



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Pedro Miguel Vaz Veiga

AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR
NO ÂMBITO DO DÉFICE COGNITIVO,
PERTURBAÇÃO DO ESPETRO AUTISTA E
ANOMALIAS CONGÉNITAS

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Genética Clínica
Laboratorial orientada pela Professora Doutora Joana Barbosa de
Melo e pela Mestre Susana Isabel Ferreira e apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Junho de 2022

AGRADECIMENTOS

A todos que permitiram a concretização deste trabalho o meu enorme agradecimento.

À Professora Doutora Joana Barbosa de Melo, minha orientadora, um agradecimento muito especial por toda a ajuda, disponibilidade, preocupação e pela confiança que depositou em mim. Agradeço também pelos conselhos valiosos, por todo o conhecimento que me transmitiu ao longo do mestrado e por fomentar o meu espírito crítico e capacidade de análise, contribuindo para o meu crescimento enquanto geneticista clínico laboratorial.

À Susana Ferreira, minha coorientadora, agradeço todo o conhecimento transmitido, o apoio e simpatia que demonstrou durante o estágio.

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, diretora do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, um agradecimento especial por possibilitar a realização do estágio no LCG-FMUC, por todo o conhecimento que me transmitiu ao longo do mestrado e pelos incentivos que nos fazem dar o nosso melhor.

A toda a equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC, Alexandra Mascarenhas, Ana Jardim, Cláudia Pais, Lúcia Simões, Luís Miguel Pires, Mariana Val, Marta Pinto, Nuno Lavoura e Patrícia Paiva, agradeço pela forma como me receberam, fazendo-me sentir parte desta “família”, por todo o conhecimento que me transmitiram durante o estágio e pela amizade.

Aos meus colegas de estágio Gui Rosa, Joana Justo e Teresa Ribeiro, agradeço por todos os bons momentos que passámos.

Por último, um agradecimento à minha família, especialmente aos meus pais e à minha madrinha, porque sem eles não seria possível a realização deste mestrado.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJETIVOS	1
1.2 CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	2
2. ANÁLISE CITOGÉNÉTICA E MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO PRÉ E PÓS-NATAL	4
2.1 CITOGÉNÉTICA E GENÓMICA – PERSPETIVA GERAL	4
2.1.1 CICLO CELULAR E CROMOSSOMAS	7
2.1.2 NOMENCLATURA	8
2.1.3 ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS.....	9
2.1.3.1 ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS NUMÉRICAS	10
2.1.3.2 ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS ESTRUTURAIS	11
2.2 DIAGNÓSTICO PRÉ E PÓS-NATAL	13
2.3 METODOLOGIAS.....	16
2.3.1 FASE PRÉ-ANALÍTICA	16
2.3.2 FASE ANALÍTICA	18
A – CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL	18
A1 – CULTURA DE CÉLULAS.....	18
A1.1 – CULTURA DE AMNIÓCITOS	21
A1.2 – CULTURA DE VILOSIDADES CORIÓNICAS	22
A1.3 – CULTURA DE FIBROBLASTOS	23

A1.4 – CULTURA DE LINFÓCITOS	24
A2 – MANIPULAÇÃO E ESPALHAMENTO	24
A3 – BANDAGEM	27
A4 – ANÁLISE AO MICROSCÓPIO	31
A5 – CRIOPRESERVAÇÃO E RESTITUIÇÃO DE CULTURAS CELULARES	33
B – CITOGENÉTICA MOLECULAR	35
B1 – <i>FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)</i>	35
C – GENÉTICA MOLECULAR E GENÓMICA	38
C1 – EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO, QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA E PURIFICAÇÃO	38
C2 – <i>QUANTITATIVE FLUORESCENT-PCR</i>	40
C3 – DIAGNÓSTICO DE X-FRÁGIL POR PCR	42
C4 – DESPISTE DE CONTAMINAÇÃO MATERNA	45
C5 – <i>MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)</i> E <i>METHYLATION SPECIFIC MLPA (MS-MLPA)</i>	47
C6 – <i>ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (ACGH)</i>	51
C7 – <i>NON-INVASIVE PRENATAL TESTING (NIPT)</i>	54
2.3.3 FASE PÓS-ANALÍTICA	57
3. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE CASOS CLÍNICOS	60
3.1 CASO CLÍNICO 1	61
3.2 CASO CLÍNICO 2	62
3.3 CASO CLÍNICO 3	64
3.4 CASO CLÍNICO 4	66
3.5 CASO CLÍNICO 5	69
3.6 CASO CLÍNICO 6	72
3.7 CASO CLÍNICO 7	74

3.8 CASO CLÍNICO 8	79
3.9 CASO CLÍNICO 9	83
4. CONCLUSÃO	85
5. REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	96
ANEXO I – EXEMPLO DA FOLHA DE ANÁLISE CITOGENÉTICA	96
ANEXO II – MODELO DO RELATÓRIO DE RESULTADOS	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ideograma do cromossoma 17 com uma resolução de 550 bandas.

Figura 2 – Esquema representativo de uma não-disjunção na meiose I e II.

Figura 3 – Exemplos das alterações cromossómicas estruturais mais comuns.

Figura 4 – Separação do material materno (vermelho), do material fetal (rosa) à lupa.

Figura 5 – Avaliação do crescimento celular no microscópio invertido.

Figura 6 – *Workflow* do processo de obtenção de cromossomas em metafase para o estudo citogenético.

Figura 7 – Exemplo de bandagem Q, de bandagem G e bandagem R do cromossoma 9.

Figura 8 – Procedimento da bandagem GTL.

Figura 9 – Avaliação da bandagem GTL ao microscópio.

Figura 10 – Procedimento da bandagem CBG.

Figura 11 – Avaliação da bandagem CBG ao microscópio e exemplo de bandagem CBG.

Figura 12 – Procedimento inicial da bandagem AgNOR.

Figura 13 – Qualidade mínima das bandas G consoante o motivo do estudo.

Figura 14 – Alterações no meio celular durante a criopreservação com diferentes tempos de criopreservação.

Figura 15 – Exemplos dos diferentes tipos de sondas utilizadas na técnica de FISH.

Figura 16 – *Workflow* geral do procedimento da FISH.

Figura 17 – Esquema simplificado do processo de extração de DNA genómico utilizando colunas de sílica.

Figura 18 – Análise de fragmentos após QF-PCR.

Figura 19 – Resultado do PCR convencional numa amostra do sexo masculino.

Figura 20 – Resultado do PCR convencional numa amostra do sexo feminino.

Figura 21 - Representação da localização dos *primers* utilizados no PCR convencional e no TP-PCR.

Figura 22 – Resultado do TP-PCR.

Figura 23 – Exemplo de como é feita a análise dos marcadores para averiguar a presença de contaminação materna.

Figura 24 – Representação esquemática da técnica de MLPA.

Figura 25 – Controlo de qualidade da reação pela análise dos fragmentos Q e D.

Figura 26 - Representação esquemática do procedimento de MS-MPLA.

Figura 27 – Esquema representativo da metodologia do aCGH.

Figura 28 – Gel de agarose para controlo de qualidade da reação do PCR universal.

Figura 29 – *Workflow* geral do procedimento do teste pré-natal não invasivo.

Figura 30 – Cariograma representativo do caso 1.

Figura 31 – Cariograma representativo do caso 2.

Figura 32 – Cariograma representativo de uma das linhas celulares encontradas no caso 3.

Figura 33 – Resultado da técnica de MLPA.

Figura 34 – Locais de hibridização da sonda N25 da Cytocell® e observação ao microscópio de fluorescência de uma metafase e uma interfase pela técnica de FISH.

Figura 35 – Representação esquemática do rácio das sondas conforme exibido pelo *software*, nos progenitores.

Figura 36 – Eletroferogramas obtido após TP-PCR.

Figura 37 – Eletroferograma obtido após TP-PCR.

Figura 38 – Resultado do despiste de contaminação materna para um dos marcadores analisados.

Figura 39 – Resultado do aCGH para o cromossoma 22 e análise da alteração encontrada recorrendo à base de dados *Genome Browser*.

Figura 40 – Resultado do aCGH dirigido nos progenitores.

Figura 41 – Resultado do aCGH para o cromossoma 2 e análise da alteração encontrada recorrendo à base de dados *Genome Browser*.

Figura 42 – Resultado do aCGH para o cromossoma 14 e análise da alteração encontrada recorrendo à base de dados *Genome Browser*.

Figura 43 – Resultado do aCGH para o cromossoma 15 e análise da alteração encontrada recorrendo à base de dados *Genome Browser*.

Figura 44 – Estudo citogenético no bebé e nos progenitores.

Figura 45 – Resultado do aCGH para o cromossoma 14 e análise da alteração encontrada recorrendo à base de dados *Genome Browser*.

Figura 46 – Confirmação da deleção encontrada no feto por MLPA e estudo nos progenitores.

Figura 47 – Estudo da metilação por MS-MLPA.

Figura 48 – Resultado obtido para esta amostra.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Vantagens e limitações das diferentes técnicas aplicadas no laboratório.

Tabela II - Tempos de resposta mediante o tipo de amostra biológica disponível para análise.

Tabela III – Resumo dos casos clínicos com referência à indicação clínica e técnicas utilizadas.

