único) estudo anterior efectuado em Portugal, que envolveu 50 doentes (Pinto *et al*, 2006), foram investigados um total 147 doentes com DC tendo sido identificados 8 (casos index) portadores de alterações

subteloméricas (5.44%). A partir destes dados podemos estimar no nosso país um número de indivíduos com DC variando entre 200 000 e 300000 e, destes, entre 10.000 a 16.000 por alterações subteloméricas;

- Enquanto outras tecnologias mais simples e mais rápidas para estudo de anomalias cromossómicas submicroscópicas, não se encontrarem acessíveis ou forem demasiado caras, a técnica de *FISH* utilizada neste estudo deverá ser uma análise de rotina, em segunda linha, para o estudo do atraso mental idiopático;
- A falta de acessibilidade a familiares para serem testados, a penetrância incompleta e a variabilidade clínica das anomalias cromossómicas submicroscópicas são factores condicionantes no diagnóstico clínico destas anomalias. Daí a grande importância de mais descrições na literatura, e da contribuição com a divulgação destes novos casos;
- Em qualquer das abordagens referidas, o clínico tem um papel chave na avaliação e orientação destes doentes.
- É muito importante a referência destes doentes, idealmente através de um registo nacional, de modo a que possam beneficiar dos constantes avanços na genética.

## **Bibliografia**

- 1 - Battaglia A, Carey JC (2003). Diagnostic Evaluation of developmental delay/ mental retardation: An overview. *Am J Med Genet C (Semin Med Genet)*, 117C:3-14.
- 2 - Shevell L, Ashwal, S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Masjnemer A, Noetzel M, Sheth RD (2003). Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 60: 367-380.
- 3 - Moeschler JB, Shevell M (2006). Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delay. *Pediatrics*; 117: 2304 - 2316.
- 4 - Leonard H, Wen X (2002). The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millenium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 8:117-134.
- 5 - Kriek M, White SJ, Bouma Mc *et al* (2004). Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet*: 41: 249-255.
- 6 - Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrik J, Eash D, Ledbetter DH; Martin CL (2006). Subtelomere FISH analysis of 11688 cases. An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangments in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43: 478-489.
- 7 - De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C (2003). Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*, 40: 385-398.
- 8 - De Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OWJ, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcom S, Flint J, Hurst JA, Winter RM (2001).

Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 38: 145-150.

- 9 - Krantz ID, Spinner NB (2007). Novel Microdeletions Syndromes. *Am J Med Genet, Part C*, 145C: 323-326.
- 10 - Biesecker LG (2002). The end of the beginning of chromosome endings. *Am J Med Genet* 107: 263-266.
- 11 - Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-MacGinn D *et al* (2008). Further Delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics*, 121: 404-410.
- 12 - Kurosawa K, Kawame H, Okamoto N, Ochiai Y, Akatsuka A *et al* (2005). Epilepsy and neurological findings in 11 individuals with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev*, 27: 378-372.
- 13 - Stewart DR, Huang A, Raravelli F, Anderlid BM, Medne L, Ciprero K *et al* (2004). Subtelomeric deletions of chromosome 9q: a novel microdeletion syndrome. *Am J Med Genet*, 128: 340-351.
- 14 - Kleefstra T, Koolen DA, Nillesen WM; de Leeuw N, Hamel BC, Veltman JA *et al* (2006). Interstitial 2.2 Mb deletion at 9q34 in a patient with mental retardation but without classical features of the 9q subtelomeric deletion syndrome. *Am J Med Genet*, 140: 618-623.
- 15 - Rossi E, Piccini F, Zolino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R *et al* (2001). Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 38: 417-20.
- 16 - Merritt JL, Zou Y, Jalal SM, Michels VV (2007). Delineation of the cryptic 1 qter deletion phenotype. *Am J Med Genet*, 143: 91-95.
- 17 - Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le caignec C, Thienpont B, Urbina M *et al* (2007). Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum Mutat*, 28: 958-967.

