2013;27[1]:10-14
ARQUIVOS DE MEDICINA

ANÁLISE DAS REGIÕES SUBTELOMÉRICAS EM 1180 DOENTES COM ATRASO MENTAL POR FISH E MLPA

Manuela Mota Freitas[1], Maria da Luz Fonseca e Silva[1], Joana Ribeiro[1], Natália Oliva Teles[1], Cristina Candeias[1], Elsa Bronze-da-Rocha[2,3]

RESUMO

O atraso mental (AM) ou défice cognitivo é uma doença crónica com repercussões familiares e socioeconómicas que atinge cerca de 3% da população em geral. As alterações das regiões subteloméricas (RSt) são uma das principais causas de AM, associado ou não a anomalias múltiplas, e estudos publicados revelam que esses rearranjos contribuem para 3-16% de AM idiopático.

Na unidade de Citogenética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães, INSA, no Porto, entre 2000 e 2010, analisaram-se as RSt em 1180 indivíduos nos quais se excluíram as patologias mais frequentes mediante a realização dos estudos genéticos protocolados para investigação de AM/Atraso de desenvolvimento psicomotor (ADPM) cujos cariótipos, com um padrão mínimo de 550 bandas, eram normais. As indicações clínicas para o estudo incluíram AM ou ADPM, com ou sem dismorfias. Até 2007, a análise de cromossomas metafásicos foi feita pela técnica de FISH. Depois, foi aplicada a técnica de MLPA e as alterações detetadas confirmadas por FISH. Dos 1180 indivíduos, 60 (5,1%) apresentaram alterações nas regiões subteloméricas. A análise familiar de 48 casos com anomalias permitiu concluir que em 28 (2,4%) as alterações eram responsáveis pelo fenótipo clínico e em 20 casos (1,7%) eram polimorfismos, sem significado patológico, pois foram herdados de pais fenotipicamente normais. Não foi possível a realização de estudos familiares em 12 casos (1,0%) e os resultados consideraram-se inconclusivos.

Os resultados deste estudo foram comparados com os descritos na literatura e realçam as vantagens e desvantagens das técnicas FISH e MLPA na caracterização das RSt que, quando modificadas, podem causar atraso mental.

PALAVRAS-CHAVE: ATRASO MENTAL; REGIÕES SUBTELOMÉRICAS; FISH ("FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION"); MLPA ("MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION")

ANALYSIS OF SUBTELOMERIC REGIONS IN 1180 PATIENTS WITH MENTAL RETARDATION BY FISH AND MLPA

ABSTRACT

Mental retardation (MR) is a major social, educational and health problem affecting 3% of the population. Subtelomeric chromosome (RSt) aberrations are one of the major causes of MR with or without multiple abnormalities, and previous studies verified that these rearrangements contribute for 3-16% of unexplained mental retardation.

Between 2000-2010, in the Cytogenetic Unit, Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães, INSA (Portugal), the subtelomeric regions from all chromosomes were analysed in 1180 individuals in which the most frequent pathologies had been excluded by performing genetic studies for investigations of MR and psychomotor development delay whose karyotypes, with a minimum of 550 bands, were normal. The medical recommendation for the study included mental retardation or psychomotor development delay with or without dysmorphisms. Until 2007, the analysis of metaphases, obtained from cultured lymphocytes, was performed by FISH, and after 2007, by MLPA. All the unbalanced cases detected by MLPA were confirmed by FISH.

From the 1180 individuals, 60 (5.1%) showed chromosomal alterations in the subtelomeric regions. In 12 (1.0%) without familial studies, the results were considered inconclusive. In 48 abnormal cases, the parental investigation allowed us to conclude that 28 (2.4%) patients had chromosomal aberrations that might be responsible for the clinical phenotype; the remaining 20 (1.7%) were considered as polymorphisms, without pathological significance, since the apparent anomaly had been inherited from phenotypically normal parents.

These results obtained in this study were compared with those already described, and they highlight the advantages/disadvantages of FISH and MLPA in the characterization of subtelomeric regions that, when modified, can cause mental retardation.