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH - *Array Comparative Genomic Hybridization*

ACSS - Administração Central do Sistema de Saúde

BA(OH)₂ - Hidróxido de bário

CBG – Bandas C obtidas por ação hidróxido de bário e coradas com Giemsa

CfDNA – *Cell-free DNA*

CNVs – *Copy number variations*

COBRA-FISH - *combined binary ratio labeling FISH*

CRA – *Chromosome Resolution Additive*

CVS - *Chorionic villus sampling*

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DGV – *Database of Genomic Variants*

DMSO - *Dimethyl sulfoxide*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

DOP-PCR - *Degenerate oligonucleotide-primed PCR*

EBMG – *European Board of Medical Genetics*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ESHG - *European Society of Human Genetics*

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*

FMRI – *fragile X messenger ribonucleoprotein 1*

FMRP – *fragile X mental retardation protein*

FXPOI - *Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency*

FXS – *fragile X syndrome*

FXTAS - *Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*

GenQA - *Genomics Quality Assessment*

GTG – Bandas G obtidas por ação da tripsina e coradas com Giemsa

GTL – Bandas G obtidas por ação da tripsina e coradas com Leishmen

HBSS - *Hank's Balanced Salt Solution*

HCl – Ácido clorídrico

ISCN - *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

ISH – *in situ hybridization*

kb - kilobase

KCl – Cloreto de potássio

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

LCRs – *Low-copy repeats*

Mb - Megabase

M-FISH - *multicolour FISH*

MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MS-MLPA - *Methylation Specific MLPA*
MTX - Metotrexato
NaCl - Cloreto de sódio
NGS – *Next Generation Sequencing*
NIPT – *Non-invasive prenatal testing*
NOR - *Nucleolar Organizing Region*
OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*
PBS - *Phosphate-buffered saline*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
QF-PCR – *Quantitative fluorescent PCR*

QFQ – Bandas Q obtidas por fluorescência usando quinacrina
RNA - *Ribonucleic acid*
SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade
SKY-FISH - *spectral karyotyping FISH*
SNP – *Single nucleotide polymorphisms*
SSC - *Saline-Sodium Citrate*
STRs – *Short tandem repeats*
TP-PCR – *Triplet Repeat Primed PCR*
UPD – *Uniparental disomy*
UTR – *Untranslated region*
WCP – *whole chromosome painting*

RESUMO

As técnicas da citogenética e da genómica permitem a caracterização de rearranjos cromossómicos que podem estar subjacentes a casos onde existe um défice cognitivo, anomalias congénitas, perturbação do espectro autista ou outras alterações fenotípicas. De acordo com o objetivo do estudo deve-se escolher a técnica mais adequada à análise, tendo em conta as limitações inerentes a cada uma.

Os estudos genéticos podem ser mais abrangentes ou então dirigidos para determinadas regiões genómicas. A citogenética convencional permite o estudo constitutivo dos cromossomas, detetando alterações cromossómicas com um tamanho a partir de 5-10Mb. Por outro lado, o aCGH é uma técnica de alta resolução, capaz de detetar alterações com uma resolução ~100x superior à resolução da citogenética convencional. No entanto, não permite a deteção de rearranjos equilibrados, sendo esta uma das limitações das técnicas moleculares. A resolução da citogenética pode ser aumentada recorrendo à citogenética molecular, nomeadamente a FISH, apresentando uma resolução 50x superior à da citogenética convencional. Contudo, esta apenas permite um estudo dirigido para determinadas regiões cromossómicas.

O MLPA, o QF-PCR, o estudo das repetições do trinucleótido CGG por PCR para diagnóstico da síndrome do X-frágil e o NIPT também são técnicas dirigidas. O MLPA é uma técnica semi-quantitativa, que utiliza sondas específicas para determinadas regiões do genoma, permitindo avaliar variações no nº de cópias. O QF-PCR baseia-se na amplificação de microssatélites, por isso não permite avaliar outras regiões do genoma. Além disso, é específico para STRs dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y. O diagnóstico de X-frágil por PCR consiste no estudo das repetições do trinucleótido CGG, localizadas na região 5'-UTR do gene *FMR1*, utilizando *primers* que flanqueiam a região alvo. O NIPT é um método de rastreio molecular que utiliza o DNA fetal livre em circulação materna e permite determinar o risco do feto para determinadas alterações cromossómicas, nomeadamente as aneuploidias dos cromossomas 13, 18 e 21, utilizando as técnicas de NGS.

A utilização conjunta das técnicas da citogenética e moleculares permite ultrapassar algumas limitações inerentes a cada uma, contribuindo para um diagnóstico mais completo e uma correta relação genótipo-fenótipo. O principal objetivo deste trabalho foi conhecer e dominar as tecnologias laboratoriais aplicadas no diagnóstico pré e pós-natal e ser capaz de interpretar os resultados obtidos, integrando os conceitos adquiridos ao

longo de todo o mestrado. Neste relatório de estágio são abordadas as diferentes metodologias realizadas de citogenética convencional e molecular, biologia molecular e genómica em contexto de diagnóstico pré e pós-natal. No final do relatório são caracterizados 9 casos clínicos recorrendo a diversas técnicas, no âmbito da genética clínica laboratorial.

Palavras-chave: citogenética; genómica; alterações cromossómicas; diagnóstico pré e pós-natal.

ABSTRACT

The cytogenetics and genomics techniques allow the characterization of chromosomal rearrangements that may be the underlying cause of cases where there is intellectual disability, congenital anomalies, autism spectrum disorder, or other phenotypic changes. Depending on the aim of the study, choosing the most appropriate technique for the analysis is conditioned by the intrinsic limitations of each one.

Genetic studies may be more extensive or directed to certain genomic regions. Conventional cytogenetics allows the constitutive study of chromosomes, detecting chromosomal abnormalities greater than 5-10Mb. On the other hand, aCGH is a high-resolution technique capable of detecting changes with a resolution ~100x higher when compared to the conventional cytogenetics resolution. However, it does not allow the detection of balanced rearrangements, which is one of the limitations of molecular techniques. The resolution of cytogenetics can be increased using molecular cytogenetics, namely FISH, presenting a resolution 50x higher than that of conventional cytogenetics. Nevertheless, it only allows the directed study of certain chromosomal regions.

MLPA, QF-PCR, the study by PCR of the CGG trinucleotide repeats for the X-fragile syndrome diagnosis, and NIPT are also selective techniques. MLPA is a semi-quantitative technique that uses specific probes for certain regions of the genome, allowing the evaluation of copy number variations. QF-PCR is based on the amplification of microsatellites and therefore does not allow the assessment of other regions of the genome. Furthermore, it is specific to the STRs of the chromosomes 13, 18, 21, X and Y. The diagnosis of the X-fragile syndrome by PCR consists of the study of the CGG trinucleotide repeats, located at the 5'-UTR region of the *FMR1* gene, using specific primers. NIPT is a molecular screening method that uses cell-free fetal DNA in maternal circulation and allows the determination of the fetus's risk for certain chromosomal abnormalities such as the aneuploidies of the 13, 18 and 21 chromosomes. This is achieved by using the NGS techniques.

The use of both cytogenetic and molecular techniques allows to overcome some intrinsic limitations, contributing to a more complete diagnosis and a correct genotype-phenotype correlation. The main aim of this work was to know and master the laboratory technologies applied in pre and postnatal diagnosis and to be able to interpret the results obtained, integrating the concepts acquired throughout the master's in Clinical Laboratory Genetics. This internship report addresses the different methodologies of

conventional and molecular cytogenetics, molecular biology, and genomics in the context of pre and postnatal diagnosis. There is also the characterization of 9 clinical cases using various techniques within the scope of clinical laboratory genetics.

Keywords: cytogenetics; genomics; chromosomal abnormalities; pre and postnatal diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJETIVOS

O estágio curricular, inserido no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial, permite a aquisição de competências e conhecimentos onde é possível interagir e integrar uma equipa multidisciplinar. Esta componente apresenta-se de extrema importância por permitir uma consolidação de conhecimentos adquiridos ao longo de todo o mestrado. Além disso, possibilita uma interação mais prática no domínio da genética clínica laboratorial. A integração num ambiente real de trabalho proporciona uma melhor perceção da rotina de um laboratório de diagnóstico. Dado o seu carácter mais profissionalizante também permite fomentar o trabalho responsável, autónomo e o espírito crítico, contribuindo para uma melhor formação.

O estágio decorreu no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, durante cerca de oito meses. Durante a permanência no laboratório foram abordadas metodologias da citogenética convencional e molecular, como também da biologia molecular e genómica em contexto de diagnóstico pré e pós-natal. Foram acompanhadas todas as etapas do ciclo laboratorial, que incluem a fase pré-analítica, analítica e pós-analítica. Deste modo, foi possível contactar com as amostras desde a sua chegada ao laboratório e respetivo registo, seguindo-se as diferentes análises, mediante a requisição e também a elaboração do relatório de resultados.

Os principais objetivos deste estágio foram:

- Conhecer e dominar diferentes tecnologias laboratoriais e ser capaz de definir a melhor estratégia de estudo, de acordo com a indicação clínica, percebendo as vantagens e limitações inerentes a cada técnica;
- Compreender a dinâmica de um laboratório de diagnóstico citogenético e molecular, desde as diferentes metodologias utilizadas, como também o funcionamento dos equipamentos, aplicando as normas e boas práticas laboratoriais;
- Interpretar os resultados obtidos e integrá-los com os conceitos adquiridos e mecanismos biológicos;
- Compreender a regulamentação e os princípios éticos associados à comunicação de resultados;

- Aplicar as regras de nomenclatura das alterações cromossómicas de acordo com o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) e conhecer os elementos essenciais que devem constar num relatório de resultados.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC) enquadra-se num laboratório de diagnóstico dinâmico e multidisciplinar, sendo constituído por um grupo de técnicos especializados reconhecidos pela Administração Central do Sistema de Saúde (ACSS). Alguns são ainda reconhecidos pela *European Board of Medical Genetics* da *European Society of Human Genetics* (EBMG-ESHG) como Especialistas Europeus em Genética Clínica Laboratorial. Além do diagnóstico, o laboratório também está envolvido em vários projetos de investigação, abrangendo diferentes áreas. Com a sua atividade iniciada há mais de duas décadas, este laboratório dirigido pela Professora Doutora Isabel Marques Carreira, é altamente especializado nas áreas da citogenética convencional e molecular, biologia molecular e citogenómica. O LCG-FMUC possui uma vasta lista de testes genéticos, permitindo dar resposta às mais diversas situações clínicas, nomeadamente diagnóstico pré e pós-natal, casos de infertilidade, autismo, perturbação do desenvolvimento intelectual, entre outros.