Figura 1 - *Checklist* DeVries

Figura 7 - Fotos dos Doentes

Tabela 1 - Características Clínicas dos doentes com resultado positivo

**Anexo III**  
**Protocolo SONDAS TELOMÉRICAS (VYSIS)**

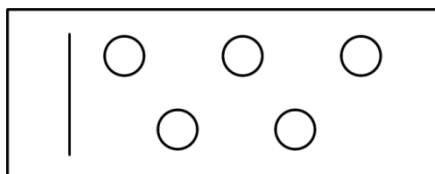
## Protocolo SONDAS TELOMÉRICAS (VYSIS)

### Soluções:

- ✓ **0,4X SSC/0,3% Igepal:** Adicionar 150 $\mu$ L de igeal a 50 mL de 0.4X SSC
- ✓ **2X SSC/0,3% Igepal:** Adicionar 50 $\mu$ L de igeal a 50 mL de 2X SSC
- ✓ **Étanol 70, 85 e 90%**
- ✓

### Espalhamento

- Colocar 3-4 $\mu$ L de suspensão celular por 5 vezes na lamina pelo menos 10min antes do inicio da hibridização à temperatura ambiente:



### Envelhecimento

- Colocar a lâmina na solução 2X SSC a 37°C durante 10min

**Nota:** não colocar mais de 4 lâminas por coplin, simultaneamente

### Desidratação

- Retirar a lamina da solução 2x SSC e colocar
  - etanol 70% - 1min.
  - etanol 85% - 1 min.
  - etanol 90% - 1 min.

Nota: As lâminas devem estar secas antes de colocar a sonda,

- Secar durante 15min

### Aplicação da sonda

1. Aplicar 0,3 a 0,5 $\mu$ L da mistura da sonda na área da lâmina pretendida
2. Colocar a lamela circular (22x22)
3. Aplicar a cola a rodear a lamela

### Desnaturação

- Colocar na placa a 75°C durante 5min.

### Hibridização

- Incubar em câmara húmida a 37°C. durante 17 horas

### Lavagem pós-hibridização

1. Retirar a cola
2. Mergulhar a lâmina num coplin com 0.4 x SSC para saírem todas as lamelas
3. Colocar em 0,4 SSC/0.3% igeal, a 73°C- 2min- agitar a lamina no 1º min,
4. Transferir a lamina para um coplin com 2x SSC/ 0,1% igeal, à temperatura ambiente, agitando 1-3 seg. Incubar durante 2 minutos
5. Secar a lamina ao ar e no escuro

### Contraste

- Aplicar duas gotas de 4 $\mu$ L DAPI por lâmina e cobrir imediatamente com a lamela
- Manter a lâmina no frigorífico, a 4°C

**Protocolo das culturas sincronizadas com Brometo de Etídeo**

## Protocolo das culturas sincronizadas Com Brometo de Etídeo

Soluções:

- ✓ **Meio KaryoMAX;**
- ✓ **Fitohemaglutinina** liofilizada. Rehidratar com 10 ml de água destilada estéril;  
Distribuir em aliquotas de 0,2mL(para dois tubos) e de 0,4mL(para 4 tubos)

Congelar e

guardar a -21°C

- ✓ **Metotrexato.** Para obter a solução de pretendida de metotrexato efectuar as seguintes diluições:
- ✓ Solução A – pesar 5 mg de metotrexato e adicionar 2 ml de água estéril.  
Guardar no frigorífico.  
  
Solução B – 0.1 ml da solução A + 9.9 ml de água estéril.  
  
Solução C – 1 ml da solução B + 9 ml de água estéril.
- ✓ **Timidina** na concentração final de 0.3 µg/ml. Pesar 2.4 mg de timidina e adicionar 5 ml de meio completo. Agitar suavemente;
- ✓ **Colcemide** na concentração final de 10 µg / ml;
- ✓ **Solução hipotónica** cloreto de potássio 0.075 M. Dissolver 5.6 g de KCl em 1 litro de água destilada; Guardar no frigorífico.
- ✓ **Fixador** 3 : 1, metanol : ácido acético. Usar fresco  
**Brometo de Etídeo(10mg/mL)**, pesar 10mg de brometo de etídeo e dissolver em 1mL de água. Filtar em filtro milipore e congelar em aliquotas, envolver em papel de alumínio.