KEY-WORDS: MENTAL RETARDATION, SUBTELOMERIC REGIONS, FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION); MLPA (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION)

1. UNIDADE DE CITOGENÉTICA DO CENTRO DE GENÉTICA MÉDICA DOUTOR JACINTO MAGALHÃES, INSA, NO PORTO

2. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA, FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

3. INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO

INTRODUÇÃO

O atraso mental (AM) ou défice cognitivo é uma doença crónica com repercussões familiares e socioeconómicas que afeta 2-3% da população em geral. As suas causas são várias, tornando difícil a sua caracterização, como comprovado pelos 40-50% de atrasos de etiologia desconhecida. O AM pode ser causado por doenças monogénicas, anomalias cromossómicas, agentes externos como traumatismos de parto, infeções e agentes químicos, ou pela combinação de vários dos fatores referidos.[1]

O diagnóstico de AM segundo os critérios da DMS-IV[2] baseia-se fundamentalmente em 3 critérios: funcionamento intelectual global inferior à média, limitação na atividade adaptativa em pelo menos duas áreas e o início das manifestações de AM ocorrer antes dos 18 anos de idade dividindo-se em ligeiro, moderado e grave. Em crianças com idade inferior a 7 anos torna-se difícil a sua avaliação intelectual e daí a designação correntemente utilizada de atraso de desenvolvimento psicomotor (ADPM), que mais tarde poderá ou não evoluir para um AM.

As alterações das RSt são uma das regiões subteloméricas principais causas de AM, associado ou não a anomalias múltiplas, e são responsáveis por 3-16% de AM idiopático.[1,3,4,5]

Nos eucariotas as regiões terminais dos cromossomas são constituídas por proteínas e DNA repetitivo não codificante sendo designadas por telómeros e por subtelómeros. Os telómeros mantêm a estabilidade cromossómica pois protegem os cromossomas da degradação exonucleolítica e da fusão das extremidades. Entre outras funções asseguram a completa

replicação do DNA nas regiões distais dos cromossomas e estão associados à longevidade celular.[5,6,7] Os subtelómeros situam-se adjacentes aos telómeros e possuem grandes famílias de genes que variam no número de cópias e na distribuição cromossómica. A homologia entre as sequências subteloméricas dos vários cromossomas facilita o frequente "cruzamento de informação", originando os rearranjos cromossómicos das RSt.[6] O conhecimento da estrutura destas zonas, associado à existência de rearranjos submicroscópicos, levou ao desenvolvimento de metodologias que detetam sequências de DNA específicas dos subtelómeros dos 22 pares de autossomas e dos cromossomas sexuais, como a hibridação in situ com fluorescência (FISH - *Fluorescent In Situ Hybridization*), a amplificação "*multiplex*" de sondas dependentes da ligação (MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) e os "*arrays*" de hibridação genómica comparativa (aCGH – *array-Comparative Genomic Hybridization*). Atualmente estima-se que a taxa de diagnóstico de AM pelo estudo das RSt é de 5-7% por FISH e pode atingir os 10% com MLPA.[8]

O objetivo deste trabalho foi analisar as RSt num grupo de doentes com AM ou ADPM, em que os resultados dos estudos prévios para exclusão de eventuais causas responsáveis pelo fenótipo apresentado (eg. cariótipo, estudos para doenças metabólicas e para síndroma de X-frágil) eram normais.

METODOLOGIA

Entre 2000 e 2010, na Unidade de Citogenética do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães (CGMJM), INSA, foram estudadas as RSt em 1180 doentes com AM ou ADPM, com ou sem dismorfias. Nestes doentes foram realizados estudos prévios que incluíram o cariótipo, estudos metabólicos e de X-frágil, sendo excluídas as patologias mais frequentes associadas a AM/ADPM. Inicialmente processaram-se apenas as amostras de doentes selecionados pela consulta de Genética do CGMJM. A partir de 2007, incluíram-se também amostras de doentes provenientes de outros centros e hospitais do país.

Para a técnica de FISH foram colhidos, a cada doente, 5ml de sangue em tubo com heparina e, para a metodologia de MLPA, 5ml de sangue em EDTA. Os tubos foram mantidos, durante um prazo máximo de 5 dias, a 2º-8ºC até serem processados. A extração de DNA realizou-se no "Biorobot" (Quiagen) seguindo-se a avaliação de pureza e quantificação no aparelho "Nanodrop".