O LCG-FMUC integra ainda um sistema de gestão de qualidade (SGQ), certificado pela norma ISO 9001:2015. Esta norma, sendo uma referência internacional para a certificação, garante inúmeras vantagens internas e externas, nomeadamente o aumento da produtividade, melhorias na qualidade, melhorias organizacionais, aumento da satisfação dos clientes, entre outros. Deste modo, existe uma integração entre os controlos internos e os diferentes programas de controlo externo de qualidade do *Genomics Quality Assessment* (GenQA). Sendo um laboratório certificado, existem auditorias periódicas de modo avaliar os vários parâmetros de qualidade. O laboratório mantém um sistema de gestão de qualidade para superar os requisitos da certificação o que demonstra a qualidade dos serviços prestados. Uma mais-valia de integrar um SGQ certificado está relacionada com a garantia da manutenção e calibração de todos os equipamentos, a existência de um controlo dos documentos e registos de todos os procedimentos, protocolos, materiais e reagentes. Um bom SGQ permite essencialmente uniformizar as boas práticas e minimizar possíveis erros.

O laboratório está inserido num nível 2 de biossegurança e está estruturalmente dividido em várias secções. As amostras são recebidas num local específico onde lhe é atribuído um código e todos os dados são registados. Posteriormente, as amostras são processadas em diferentes salas mediante o teste requisitado. As diversas secções estão equipadas com os equipamentos necessários às diferentes análises, nomeadamente câmaras de fluxo laminar, incubadoras, microscópio invertido, centrífugas, câmara de espalhamento, microscópios de fluorescência, microscópios acoplados a sistemas de captura de imagem, analisador genético, termocicladores, *scanner* de *array*, sequenciadores de NGS, entre outros.

2. ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO PRÉ E PÓS-NATAL

2.1 CITOGENÉTICA E GENÓMICA – PERSPETIVA GERAL

A história da genética teve início nos meados do século XIX com os primeiros trabalhos de Mendel. A contribuição de Gregor Mendel para o conhecimento que existe atualmente é indiscutível, as suas descobertas permitiram a aquisição de conhecimentos relativamente à hereditariedade e outros conceitos relacionados com a genética (Gayon, 2016). Até à data, é notória a evolução desta área que se revelou extremamente importante para a compreensão da etiologia de determinadas patologias e dos mecanismos subjacentes. De facto, a genética abriu e continua a abrir novos caminhos e linhas de investigação com aplicação na clínica. A genética é a área que estuda a hereditariedade, ou seja, dedica-se ao estudo dos genes e todos os aspetos relacionados com estes que são a unidade básica da hereditariedade (National Institute of General Medical Sciences, 2022).

Com o avanço do conhecimento e com a expansão das plataformas tecnológicas, as análises genéticas tornaram-se cada vez mais uma prática corrente na clínica e na investigação. Inicialmente surgiu a citogenética e mais tarde começaram a aparecer as técnicas moleculares com um maior poder de resolução.

A citogenética é um ramo da genética que se dedica ao estudo das estruturas celulares, dando uma grande ênfase às análises cromossómicas. O foco principal da citogenética são os cromossomas, a sua estrutura e a hereditariedade. Contudo, esta área também procura analisar e explicar os fatores que podem levar a alterações cromossómicas (Kannan e Zifalil, 2009). Na citogenética convencional é realizado o estudo constitutivo dos cromossomas por microscopia ótica, sendo possível identificar alterações cromossómicas na ordem dos 5-10Mb (Silva et al., 2019).

Os cromossomas foram primeiramente visualizados por Walther Flemming, em 1882. No entanto, apenas em 1956 foi possível identificar e estabelecer os 46 cromossomas humanos. Esta descoberta resultou dos avanços das técnicas analíticas, o que permitiu obter metafases com melhor qualidade e um melhor espalhamento. Os cromossomas são formados por DNA e proteínas, encontrando-se dispersos no núcleo da célula sob a forma de cromatina, protegida pela membrana nuclear. A compreensão das diferentes fases do ciclo celular é crucial para a perceção do comportamento dos

cromossomas aquando da divisão mitótica e meiótica (Kannan e Zifalil, 2009). Em 1959, foi descoberta a primeira doença com origem cromossômica, a trissomia 21, identificada por Lejeune, Gautier e Turpin, após observação de um cromossoma supranumerário em metafases de fibroblastos (Gautier e Turpin, 1958). A identificação desta alteração cromossômica numérica abriu caminho para a descoberta de outras aneuploidias, como a Síndrome de Turner (Ford et al., 1959) e a Síndrome de Klinefelter (Jacobs e Strong, 1959). Um ano mais tarde, foi identificada a trissomia dos cromossomas 13 e 18 (Patau et al., 1960; Edwards et al., 1960).

A partir da década de 70, começaram a surgir as técnicas de bandagem. Caspersson et al., conseguiram demonstrar a existência de bandas ao longo dos cromossomas usando marcadores com fluorescência, nomeadamente mostarda de quinacrina, recorrendo à microscopia de fluorescência. Este tipo de bandagem passou a ser designado por QFQ (Bandas Q obtidas por Fluorescência usando Quinacrina) pelo *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN). Devido aos inconvenientes desta técnica, outras foram surgindo, nomeadamente a bandagem G, R, C e NOR. (Moore e Best, 2001a; Kannan e Zifalil, 2009).

Com o avanço das tecnologias e da ciência, apareceram outras técnicas com um maior poder de resolução, combinando a citogenética convencional e as técnicas moleculares. A citogenética molecular, nomeadamente a *fluorescence in situ hybridization* (FISH), permite a deteção de alterações cromossômicas mais pequenas, possuindo um poder de resolução superior à citogenética convencional. O princípio da FISH consiste na formação de um complexo estável entre uma sequência de DNA (material alvo) e uma sonda com fluorescência, após um conjunto de procedimentos técnicos. Estas sondas podem hibridizar em cromossomas metafásicos, núcleos em interfase ou até fibras de cromatina (Speicher e Carter, 2005; Kannan e Zifalil, 2009). A FISH é uma técnica dirigida e extremamente versátil utilizada na identificação de cromossomas específicos, regiões cromossômicas ou sequências, baseando-se em três passos específicos. Inicialmente, é necessária a preparação da sonda e do material alvo, seguida de hibridização, que consiste na ligação por complementaridade da sonda ao material alvo, por exemplo, cromossomas desnaturados e fixados em lâminas de vidro. Por último, efetua-se a visualização recorrendo à microscopia de fluorescência (Wolff, 2013).

A citogenética convencional tem como vantagem o estudo de todos os cromossomas, permitindo a deteção de alterações estruturais ou de ploidia. Por outro lado, a citogenética molecular permite a deteção de alterações cromossómicas com um tamanho mais reduzido, que não são detetadas pela citogenética convencional, sendo esta uma limitação da técnica. No entanto, na citogenética molecular os reagentes são bastante dispendiosos (Ribeiro, 2018). A citogenética convencional tem ainda as desvantagens de necessitar de cultura celular, levando à demora dos resultados e a necessidade de treino por parte do operador. A obtenção de cromossomas em metafase para análise do cariótipo está dependente da cultura de células, onde o objetivo é obter o maior número de células em divisão. Para isso, é necessário estimular o crescimento celular recorrendo à utilização de fatores de crescimento e um meio nutritivo adequado. Posteriormente, deve ser realizado o bloqueio do ciclo celular para que se obtenha um grande número de células em metafase. Os tipos de cultura e os procedimentos a realizar vão depender do material biológico que pretendemos estabelecer em cultura (Howe et al, 2014).

Com o avanço do conhecimento científico e com a expansão das novas tecnologias, foi necessário desenvolver novas ferramentas que pudessem resolver casos complexos que ainda não tinham resposta. Assim, foi necessário a criação de metodologias mais específicas e com um maior poder de resolução. O Projeto do Genoma Humano, com início em 1990 e finalizado em 2003, teve um enorme contributo para este desenvolvimento, permitindo a entrada na “Era das ómicas”. A descoberta da estrutura em dupla hélice do DNA, por Watson e Crick com contribuição de Rosalind Franklin em 1953, foi um marco importante na história da genómica (Watson e Crick, 1953). Uma vez compreendida a estrutura do DNA, foi possível adquirir novos conhecimentos acerca desta molécula e de processos diretamente relacionados com ela (Giani et al., 2020). A partir desta altura, o principal foco era descobrir a sequência do DNA. Em 1977, Frederick Sanger e a sua equipa desenvolveram um método de sequenciação, denominado posteriormente de Sequenciação de Sanger (Heather e Chain, 2016). No entanto, este método apresenta alguns inconvenientes, pois apenas permite o estudo limitado e dirigido de uma determinada região do genoma (Heather e Chain, 2016; Ribeiro, 2018). Foram surgindo novas técnicas que permitem avaliar variações no número de cópias como o *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e o *Array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH) e outras técnicas mais detalhadas, como as metodologias de *Next Generation Sequencing* (NGS), que permitem a sequenciação de milhões de

pequenos fragmentos de DNA em simultâneo e possibilitam a deteção de variantes ao nível da sequência de DNA (Behjati e Tarpey, 2013; Ribeiro, 2018).