Sementeira:

1. *Distribuir por cada tubo 5 ml de meio completo;*
2. *Adicionar 0.1 mL de fitohemaglutinina mesmo antes de adicionar as gotas de sangue;*
3. Homogeneizar os sangues, posteriormente, colocar em cada tubo, respectivamente, 8 gotas de sangue. Misturar levemente o sangue com o meio;
4. Incubar durante 48 ou 72 horas a 37 °C, mantendo os tubos de cultura com uma inclinação de 30° para aumentar a área de superfície de cultura;
5. Adicionar a cada tubo 0.1 ml da solução de metotrexato (C);
6. Incubar durante 17 horas a 37 °C, mantendo os tubos com uma inclinação de 30 °;
7. Centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm;
8. Rejeitar o sobrenadante;
9. Fazer novo meio completo e adicionar a cada tubo 5 ml;
10. Adicionar a cada tubo 0.05 ml de timidina;

11. Incubar durante 4 horas a 37 °C, mantendo os tubos com uma inclinação de 30°;
12. Adicionar 5,7 µL de Brometo de Etídio. Incubar durante 1h e 30min
13. Adicionar a cada tubo 5 gotas de colcemide e agitar, suavemente, o tubo;
14. Incubar durante 30 minutos a 37 °C, mantendo a inclinação de 30°.

#### Manipulação:

15. Centrifugar os tubos durante 4 minutos a 2000 rpm;
16. Rejeitar o sobrenadante (deixar aproximadamente 0,5ml). Ressuspender;
17. Adicionar, lentamente, a cada tubo, 10 ml da solução hipotónica, previamente, aquecida a 37 °C;
18. Incubar durante 15 minutos a 37 °C;
19. Centrifugar durante 4 minutos a 2000 rpm;
20. Rejeitar o sobrenadante (deixar aproximadamente 0,5ml) e ressuspender;
21. Adicionar, lentamente, e sob agitação o fixador 3:1, previamente refrigerado;
22. Centrifugar durante 4 minutos a 2000 rpm;
23. Rejeitar o sobrenadante (deixar aproximadamente 0,5ml) e ressuspender;
  
24. Repetir a adição do fixador 3:1 (só neste passo é possível parar o processo e guardar as amostras a 4 °C);
25. Centrifugar durante 4 minutos a 2000 rpm;
26. Repetir a adição do fixador 3:1;
27. Após a terceira lavagem, decantar o sobrenadante, e adicionar algumas gotas de fixador (recentemente preparado), para fazer o espalhamento.

#### Espalhamento:

1. Agitar a suspensão celular;
2. Colocar ≈ 2 gotas(10µL) de suspensão celular sobre a lâmina;
3. Secar as lâminas sobre uma placa de aquecimento à temperatura aproximada de 60 °C;
4. Para envelhecer as lâminas, conservá-las durante 30 minutos, sobre a placa de aquecimento;

**Anexo V**  
**Checklist De Vries**

**Ckeclist: Indications to Screen for Subtelomeric Defects in a Patient with Mental Retardation**

**Overview :**

De Vries et al developed a simple checklist to determine if a patient with mental retardation should undergo specialized testing for subtelomeric defects.

Indications to screen a patient with mental retardation:

- (1) family history of mental retardation
- (2) intrauterine growth retardation
- (3) poor growth (failure to thrive) or overgrowth in the postnatal period
- (4)  $\geq 2$  facial dysmorphic features
- (5)  $\geq 1$  nonfacial dysmorphic features and/or congenital anomalies

The presence of one or more of these factors may justify the expense of the specialized testing for a subtelomeric defect. Genomic microarray analysis may simplify testing and make it more cost-effective. The above list is based on a more complete checklist ( De Vries et al):

Parameters for the checklist:

- (1) family history
- (2) prenatal onset of growth retardation
- (3) postnatal growth abnormalities
- (4) facial dysmorphic features (hypertelorism, nasal anomalies, ear anomalies, other)
- (5) nonfacial dysmorphisms and congenital abnormalities