Efetuaram-se culturas sincronizadas de linfócitos de acordo com os protocolos da Unidade, para realização da técnica de FISH em células em metafase.

A FISH foi realizada com dois protocolos distintos. Entre 2000 e 2005, foi usado o kit "Chromoprobe Multiprobe-T™" (Cytocell, UK) e, depois de 2005, substituiu-se pelo kit "TotelVysion Probe Panel" (Vysis, Abbott Molecular, USA), com a vantagem deste fornecer sinais de hibridação de melhor qualidade. Presentemente a técnica de FISH é utilizada como metodologia de confirmação de alterações nos resultados de MLPA (metodologia de rastreio) ou se os mesmos forem inconclusivos.

Para o estudo das RSt por MLPA foram usados em paralelo dois kits, o "SALSA MLPA kit P036 – Human telomere-3" e o "SALSA MLPA kit 070 – Human telomere-5" (ambos MRC-Holland) o que permitiu testar pelo menos dois *loci* de cada RSt na maioria dos cromossomas, à exceção dos sexuais que analisam as regiões pseudoautossómicas.

Para garantir a qualidade analítica foram salvaguardados vários procedimentos: (i) as culturas foram efetuadas em duplicado; (ii) as metafases foram analisadas por dois operadores diferentes com desconhecimento dos resultados obtidos individualmente; (iii) os ensaios com alterações foram sempre confirmados: a) FISH - o procedimento técnico foi repetido noutra cultura celular; b) MLPA - efetuou-se o estudo com nova amostra de DNA; c) após confirmação, solicitou-se sangue dos progenitores para determinar se a anomalia foi herdada ou *de novo*. Desde 2007 todo o procedimento passou a ser executado segundo as normas do Sistema de Gestão da Qualidade (NP EN ISO 9001:2000) e do Sistema de Gestão da Segurança e Saúde do Trabalho (NP 4397:2001).

RESULTADOS

Das 1180 amostras, 60 (5,1%) apresentavam alterações nas RSt. Após estudo complementar dos pais verificou-se que 28 (2,4%) correspondiam a rearranjos subteloméricos que justificavam as anomalias fenotípicas (**Tabela 1**), e 20 (1,7%) eram polimorfismos sem significado patológico. Nos 12 casos (1%) em que não foi possível o estudo parental o resultado foi inconclusivo.

Do total dos doentes estudados, 202 foram referenciados com AM grave e/ou história familiar de AM e, destes, apenas 3 apresentaram alterações nas RSt com significado clínico (1,5%). Das 1180 amostras, em 448 foi realizado o estudo por FISH e nas restantes 732 por MLPA, verificando-se 14 alterações ST em cada metodologia o que dá respetivamente uma percentagem de 3,1 e 1,9 de rearranjos com importância clínica.

2013;27[1]:10-14
ARQUIVOS DE MEDICINA

Dos 28 casos com rearranjos subteloméricos verificou-se que 14 eram do sexo masculino e 14 do sexo feminino, tendo idades compreendidas entre 1 - 30 anos. Só um tinha história familiar de AM, dois tinham um AM grave e 21 apresentavam dismorfias. Quanto à origem das alterações, 19 ocorreram *de novo*, em 5 era desconhecida e 4 foram herdadas (3 maternas e 1 paterna).

Relativamente às anomalias encontradas, observou-se que em 10 casos estavam envolvidos dois cromossomas, com monossomia da RSt de um e trissomia da RSt do outro correspondendo, provavelmente, a cromossomas derivativos de uma translocação recíproca; 16 doentes apresentavam deleções numa determinada RSt e um, uma duplicação (caso 5), originando, respetivamente, monossomias e trissomia das regiões envolvidas. Um doente evidenciou duplicação de duas regiões distintas, facto extremamente raro.