Tanto a citogenética convencional e molecular como a genómica podem ser aplicadas na parte clínica para estudos cromossómicos ou moleculares, em contexto de diagnóstico pré e pós-natal. A escolha da técnica mais adequada está relacionada com o tipo de estudo que pretendemos executar, das vantagens e limitações inerentes a cada uma (Tabela I) e da indicação clínica. A principal vantagem das técnicas da biologia molecular em comparação com a citogenética convencional, está relacionada com a resolução, permitindo avaliar mais regiões do genoma de forma detalhada e esclarecer possíveis quadros clínicos (Durmaz et al., 2015).

2.1.1 CICLO CELULAR E CROMOSSOMAS

A divisão celular mitótica e meiótica são dois processos críticos para o crescimento e proliferação celular. Enquanto a meiose é um processo confinado às células germinativas presentes nas gónadas e que dá origem aos gametas, a mitose ocorre nas células somáticas, originando duas células idênticas. O ciclo celular tem a duração de aproximadamente 17-18h e está dividido em 4 fases: G1, S, G2 e M (Keagle, 2013). A fase G1 é normalmente a mais longa, durante esta fase as células são metabolicamente ativas e sintetizam diversos componentes celulares como membranas, organelos, ribossomas e proteínas. Se as condições forem favoráveis ao crescimento e divisão celular, as células entram na fase de síntese (fase S) e ficam comprometidas à replicação do DNA (Alberts et al., 2002). No final da fase S a quantidade de DNA é o dobro ($4n$) da quantidade normal da espécie humana ($2n$) (Keagle, 2013). No final da interfase, ocorre a fase G2, onde a célula se prepara para entrar em divisão mitótica, então ocorre a síntese de RNA e proteínas (Keagle, 2013). Após estar concluída a interfase, as células entram em mitose. A fase M corresponde ao momento em que uma célula dá origem a duas células idênticas e está dividida em diversas etapas: prófase, metafase, anáfase, telófase e citocinese.

A meiose é um processo de divisão celular que compreende duas fases, uma fase reducional e outra equacional. Neste caso, observam-se dois ciclos de divisão do material genético, após uma única replicação do DNA e por este motivo o complemento cromossómico passa de diploide ($2n=46$) para haploide ($n=23$). Cada gameta produzido apresenta apenas uma cópia de cada cromossoma e o complemento diploide é apenas

restabelecido aquando da fecundação (Keagle, 2013). A meiose I está dividida em quatro fases distintas: prófase I, metafase I, anáfase I e telófase I. Por sua vez, a prófase I está ainda subdividida em diferentes fases: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. De forma sequencial inicia-se a meiose II onde ocorre a divisão equacional, semelhante à mitose.

As células humanas são constituídas por diferentes organelos responsáveis por diversas funções celulares. Nelas também se encontra o núcleo, local onde está armazenada a informação genética. O DNA encontra-se disperso no núcleo sob a forma de cromatina associado a proteínas (Keagle, 2013). Os cromossomas humanos apresentam uma estrutura linear e consistem em dois cromatídeos-irmãos formados por DNA de dupla hélice compactado (Keagle, 2013). Nos cromossomas é possível distinguir várias regiões específicas, nomeadamente o braço curto (p), o braço longo (q), o centrómero, os telómeros (Figura 1) e nos cromossomas acrocêntricos ainda se consegue distinguir as regiões organizadoras nucleolares (NOR). Os cromossomas localizam-se no núcleo das células humanas, contendo 22 pares de autossomas e 1 par de cromossomas sexuais, à exceção dos eritrócitos que são células anucleadas. Por outro lado, os gâmetas são células haploides, por isso apenas apresentam apenas 23 cromossomas, ao contrário das células diploides humanas ($2n=46$) (Keagle, 2013; Gardner e Amor 2018).

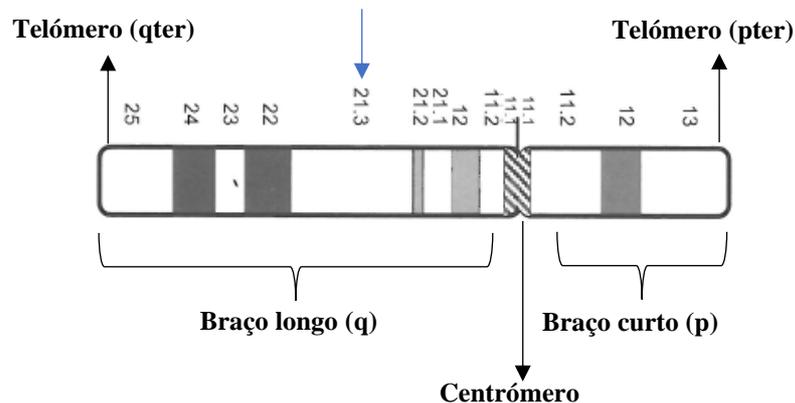


Figura 1 – Ideograma do cromossoma 17 com uma resolução de 550 bandas. As bandas escuras são G positivas e as bandas claras são G negativas. A heterocromatina está representada por linhas na diagonal. Exemplo: A banda 21.3 destacada com a seta azul deve ser descrita como 17q21.3 (cromossoma 17, braço longo, região 2, banda 1, sub-banda 3. Adaptado de McGowan-Jordan et al., 2020

2.1.2 NOMENCLATURA

Após a identificação dos 46 cromossomas humanos por Tijo e Levan, em 1956, foi necessário criar um conjunto de normas e *guidelines* universais para estabelecer uma

descrição dos cromossomas e alterações cromossómicas que não fosse ambígua e compreendida por todos. Por este motivo, em 1960 um grupo de investigadores reuniu-se em Denver, no Colorado e estabeleceram uma nomenclatura utilizada para descrever alterações cromossómicas, conhecida atualmente por *International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (ISCN) (McGowan-Jordan et al., 2020). Com o avanço das novas tecnologias de análise do genoma, o ISCN é periodicamente atualizado para estar a par das novas designações e continuar a fomentar o propósito para o qual foi criado (Slovak et al., 2013).

2.1.3 ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS

As alterações cromossómicas podem ser classificadas em duas categorias: alterações cromossómicas numéricas e alterações cromossómicas estruturais. Estas alterações podem envolver apenas os autossomas, os cromossomas sexuais ou ambos. Com uma incidência de 1 em 554 nascimentos, o impacto fenotípico destas alterações é variável (Thompson e Thompson, 2015). No caso de uma alteração cromossómica numérica, a severidade depende do tamanho do cromossoma envolvido, uma vez que quanto maior o cromossoma, maior será a informação genética que contém. Além disso, o impacto no fenótipo vai depender se houve um ganho ou perda de um cromossoma e se a alteração tem origem num autossoma ou num cromossoma sexual. Por outro lado, numa alteração cromossómica estrutural, o impacto no fenótipo vai estar dependente da localização dos pontos de quebra, da constituição génica dessas regiões e dos cromossomas envolvidos (Malheiro e Porto, 2012; Thompson e Thompson, 2015).

Quando os cromossomas envolvidos possuem regiões de *imprinting*, é necessário avaliar a presença de dissomia uniparental (UPD), pois pode ter consequências ainda mais graves para o feto. A dissomia uniparental (UPD) é um mecanismo patogénico que deve ser considerado nos estudos genéticos, principalmente quando as alterações cromossómicas envolvem os cromossomas 6, 7, 11, 14, 15 e 20. Estes cromossomas apresentam regiões sujeitas a *imprinting* genómico, logo a presença de dissomia uniparental pode culminar no aparecimento de uma síndrome. A deteção laboratorial da dissomia uniparental consiste na utilização de técnicas que permitem avaliar a metilação de determinadas regiões cromossómicas (Gardner e Amor, 2018). Uma técnica de eleição para a resolução destes casos é o *Methylation Specific MLPA* (MS-MLPA). O SNParray também permite a deteção de alguns casos de UPD.

2.1.3.1 ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS NUMÉRICAS

As alterações cromossômicas numéricas podem ser divididas em duas categorias: poliploidias e aneuploidias. A etiologia deste tipo de alterações é variável, por isso a citogenética convencional é uma ferramenta extremamente útil e indispensável no diagnóstico destas alterações. As alterações numéricas são as mais frequentes na espécie humana e são a principal causa de abortos espontâneos e anomalias congênitas. Na grande maioria, estas alterações estão associadas a erros na segregação dos cromossomas durante a divisão mitótica ou meiótica, ou por fenômenos anómalos durante a fecundação, no caso das poliploidias (Wang, 2013a; Thompson e Thompson, 2015). O mecanismo biológico subjacente às aneuploidias é a não-disjunção meiótica (Figura 2) ou mitótica, onde a idade materna avançada é um fator de risco. A não-disjunção mitótica origina um mosaico e, portanto, os efeitos desta alteração são variáveis, estando dependentes do número de células com a alteração cromossômica e o tecido onde estão presentes. Além disso, a gravidade da situação também varia consoante a não-disjunção ocorre numa fase precoce do desenvolvimento embrionário ou numa fase tardia.