Parameter	Finding	Points
family history	None	0
	compatible with Mendelian inheritance	1
	not compatible with Mendelian inheritance	2
prenatal onset of growth retardation	none	0
	present	2
postnatal grrowth abnormalities	none	0
	1 point each for microcephaly, short stature, macrocephaly, tall stature	MIN(2, number present)
	facial dysmoprhic features	
	none	0
	1	0
	2 or more	2
nonfacial dysmorphic features and/or congenital abnormalities	1 point each for: hand anomaly, heart anomaly, hypospadias, other	MIN(2, number present)

Total checklist score =

= SUM(points for all 5 parameters)

Interpretation:

- minimum score: 0
- maximum score: 10
- A score  $\geq 3$  was 100% sensitive and 27% specific for a subtelomeric defect.

---

**References:**

---

Battaglia A, Carey JC. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Genetics*. 2003; 117C: 3-14. (page 5).

De Vries BBA, White SM, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: A checklist. *J Med Genetics*. 2001; 38: 145-150 (page 148).

**Anexo VI**  
**Tabela dos doentes**

ID	S	Subtel	Her	Características Clínicas	HF	IM	E	Score	
1	3A,4M	M	Del 3q	Familiar(mat)	Macrocefalia, estenose aórtica, face quadrangular larga, metópica proeminente, hipertelorismo, olhos fundos, arcada supraciliar saliente, pavilhões auriculares displásicos, boca pequena com lábio superior fino, filtro longo, ponte nasal proeminente, narinas pequenas e antevertidas, microretrognatia. Pescoço curto e largo, braquidactilia das mãos, palmas com dermatoglifos profundos, dedos dos pés mal posicionados e com unhas hipoplásicas; escroto em xaile.	+	30	0	7
2	11 <sup>a</sup>	F	del 19p	De novo	Face longa e assimétrica, discreta ptose palpebral bilateral, fronte estreita com cabelo baixo, pav. auriculares displásicos, palato estreito e assimétrico, nariz longo e estreito com asas hipoplásicas, columela baixa e larga, ponta nasal globosa.	+	25	1	3
3	11A,11M	F	dup 4p	De novo	Fronte estreita, olhos fundos, pavilhões auriculares implantação normal, rodados posteriormente, nariz com ponta globosa e larga. Malposicionamento dos dentes, incisivo superior extra. Mento proeminente. Mãos com dedos fusiformes, encurtamento das falanges distais e 5º dedo mais curto. Unhas 5º dedo pés distróficas e hipoplásicas.	+	20	4	4
4	35A,2M	F	Del 2p	?	Baixa estatura, hipotricose, face peculiar, fronte estreita e fendas palpebrais estreitas, nariz largo, palato alto e estreito, pescoço curto, pavilhões auriculares baixa implantação, grandes e descolados, micrognatia, mãos pequenas com dedos finos e fusiformes e clinodactilia 5º dedo.	+	28	6	4
5	3A,9M	M	Del 4q	De novo	Estrabismo intermitente. Hipotonia global com ROT's normais. Dismorfia facial com face larga e longa, sobrancelhas arqueadas, largas e esparsas no 1/3 externo, fronte alta, glabella proeminente, cabelo recuado, bico viúva; hipertelorismo, pavilhões auriculares displásicos, de baixa implantação e curva hélice muito enrolada, boca pequena em tenda, filtro longo, ponte nasal achatada, narinas pequenas, ponta nasal globosa, columela rasa. Pescoço curto e largo, discreta micrognatia. Criptorquidia direita. Ânus anterior. Mãos grandes com dedos longos, sem hiperlaxidez .	-	39	sup	5
6	4A,10M	M	Del 3p	Familiar(mat) irmã	+ Face triangular, pavilhões auriculares rodados posteriormente, displasicos, hipertelorismo. Crescimento estatura ponderal normal.	+	27	12	3

**Tabela - Apresentação clínica dos doentes afectados de alterações subteloméricas.** (ID= idade diagnóstico; S= sexo; Subtel= alteração subtelomérica; Her= hereditariedade; HF= história familiar positiva (+) ou negativa (-); IM= idade materna ao nascimento; E= escolaridade materna; Score= resultado na checklist)