DISCUSSÃO

Em doentes com AM e utilizando marcadores microssatélites polimórficos encontraram-se 6% de rearranjos subteloméricos[9]. Desde então, surgiram metodologias mais rápidas - FISH[6], MLPA[10] e "aCGH"[11,12] - que permitiram a análise de mais doentes com AM idiopático. O maior estudo feito por FISH envolveu 12.000 pacientes e destes, 2,5% apresentavam anomalias subteloméricas incluindo deleções, duplicações, translocações desequilibradas e rearranjos complexos variáveis[4] e nos primeiros estudos com a técnica de MLPA a percentagem variava entre 1,8% e 5,9%.[10,13]

Neste trabalho foi feita a análise das RSt de indivíduos que apresentavam AM ou ADPM, com ou sem dismorfias, utilizando uma combinação das técnicas de FISH e MLPA. No estudo por MLPA foram usados dois kits com sondas diferentes para cada região, constituídas por genes funcionais ou por sequências codificadoras de proteínas. Deste modo, um resultado anormal apresentaria, em princípio, alterações com as duas sondas. No entanto, uma alteração verificada com uma só sonda também pode significar a existência de uma anomalia com significado clínico, uma vez que os *loci* alvo dos dois kits estão distanciados um do outro, em média 40 Kb[13]. Nestas situações efetuou-se uma confirmação por FISH e solicitou-se a avaliação dos progenitores. Quando foi detetada uma alteração apenas com um dos kits, concluiu-se que esta era herdada e sem significado clínico, sempre que um dos progenitores, fenotipicamente normal, era portador dessa anomalia.

Detetaram-se três casos com uma deleção do braço curto do cromossoma 1 (**Tabela 1**) e outros dois que adicionalmente apresentavam duplicação da RSt de 14q. Nestes, o fenótipo correspondente à deleção sobrepunha-se ao da duplicação.

Destacam-se as microdeleções encontradas nas RSt do braço longo do cromossoma 9 (3 doentes) e do braço longo do cromossoma 22 (4 doentes); no caso nº13 a deleção estava associada a uma duplicação de RSt19q. Porém, é de salientar que nos casos 22 e 23, as deleções só foram reveladas com as sondas do kit P036. Dois doentes apresentavam monossomia da RSt do braço curto do cromossoma 4, dois revelaram monossomia da RSt do braço longo do cromossoma 10, um tinha deleção da RSt do braço longo do 2 e, num outro, a deleção da RSt detetou-se no braço curto do cromossoma 16. A deleção da RSt do braço curto do cromossoma 11 foi encontrada com a utilização de ambos os kits de MLPA (genes *RIC-8* e *BET1L*), embora o *locus D11S2071* usado na técnica de FISH estivesse presente.

Nos casos 22, 23 e 26, as deleções dos genes *RABL2B*-ST22q, *EHMT1* exão 24-ST9q, *RIC-8* e *BET1L*-ST11p poderão corresponder a microdeleções desses genes ou a alterações pontuais da sequência de DNA. Nestas situações, o geneticista avaliará a correlação genótipo/fenótipo e ponderará a continuação do estudo com outra metodologia para confirmação dos resultados encontrados.

O doente nº 8 apresentava uma deleção da RSt do braço longo do cromossoma 9 à qual corresponde um fenótipo bem definido, (MIM *607001 – del9q34.3), incluindo AM grave, hipotonia, microcefalia, face achatada com hipertelorismo, sinófrio, macroglossia e anomalias cardíacas[14]. As análises por FISH permitiram concluir que a deleção era *de novo* e que o ponto de quebra era no *locus D9S325* estendendo-se pelos genes *EHMT1* e *MRPL41*, distais em relação ao centrómero.

Os doentes com a deleção no braço longo do cromossoma 10 apresentavam um fenótipo que incluía AM, dismorfias faciais, anomalias cardíacas e anogenitais. Nos casos 27 e 28, um com ADPM sem dismorfias e com alterações de comportamento, e o outro com suspeita de deleção da RSt10q, confirmou-se a deleção da RSt10q com os três kits utilizados, sendo que no caso 27 foi herdada da mãe e no 28 foi *de novo*. Na situação herdada, a deleção poderia ser a responsável pelo fenótipo, como descrito anteriormente numa família portadora de del(10q), em que o fenótipo se agravou com a passagem de geração.[15]

Este trabalho traduz a experiência de 10 anos de análise das RSt por FISH e MLPA. Embora inicial-

TABELA 1 ANOMALIAS DETETADAS NO ESTUDO DAS REGIÕES SUBTELOMÉRICAS.