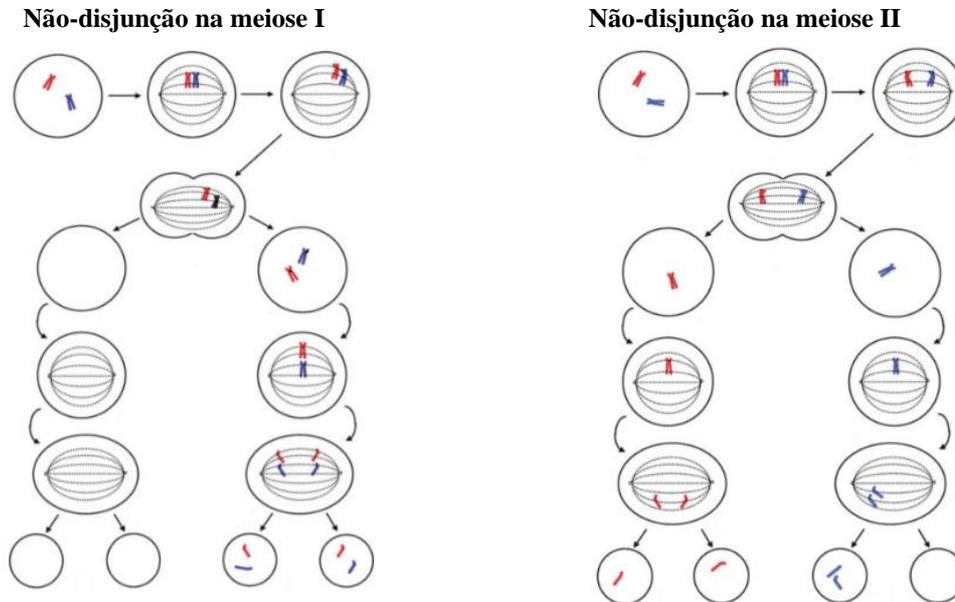


Figura 2 – Esquema representativo de uma não-disjunção na meiose I e II. Na figura A é possível observar a divisão meiótica onde os dois cromossomas homólogos segregam para o mesmo polo da célula, originando quatro gâmetas, dois dissômicos e dois nulissômicos para o par envolvido na não-disjunção. Se fecundados por um gâmeta normal, irá dar origem a um zigoto trissômico ou monossômico. Na figura B está representada a não-disjunção na meiose II onde os dois cromossomas homólogos segregam para polos opostos da célula em anáfase I, no entanto, aquando da anáfase II não ocorre a separação dos cromatídeos irmãos de um dos homólogos. Neste caso, são formados quatro gâmetas, dois contendo o número normal de cromossomas, um nulissômico para aquele par e outro dissômico. Se fecundados por um gâmeta normal, poderá originar um zigoto normal, trissômico ou monossômico para aquele par de cromossomas. Adaptado de Wang, 2013a

2.1.3.2 ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS ESTRUTURAIS

As alterações cromossômicas estruturais resultam de quebras, recombinação e trocas de material genético entre cromossomas e subsequente reconstituição, levando ao aparecimento de um cromossoma alterado (Thompson e Thompson, 2015). Estas alterações podem surgir de forma espontânea ou provocadas por agentes mutagénicos. Caso ocorram na linha germinativa, podem ser transmitidas à geração seguinte (Malheiro e Porto, 2012). Deste modo, um portador de uma alteração cromossômica pode ter descendentes com manifestações fenotípicas graves devido à existência de uma dosagem génica diferente, quer por defeito ou por excesso. A existência de quebras cromossômicas é um facto subjacente às alterações cromossômicas estruturais e estas podem ocorrer em qualquer região do cromossoma. A base dos mecanismos de formação das alterações estruturais não só está relacionada com um possível *crossing-over* anormal durante a meiose, potenciado pela presença de *low-copy repeats* (LCRs) que podem promover um incorreto emparelhamento dos cromossomas, mas também com o aparecimento de quebras espontâneas na cadeia de DNA que podem ser posteriormente reparadas incorretamente por diferentes mecanismos alterando a estrutura do cromossoma (Kaiser-Rogers e Rao, 2013).

As alterações cromossômicas estruturais (Figura 3) são menos comuns que as numéricas e tal como as alterações cromossômicas numéricas estas podem estar em todas as células do indivíduo ou em mosaico. Estas alterações podem ser divididas em alterações estruturais equilibradas ou desequilibradas. O primeiro grupo inclui as inversões, inserções e translocações, já o segundo contém as deleções, duplicações, isocromossomas, cromossomas em anel e cromossomas marcadores. As alterações cromossômicas estruturais equilibradas são caracterizadas pela ausência de perda ou ganho de material cromossômico, enquanto nas alterações desequilibradas existe a perda ou ganho desse material (Thompson e Thompson, 2015).

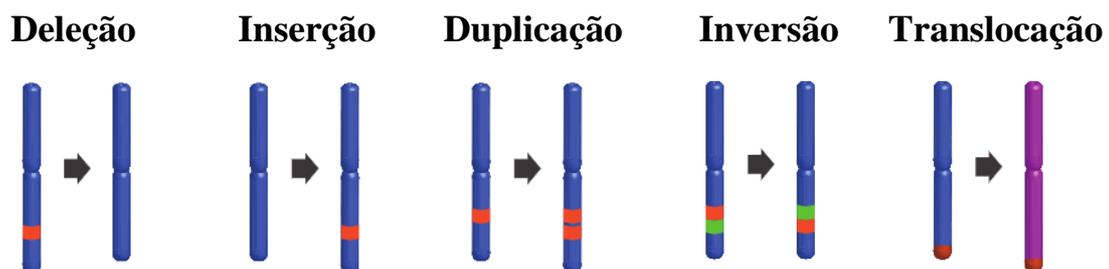


Figura 3 – Exemplos das alterações cromossômicas estruturais mais comuns. Adaptado de Giani et al., 2019

Tabela I – Vantagens e limitações das diferentes técnicas aplicadas no laboratório.

Área	Técnica	Vantagens	Limitações
Citogenética convencional e molecular	Cariótipo	<ul style="list-style-type: none"> • Na grande maioria deteta alterações cromossômicas numéricas, estruturais e situações de mosaico; • Boa relação custo-benefício; 	<ul style="list-style-type: none"> • Requer cultura de células; • Limite de resolução (só deteta alterações a partir de 5-10Mb); • Muito dependente da experiência do técnico; • Tempo de resposta mais demorado em comparação com as técnicas moleculares.
	FISH	<ul style="list-style-type: none"> • É uma técnica com elevada especificidade e sensibilidade e de rápida execução; • Técnica versátil, podendo ser aplicada em cromossomas em metafase, núcleos interfásicos e até tecidos frescos ou congelados; • Deteta mosaicos, alterações cromossômicas numéricas e estruturais; • Importante na caracterização de cromossomas marcadores. 	<ul style="list-style-type: none"> • A técnica de FISH é específica para a região testada, não sendo possível a detecção de situações de mosaico e rearranjos submicroscópicos que envolvam outros cromossomas ou outras regiões do mesmo cromossoma não abrangidas pela sonda; • Técnica dirigida; • Custo elevado; • Análise demorada.
Genética Molecular	aCGH	<ul style="list-style-type: none"> • Não necessita de células vivas; • Permite a identificação dos genes envolvidos nas alterações; • Analisa o complemento genético em grande quantidade; • Permite detetar alterações no nº de cópias (CNVs) 	<ul style="list-style-type: none"> • Não deteta rearranjos que não envolvam o nº de cópias (alterações cromossômicas equilibradas, mosaicismo de baixa expressão; dissomia uniparental); • Um <i>array</i> de elevada densidade pode detetar CNVs sem impacto clínico e implica uma interpretação difícil; • Técnica dispendiosa.
	MLPA	<ul style="list-style-type: none"> • Necessita de uma pequena quantidade de DNA que pode estar íntegro ou degradado; • Não necessita de cultura celular; • Técnica dirigida que permite uma análise rápida e o processamento de um grande nº de amostras e alvos moleculares em simultâneo; • Deteta alterações no nº de cópias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não deteta alterações de ploidia, mosaicismo de baixo grau e rearranjos equilibrados; • É direcionada; • É necessário ter em conta a possibilidade de existência de mutações pontuais perto do local de ligação das sondas afetando a eficiência e levando a falsos positivos.
	QF-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de execução rápida, permitindo a emissão de resultados em 24h; • Permite avaliar ploidia, sendo frequentemente utilizada para a detecção das aneuploidias mais comuns; • Não necessita de cultura celular; • Permite a detecção de contaminação materna. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baseia-se na amplificação de microssatélites (STRs) e por este motivo não permite avaliar outras regiões do genoma. Além disso é dirigida apenas para STRs dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y; • Não deteta mosaicismo de baixa expressão. • Nas aneuploidias, não dispensa a análise do cariógrama pela citogenética convencional para caracterizar a alteração e determinar o risco de recorrência.

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*; **aCGH** - *Array Comparative Genomic Hybridization*; **CNV** – *copy number variation*; **MLPA** - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; **QF-PCR** – *Quantitative fluorescent PCR*; **STRs** – *short tandem repeats*.

2.2 DIAGNÓSTICO PRÉ E PÓS-NATAL

O diagnóstico pré-natal de alterações cromossômicas é realizado de forma rotineira desde o início dos anos 70 e consiste em aplicar um conjunto de testes de modo a avaliar o estado de saúde do feto, nomeadamente se possui alguma doença genética resultante de uma alteração cromossômica (Gardner e Amor, 2018). Nem todas as grávidas têm acesso ao diagnóstico pré-natal, sendo necessário existirem indicações específicas que apontem um risco superior para determinada anomalia genética (Carlson e Vora, 2017). As indicações clínicas para diagnóstico pré-natal estão descritas nas *guidelines* internacionais e incluem:

- Idade materna avançada (≥ 35 anos);
- Anomalias ecográficas no feto, sinais ecográficos ou rastreio bioquímico positivo indicando um risco elevado para alterações cromossômicas;
- Progenitores portadores de alguma alteração cromossômica, mosaicismos ou aneuploidia dos cromossomas sexuais;
- Feto anterior com alterações cromossômicas;
- Infecção por toxoplasmose ou citomegalovírus.

Estes fatores são motivos para se proceder a uma análise do genoma do feto, quer através da citogenética ou da genética molecular.

O diagnóstico pré-natal difere do rastreio pré-natal. Um rastreio, por si só, consiste na aplicação de testes simples numa população aparentemente saudável com o objetivo de identificar indivíduos assintomáticos (Spix e Blettner, 2012). Assim sendo, o rastreio pré-natal consiste num conjunto de exames (avaliação ecográfica e quantificação de marcadores bioquímicos ou moleculares) que permitem identificar um feto com risco elevado de alterações cromossômicas ou anomalias congénitas. Este tipo de rastreio está disponível a todos os casais com uma gravidez em curso. Quando um rastreio é positivo, então indica um risco elevado para as situações mencionadas anteriormente, logo é oferecido diagnóstico pré-natal (Carlson e Vora, 2017). Por outro lado, um diagnóstico permite detetar a presença de uma anomalia no feto e a sua causa com um maior grau de certeza.

O rastreio pré-natal pode ser molecular ou não molecular. O teste pré-natal não invasivo (NIPT) corresponde a um teste de rastreio molecular com elevada sensibilidade e especificidade. Este tipo de teste utiliza o DNA fetal livre (cfDNA) para, após

sequenciação, averiguar a presença de alguma aneuploidia dos cromossomas 13, 18 e 21. Esta técnica também consegue fornecer informações relativamente aos cromossomas sexuais. Por outro lado, o rastreio pré-natal não molecular compreende diferentes fases, como o rastreio combinado do primeiro trimestre, o rastreio do segundo trimestre e o integrado. Nestas três fases são feitas avaliações ecográficas e a quantificação de determinadas proteínas, em momentos específicos ao longo de toda a gravidez (Norwitz e Levy, 2013; Carlson e Vora, 2017).

Para ser realizado um diagnóstico é necessário recorrer a técnicas invasivas. A biópsia das vilosidades coriônicas (CVS – do inglês *chorionic villus sampling*) é normalmente realizada entre as dez e as doze semanas, logo permite obter resultados numa fase precoce da gravidez, com um risco de perda fetal inferior a 1% (Gil et al., 2020). Além disso, a elevada percentagem de mosaicismo confinado à placenta (1% a 2%) pode falsear o resultado do diagnóstico, ou seja, a alteração encontrada a partir da biópsia do trofoblasto pode não refletir a constituição cromossómica do feto (Boyle e Griffin, 2001; Carlson e Vora, 2017). O facto de ser mais suscetível à contaminação materna também constitui uma desvantagem deste procedimento.

A amniocentese é outro método que permite obter células de origem fetal para a realização de uma análise citogenética ou molecular. Nesta técnica recorre-se à cultura de amniócitos, um grupo heterogéneo de células provenientes da pele, do trato gastrointestinal, do sistema urogenital e respiratório do feto (Boyle e Griffin, 2001). O número de células viáveis presentes no líquido amniótico é inversamente proporcional ao tempo de gestação e por este motivo a realização de uma amniocentese numa fase mais tardia da gravidez pode apresentar uma maior dificuldade na cultura celular. A amniocentese apresenta um risco de perda fetal de aproximadamente 0,2% e deve ser realizada preferencialmente entre as quinze e dezassete semanas, uma vez que a extração de líquido amniótico numa fase precoce da gravidez pode levar a malformações fetais (Carlson e Vora, 2017).

Uma outra técnica utilizada com menor frequência no diagnóstico pré-natal é a cordocentese. Esta técnica invasiva pode ser utilizada para diagnóstico de algumas patologias, através da obtenção de sangue fetal a partir do cordão umbilical. Normalmente realiza-se quando há necessidade de confirmar algum resultado de líquido amniótico ou quando é detetada alguma alteração na ecografia das 22 semanas. Este método invasivo apresenta um risco de perda fetal de 1% a 5% (Too et al. 2018). A grande vantagem da

cordocentese está relacionada com a prontidão dos resultados, pois é possível estabelecer uma cultura de linfócitos de curta duração para análise cromossómica (Proença, 2014).

Todos estes procedimentos invasivos devem ser guiados ecograficamente para reduzir o risco de perda fetal ou outras complicações.

As técnicas invasivas mencionadas permitem a obtenção de células provenientes do feto que são posteriormente cultivadas em caixas de cultura e mantidas de forma a permitir a obtenção de um número razoável de células para proceder à análise cromossómica, através da construção do cariógrama. O mesmo tipo de amostras biológicas pode ser utilizado para diagnóstico pré-natal por métodos da genética molecular. Neste caso, fibroblastos e vilosidades coriónicas não necessitam de cultura celular. Inicialmente, os tecidos são seccionados e colocados num tubo contendo tampão de lise, para se dar início à extração do DNA. Relativamente aos amniócitos, se análise requisitada for análise por QF-PCR, pode-se extrair o DNA diretamente, não sendo necessário esperar pela cultura celular. O mesmo se aplica às análises por aCGH caso o líquido amniótico tenha sido colhido após as 18 semanas. Caso contrário, será necessário esperar pela cultura celular.

No diagnóstico pós-natal o principal objetivo é a deteção de uma alteração cromossómica subjacente a uma doença genética que leva à redução da fertilidade, défice cognitivo, anomalias congénitas, entre outros. Em alguns destes casos, o teste de primeira linha é o aCGH, uma vez que permite analisar o genoma de uma forma mais detalhada, apresentado uma elevada resolução (Silva et al., 2019). As amostras biológicas mais frequentemente utilizadas no diagnóstico pós-natal são o sangue periférico e pele. Estas amostras, para além de testes moleculares como o aCGH, MLPA e MS-MLPA, podem ser utilizadas para estudo do cariótipo constitucional. A citogenética convencional pode ser útil para elucidar o diagnóstico, uma vez que é possível detetar situações de mosaicismo, alterações estruturais equilibradas e desequilibradas, como também alterações numéricas. Para estudos mais pormenorizados em determinadas regiões específicas, ainda existe a possibilidade de realização da FISH, havendo um incremento do poder de resolução da citogenética.

Existem indicações clínicas para se fazer um estudo do cariótipo constitucional que incluem:

- Azoospermia ou oligospermia grave;
- Amenorreia primária ou secundária;
- Menopausa precoce;

- Suspeita de síndrome de deleção ou duplicação;
- História familiar indicativa de uma patologia com causa cromossômica;
- Feto com malformações ou nado morto de causa desconhecida;
- Casais com infertilidade, três ou mais abortos, anomalia cromossômica desequilibrada ou anomalia cromossômica detetada no diagnóstico pré-natal.

Em caso de ser necessário estudo por aCGH, as indicações clínicas são:

- Atraso de desenvolvimento psicomotor;
- Perturbação do desenvolvimento intelectual;
- Perturbação do espectro autista;
- Anomalias congénitas múltiplas;
- Suspeita de síndrome de microdeleção ou microduplicação;
- Dismorfismos.

A versatilidade da técnica de FISH permite a hibridização de sondas em núcleos interfásicos ou células em metafase. Em núcleos interfásicos é possível avaliar alterações numéricas e alterações cromossômicas estruturais, como deleções, translocações, duplicações, amplificação de genes e situações de mosaicismo. Por outro lado, o FISH em metafase permite identificar várias alterações cromossômicas, como cromossomas marcadores, situações de mosaico, entre outros. Deste modo, as indicações clínicas para o diagnóstico por FISH incluem a suspeita clínica de síndrome de microdeleção, presença de um cromossoma marcador, esclarecer determinados rearranjos cromossômicos e situações de mosaicismo (Silva et al., 2019).

2.3 METODOLOGIAS

2.3.1 FASE PRÉ-ANALÍTICA

A prática laboratorial pode ser dividida em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. Todas são importantes para garantir a qualidade de um laboratório e cada uma tem passos específicos onde se deve averiguar cuidadosamente cada etapa. A fase pré-analítica corresponde a um conjunto de procedimentos que geralmente não são controlados pelo laboratório. Basicamente esta é a fase que antecede a análise propriamente dita e é aquela mais propensa a erros, cerca de 50%-70% dos erros ocorrem nesta fase (Carraro e Plebani, 2007; Lippi et al., 2015). Por este motivo, é necessário que a comunicação entre os diferentes organismos envolvidos seja a melhor possível para

minimizar os possíveis erros, que podem interferir diretamente ou indiretamente com a qualidade dos resultados obtidos. Podemos então definir um erro laboratorial como qualquer falha que o ocorra em alguma etapa do ciclo laboratorial, ou seja, desde a fase pré-analítica até à pós-analítica (Carraro e Plebani, 2007).

As etapas da fase pré-analítica vão desde o pedido do teste, incluindo a colheita e transporte da amostra até à sua receção e preparação para as etapas seguintes. Os erros mais comuns durante esta fase são: requisição inadequada, transporte inadequado, identificação errada, interpretação errada da requisição e erros no tubo da colheita (Carraro e Plebani, 2007; Lippi et al., 2015). Deste modo, é necessário monitorizar cada etapa para identificar possíveis não conformidades e atuar de uma forma proativa, metódica, pragmática e célere para encontrar soluções e evitar a repetição desse erro. Assim, deve-se ter em mente uma ideia de melhoria constante para haver um aumento qualidade dos resultados, tornando-os mais confiáveis.