CASO	SEXO	IDADE AO DIAGNÓSTICO	MOTIVO	ANO	TÉCNICA	ANOMALIA ST	ORIGEM
1	M	23	AM, SÍNDROME DISMÓRFICO LEVE (IRMÃO IDÊNTICO)	2000	FISH - Cytocell	dup 1p, del 4q	DESCONHECIDA
2	M	5	SÍNDROME DISMÓRFICO C/ AM GRAVE NÃO ESCLARECIDO	2001	FISH - Cytocell	del 6p, dup 17q	"DE NOVO"
3	F	5	ADPM, DISMORFIAS	2005	FISH - Vysis	del 16p	"DE NOVO"
4	M	10	ACIU, AM GRAVE, ANOMALIAS MÚLTIPLAS	2005	FISH - Vysis	del 4p	"DE NOVO"
5	M	12	AM, DISMORFIAS, PUBERDADE PRECOCE	2005	FISH - Vysis	dup 13q	DESCONHECIDA
6	M	10	ADPM, MICROCEFALIA, ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO	2006	FISH - Vysis	del 6q dup 22q	DESCONHECIDA
7	F	9	SÍNDROME DISMÓRFICO, AM	2006	FISH - Vysis	del 1p	"DE NOVO"
8	F	14	AM, MICROCEFALIA, DISMORFIAS	2006	FISH e MLPA	del 9q	"DE NOVO"
9	F	6	SÍNDROME DISMÓRFICO COM ADPM	2006	FISH - Vysis	del 1p	"DE NOVO"
10	M	30	AM, DISMORFIAS	2006	FISH - Vysis	del 5p, dup 18p	DESCONHECIDA
11	F	5	ADPM, HIPOTONIA	2007	FISH - Vysis	del 2q, dup12q	DESCONHECIDA
12	F	2	ATRASO DE LINGUAGEM, FACIES PECULIAR, HIRSUTISMO	2007	MLPA e FISH	del 22q	"DE NOVO"
13	F	29	AM, DISMORFIAS	2007	MLPA e FISH	del 22q, dup 19q	MATERNA
14	M	9	ADPM	2007	FISH - Vysis	del 1p, dup14q	MATERNA
15	F	1	ADPM GRAVE, DISMORFIA FACIAL	2007	FISH - Vysis	del 1p, dup14q	PATERNA
16	M	14	AM, SÍNDROME DISMÓRFICO, ENCEFALOPATIA EPILÉTICA	2008	FISH - Vysis	del 1p	"DE NOVO"
17	F	5	ADPM, ATAXIA, DISMORFIA FACIAL	2008	MLPA e FISH	del 14q, dup 20q	"DE NOVO"
18	F	9	ADPM, ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO, DISMORFIA FACIAL	2008	MLPA e FISH	dup 4q, del 8p	"DE NOVO"
19	F	2	ADPM, FACIES PECULIAR	2008	MLPA e FISH	del 9q	"DE NOVO"
20	M	7	ADPM, ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO, SINDACTILIA	2008	MLPA e FISH	del 22q	"DE NOVO"
21	F	4	ADPM, DISMORFIA LIGEIRA	2008	MLPA e FISH	del 4p	"DE NOVO"
22	M	5	ADPM	2008	MLPA e FISH	del 22q (P036)	"DE NOVO"
23	M	1	SÍNDROME POLIMALFORMATIVO (DEL 9Q34?), ADPM LIGEIRO	2009	MLPA e FISH	del 9q (P036)	"DE NOVO"
24	F	5	ADPM, FACIES PECULIAR	2009	MLPA e FISH	del 2q	"DE NOVO"
25	M	9	AM, DISMORFIAS	2009	MLPA e FISH	dup 9q, dup 14q	"DE NOVO"
26	F	1	ADPM, MACROCEFALIA	2010	MLPA e FISH	del 11p (MLPA)	"DE NOVO"
27	M	3	ADPM, ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO, S/ DISMORFIAS	2010	MLPA e FISH	del 10q	MATERNA
28	M	4	SUSPEITA DEL 10Q	2010	MLPA e FISH	del 10q	"DE NOVO"

AM: ATRASO MENTAL; **ACIU:** ATRASO DE CRESCIMENTO INTRA-UTERINO; **ADPM:** ATRASO DE DESENVOLVIMENTO PSICOMOTOR; **del**: DELEÇÃO; **dup**: DUPLICAÇÃO; **ST:** SUBTELOMÉRICA

mente o MLPA tenha sido usado como metodologia de rastreio, atualmente é um método de diagnóstico validado, mais rápido e menos dispendioso do que a FISH. Contudo, um resultado anormal é sempre confirmado por FISH.