O LCG-FMUC estabeleceu os requisitos de colheita e envio de amostras de modo a uniformizar esta etapa e conseqüentemente levar à diminuição de potenciais erros. As amostras que chegam a um laboratório de diagnóstico citogenético e molecular podem ser das mais variadas, incluindo líquido amniótico, vilosidades coriônicas, sangue fetal do cordão umbilical, sangue periférico de adultos, recém-nascidos ou crianças, amostras de pele, placenta, biópsias de pele, lâminas para estudo citogenético, suspensão de células fixadas e DNA. Todas elas necessitam de ser enviadas com uma quantidade adequada à análise e essa quantidade depende do estudo que se pretende fazer. Por este motivo, foi importante criar os requisitos de colheita e envio para que todos os centros que pretendam enviar amostras saibam como devem proceder. Em amostras de líquido amniótico, devem ser colhidos 15-20mL em duas caixas de cultura estéreis. Em amostras de vilosidades coriônicas e amostras de tecidos, estas devem ser colocadas em tubos estéreis, com meio de cultura fornecido pelo laboratório. Para amostras de sangue a quantidade varia de acordo com a faixa etária do doente, por isso esse valor pode variar entre os 2mL e os 10mL para estudos citogenéticos e entre 2mL e 6mL para estudos moleculares.

Todas as amostras de sangue para estudos citogenéticos devem ser colhidas num tubo esterilizado com heparina de sódio ou lítio. Para estudos moleculares devem ser colhidas em tubos semelhantes, mas com EDTA. Especificamente, as amostras de vilosidades coriônicas e sangue do cordão devem vir acompanhadas de sangue materno em EDTA para se efetuar o despiste de contaminação materna. O EDTA e a heparina são anticoagulantes utilizados na colheita de amostras de sangue. A utilização de heparina

para estudos moleculares deve ser evitada, pois este composto liga-se ao DNA e inibe a Taq polimerase utilizada nas reações de PCR. O EDTA é vantajoso para estudos moleculares, pois inibe a ação de DNases (Kotikalapudi e Patel, 2015).

No caso de lâminas para estudo citogenético e de suspensões celulares devem ser enviadas três lâminas por cultura e um tubo por cultura, respectivamente. Em relação às amostras de DNA, estas devem vir em tubos “safe lock”, com uma concentração de 40ng/μl e um volume mínimo que pode ser de 50μL ou 100μL dependendo do teste pedido.

Após chegada das amostras ao laboratório é atribuído um código e feito o registo de toda a informação relevante. Todas as amostras devem vir acompanhadas da respetiva requisição. Estas devem conter a informação clínica relevante para a análise, bem como outros dados essenciais para o laboratório.

Em seguida, as amostras seguem para o laboratório onde se iniciam os procedimentos analíticos.

Durante o estágio, os procedimentos técnicos foram acompanhados desde a receção das amostras e respetivo registo, até à análise, interpretação de resultados e elaboração do relatório.

2.3.2 FASE ANALÍTICA

A – CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

A1 – CULTURA DE CÉLULAS

A cultura de células consiste numa técnica laboratorial que tem como objetivo permitir o crescimento de células em condições fisiológicas adequadas, mimetizando o microambiente extracelular e intracelular presente nas condições naturais. É uma ferramenta extremamente versátil e útil tanto para a investigação como para o diagnóstico (Segeritz e Vallier, 2017).

O sucesso de uma cultura depende de vários fatores, nomeadamente do pH, temperatura, humidade, ausência de contaminantes, confluência celular e o cumprimento rigoroso de todas as etapas protocoladas. Numa cultura, as células necessitam de um meio que seja constituído por determinados componentes essenciais, permitindo o seu crescimento. Este meio necessita de ser adequado ao tipo de células e favorável ao seu crescimento. Um meio inadequado pode levar ao insucesso da cultura. O meio basal, comum a quase todas as culturas celulares, é constituído por aminoácidos, vitaminas,

minerais e fatores de crescimento, em condições ótimas de pH e de pressão osmótica (Boyle e Griffin, 2001). Os meios de cultura podem ainda ser suplementados com L-glutamina e soro bovino fetal. A glutamina é um aminoácido essencial para o crescimento celular, já o soro bovino fetal fornece fatores de crescimento e hormonas, uma vez que atua como transportador de lípidos, enzimas e micronutrientes (Boyle e Griffin, 2001; Segeritz e Vallier, 2017). O soro bovino fetal, normalmente, corresponde a 10%-30% do meio de cultura (Keagle e Gersen, 2013). O fenol *red*, também está presente nos meios de cultura e é utilizado como indicador de pH. Caso haja alterações no pH do meio de cultura, também haverá alteração da sua cor. Um meio com uma cor amarela é indicativo de um pH ácido. Por outro lado, se o meio apresentar uma cor violeta então terá um pH básico (Sato e Kan 1998). A escolha do meio adequado para análise está dependente do tipo de amostras disponíveis. Além disso, o tipo de cultura pode ser variável. Existem células que necessitam de um local para aderir, logo são cultivadas em caixas de cultura ou até caixas de petri. Por outro lado, culturas de suspensão podem ser estabelecidas em tubos.

Os meios de cultura, por serem enriquecidos com nutrientes e outros componentes essenciais ao crescimento celular, também podem potenciar o crescimento de bactérias ou fungos. Estes microrganismos, além de poderem ser tóxicos para as células devido à síntese de compostos alcalinos ou ácidos, também se aproveitam dos nutrientes presentes no meio de cultura para proliferar, competindo pela sua disponibilidade e levando à inviabilidade da cultura (Boyle e Griffin, 2001). Na presença de uma contaminação é necessário que o operador seja treinado para reconhecer os sinais iniciais e conseguir eliminar o agente contaminante.

As bactérias possuem a capacidade de se multiplicar de forma bastante rápida. Por um lado, isto torna a sua deteção mais fácil, mas por outro permite uma rápida proliferação por toda a cultura celular. Na presença de uma contaminação por bactérias o meio de cultura irá possuir um aspeto turvo. Além disso, os produtos sintetizados pelas vias metabólicas das bactérias podem alterar o pH do meio, modificando a sua cor de vermelho para amarelo. (Segeritz e Vallier, 2017). Existem estirpes bacterianas que são mais facilmente detetáveis do que outras. Por exemplo, uma contaminação com *Escherichia coli* é facilmente detetável devido ao seu tamanho e mobilidade. Por outro lado, os *Mycoplasmas*, que apresentarem um tamanho inferior e não apresentam mobilidade, são mais difíceis de detetar, portanto continuam a proliferar. Geralmente, a presença destas bactérias apenas se torna notória quando há um decréscimo da qualidade

da cultura, afetando o seu crescimento e inibindo o seu metabolismo (Segeritz e Vallier, 2017). Os *Mycoplasmas* também podem induzir a formação de alterações cromossômicas (Phelan, 2007). Todos os procedimentos de assepsia devem ser cumpridos rigorosamente, no entanto, as principais fontes de *Mycoplasmas* são o soro bovino fetal utilizado na preparação dos meios, o operador e até podem estar presentes na amostra originalmente colhida (Sato e Kan 1998; Phelan, 2007). Além das bactérias, as leveduras e o bolor são os fungos que mais comumente contaminam as culturas. No caso das leveduras, estas são facilmente detetáveis devido ao seu tamanho, podendo apresentar um crescimento até 4 μ M, e odor característico (Segeritz e Vallier, 2017). Devido à produção de esporos é crucial que se identifiquem as culturas contaminadas de modo a conter o crescimento de fungos (Coté, 1999).

Existem medidas essenciais para prevenir estas contaminações e permitir o sucesso da cultura. As câmaras de fluxo laminar vertical devem ser instaladas em locais com pouco tráfego de pessoas e livres de correntes de ar. É obrigatória a utilização de luvas, bem como proceder à desinfeção de todo o local de trabalho e também das mãos do operador (Segeritz e Vallier, 2017). As câmaras de fluxo laminar vertical permitem que haja um ambiente seguro para o operador e para as amostras. A eficácia na prevenção de contaminações está diretamente relacionada com existência de filtros HEPA e de sistemas de circulação de ar. Estes filtros funcionam como uma barreira, filtrando microrganismos que possam contaminar a cultura. A existência de uma coluna de ar na região frontal da câmara protege o operador e o ambiente de potenciais riscos. A superfície das câmaras de fluxo deve ser desinfetada regularmente durante a sua utilização, e em caso de derrame, deve-se proceder à desinfeção imediata da superfície (Coté, 1998).

Ainda que os meios de cultura sejam formulados contendo antibióticos de modo a prevenir o crescimento de bactérias, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados, deve-se utilizar materiais e reagentes estéreis e trabalhar num ambiente o mais asséptico possível. Caso exista alguma cultura celular que esteja contaminada, esta deve ser retirada da sala de cultura. É extremamente importante descobrir a fonte da contaminação de uma forma célere e desinfetar as superfícies que estiveram em contacto com essa cultura (Segeritz e Vallier, 2017).