A microdeleção mais frequente foi a deleção 1p36 (MIM #607872), seguida das deleções 9q34.3 e 22q13.3. A frequência dos rearranjos subteloméricos foi de 2,4%, percentagem inferior à média descrita na literatura, talvez pelo reduzido número de doentes estudados.

Comparando os resultados de FISH e de MLPA verificamos que se detetaram respetivamente, 3,1% e 1,9% de rearranjos subteloméricos com significado clínico, próximos dos valores descritos por alguns autores. Não se observou uma maior probabilidade de anomalias em doentes com AM grave e/ou história familiar de AM e como a diversidade de fenótipo nestes indivíduos é muito variável, não é de descartar o estudo de doentes com diferentes graus de AM, com ou sem história familiar de AM e que tenha associado ou não dismorfias.

É de realçar a importância da comunicação entre o laboratório e o clínico, no sentido de estabelecer corretamente a relação genótipo/fenótipo. Em certos contextos, a informação clínica foi fundamental na valorização das alterações encontradas, permitindo distinguir anomalias com expressão fenotípica de polimorfismos.

A introdução no nosso país de novas tecnologias - "aCGH" e "Next-Generation Sequencing"- nas quais se analisa todo o genoma do doente, permitirá a deteção, mais rápida e economicamente mais vantajosa, de alterações a nível dos genes, subteloméricos ou não, alargando, assim, a possibilidade de diagnóstico nos indivíduos com AM. A posterior investigação da origem da alteração encontrada é fundamental para o necessário aconselhamento genético.

REFERÊNCIAS

1 - Pinto MR, Lima MR, Fortuna AM, Mota MC, Silva MLF, Teles NO, Freitas MM. Aplicação de uma técnica inovadora de FISH na investigação do atraso mental idiopático. Arq Med 2006;20:19-24.
2 – American Psychiatric Association. DSM-IV Manual de diagnóstico e estatística das perturbações mentais 1996 4ª edição. Climepsi editores.
3 - De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. J. Med Genet 2001;38:145-50.
4 - Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, Stankiewicz P, Yatsenko SA, Li Y, Neill S, Pursley AN, Chinault AC, Patel A, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5380 cases. Am J Med Genet 2008;146A:2242-51.
5 - Schluth-Bolard C, Ottaviani A, Bah A, Boussouar A, Boussouar A, Gilson E, Magdinier F. Dynamics and plasticity of chromosome ends: consequences in human pathologies. 2009 http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/SubTelomere.

2013;27[1]:10-14
ARQUIVOS DE MEDICINA

6 - Knight SJL, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. J Med Genet 2000;37:401-09.
7 - Gilson E, Géli V. How telomeres are replicated. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:825-38.
8 - Martins M. Regiões subteloméricas dos cromossomas: os finais (quase) perfeitos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Universidade do Porto, 2010.
9 - 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;9:132-40.
10 - Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, Van Den Ende J, Van Bever Y, Kooy RF. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Hum Mutation 2004;23:17-21.
11 - Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merkx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative. Am J Hum Genet 2002;70:1269-76.
12 - Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG. The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. Am J Med Genet 2007;143A:1850-57.
13 - Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C, Mann K. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. BMC Med Genet 2007;5:8-9.
14 - Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J, Oudakker AR, et al. Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. Am J Med Genet 2006;79(2):370-77.
15 - Irving M, Hanson H, Turnpenny P, Brewer C, Ogilvie CM, Davies A, Berg J. Deletion of the distal long arm of chromosome 10; is there a characteristic phenotype? Am J Med Genet 2003;123A:153-63.

CORRESPONDÊNCIA:
MANUELA MOTA FREITAS
UNIDADE DE CITOGENÉTICA DO CENTRO DE GENÉTICA MÉDICA DOUTOR JACINTO MAGALHÃES, INSA
PRAÇA PEDRO NUNES, Nº88
4099-028 PORTO

EMAIL:
MANUELA.MOTAFREITAS@GMAIL.COM