A manutenção das culturas celulares é importante para obtermos uma concentração celular desejável para análise e para isso permanecem no interior de uma incubadora, permitindo ter condições ótimas de temperatura, humidade e CO₂. O índice mitótico e a viabilidade celular estão dependentes do controlo destas variáveis. A temperatura mais

adequada ao crescimento de células humanas situa-se entre os 36-37°C. Deve haver ainda 97% de humidade e 5% de CO₂. Este nível CO₂ permite que seja mantido um nível ótimo de pH (7,2-7,4) (Segeritz e Vallier, 2017). Além disso, deve existir um sistema aberto permitindo as trocas gasosas entre a cultura celular e o ambiente interno da incubadora. A existência deste sistema torna as culturas mais suscetíveis à contaminação, logo as medidas de assepsia devem ser ainda mais reforçadas. Porém, estes sistemas acabam por ser mais vantajosos, pois permitem que a cultura liberte produtos do metabolismo que podem ser tóxicos para as células (Keagle and Gersen, 2013). Durante a manutenção da cultura devem existir mudanças regulares do meio de cultura para garantir um ambiente favorável ao crescimento das células. Quando for atingida uma confluência elevada, pode ser realizada uma subcultura, dependendo do objetivo do estudo. Para se efetuar uma subcultura, é necessário dissociar as células da caixa de cultura de forma mecânica ou enzimática, sendo posteriormente transferidas para outra caixa (Segeritz e Vallier, 2017).

No diagnóstico pré e pós-natal a cultura de células é essencial para a análise do cariótipo, por isso o tipo de cultura para obtenção de boas metafases depende da amostra que é enviada. Estas possuem especificações individuais e passos laboratoriais adequados a cada tipo de cultura.

Cada amostra utilizada na cultura de células deve ser cultivada em duas linhas celulares distintas, com meios de cultura diferentes para minimizar os efeitos prejudiciais de alguma falha dos reagentes ou avaria de determinado equipamento. Estas culturas devem, preferencialmente, ser manipuladas por operadores distintos e mantidas em incubadoras diferentes. Todos os procedimentos de manipulação da cultura vão depender da requisição médica, do tipo de teste pedido e do tipo de amostra que existe para análise.

A1.1 – CULTURA DE AMNIÓCITOS

Na sala de cultura é realizada uma avaliação macroscópica do líquido amniótico, onde se avaliam características como a cor (normalmente amarelo-pálido), a presença de vestígios de sangue e a quantidade aproximada. Em seguida, estabelece-se a cultura adicionando meio a cada caixa de cultura. Caso a requisição indique a necessidade da realização de algum teste molecular, nomeadamente QF-PCR, então antes de se realizar a cultura, transfere-se cerca de 2ml da amostra para um microtubo.

A avaliação do crescimento e mudança de meio é realizada, aproximadamente, após seis dias. Quando uma caixa de cultura possui uma elevada confluência e/ou existe a necessidade de se realizar dois ou mais procedimentos distintos (ex: manipulação e

criopreservação) ou quando se observa que na caixa de cultura existem células muito envelhecidas - muito comum em amostras com um tempo de gestação elevado – pode-se efetuar uma subcultura, para permitir o crescimento das células de interesse. Para se efetuar uma subcultura é necessário utilizar a tripsina que permite a dissociação das células da caixa de cultura. Após o tempo de atuação da tripsina, a 37°C e avaliação ao microscópio, as células são transferidas para outra caixa de cultura onde é adicionado o respectivo meio semelhante ao da cultura primária, que contém soro fetal, inibindo a ação da tripsina. Se não existir necessidade de realizar subcultura, pode realizar-se a tripsinização da caixa de cultura para desagregar as células e permitir a sua distribuição por toda a caixa de cultura e em seguida, adiciona-se o meio de cultura. Após a tripsinização acompanha-se o crescimento celular e, quando a cultura estiver confluenta, inicia-se a manipulação.

Sempre que houver necessidade de cultivar as células para posterior extração de DNA (para estudos de aCGH, por exemplo), é necessário que a cultura tenha 100% de confluência. Inicialmente o meio é descartado e deve ser efetuada uma lavagem da cultura com PBS. Depois adicionam-se cerca de 2ml de PBS nas caixas e com o auxílio de um raspador efetua-se a dissociação mecânica das células. Em seguida, transfere-se a suspensão celular para um tubo previamente identificado.

A1.2 – CULTURA DE VILOSIDADES CORIÓNICAS

Na sala de cultura é feita a separação à lupa do material materno e do material fetal (Figura 4). Inicialmente, retiram-se as vilosidades coriônicas para uma placa de petri onde são realizadas lavagens com PBS, só depois é feita a separação à lupa. Para as análises moleculares são colhidos alguns fragmentos para um tubo com tampão de lise.

Seguidamente, faz-se a digestão enzimática das vilosidades com a adição de tripsina, durante uma hora, e colagenase, durante trinta minutos. A tripsina é uma enzima proteolítica que possui a função de quebrar as ligações e a colagenase permite desagregar as células. Após centrifugar e ressuspender as células em meio de cultura, divide-se a suspensão celular pelas caixas de cultura da linha A e B. Após cerca de três dias, deve-se avaliar o crescimento ao microscópio invertido (Figura 5), bem como o aspeto do meio de cultura. Caso seja necessário deve proceder-se à mudança de meio. Esta avaliação deve ser feita todos os dias até que a cultura apresente a confluência ideal para a manipulação.

Nos fetos femininos deve ser feito despiste de contaminação materna recorrendo à genética molecular, para garantir que o material em análise é de origem fetal. Neste caso,

em cada manipulação deve ser separado cerca de 2ml da suspensão celular para um microtubo.

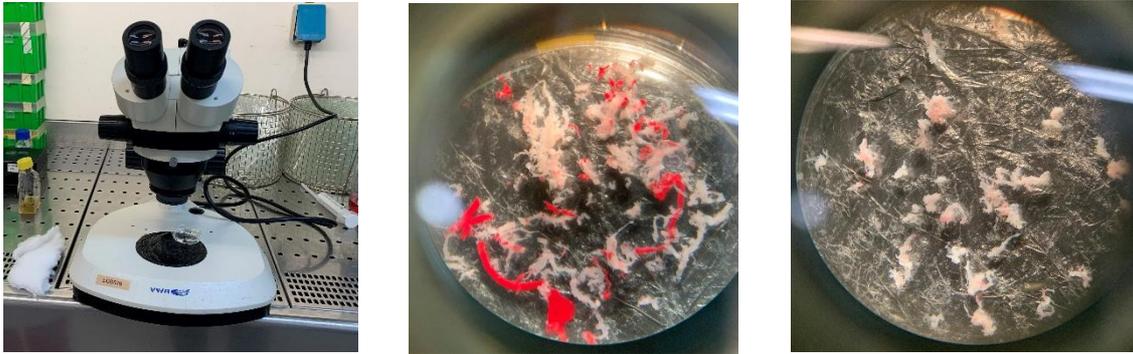


Figura 4 – Separação do material materno (vermelho), do material fetal (rosa) à lupa.

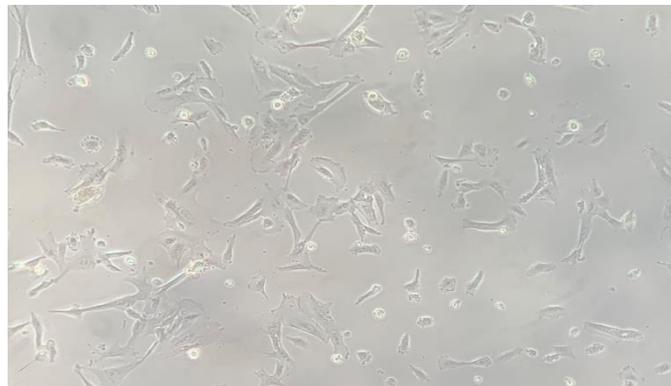


Figura 5 – Avaliação do crescimento celular no microscópio invertido.

A1.3 – CULTURA DE FIBROBLASTOS

Na cultura de fibroblastos o fragmento inicial é separado em fragmentos mais pequenos, sendo dispostos pela caixa de cultura e imersos numa gota de soro fetal. Este suplemento permite a adesão à superfície da caixa de cultura. Em seguida, adiciona-se meio de cultura e coloca-se a caixa na incubadora sem que o meio esteja em contacto com os fragmentos, para promover a adesão à caixa de cultura. Após algumas horas, inverte-se a caixa, permitindo o contacto dos fragmentos com o meio de cultura. Ao longo dos dias avalia-se o crescimento celular e se necessário efetua-se a mudança de meio. Quando a caixa atingir um nível ótimo de confluência inicia-se a manipulação.

A1.4 – CULTURA DE LINFÓCITOS

Após a chegada de uma amostra de sangue para análise do cariótipo, estabelecem-se, no mínimo, duas culturas de 48h ou 72h, por cada amostra. Este tipo de cultura utiliza um meio específico denominado de PB-MAX. Para se estabelecer a cultura adicionam-se cerca de 10 gotas de sangue homogeneizado num tubo de 10ml com PB-MAX.

Antes do início da manipulação é necessário fazer a sincronização celular para, após o bloqueio provocado por um inibidor mitótico, potenciar o número de células em metafase. A sincronização inicia-se com a adição do metotrexato (MTX), durante dezassete horas. Este composto bloqueia o ciclo celular na fase S, devido à inibição da síntese de timidina interferindo na replicação do DNA. O MTX compete com a enzima reductase, impedindo a conversão do dihidrofolato em tetrahidrofolato que é essencial para a síntese de substratos envolvidos na síntese de DNA (Skubisz e Tong, 2012). A próxima etapa consiste na adição da timidina que permite a progressão do ciclo celular. Apenas quatro horas depois é adicionada a colcemida, para efetuar o bloqueio do ciclo em pró-metáfase, seguindo-se a fase da manipulação. Quando se faz a lavagem do MTX para depois adicionar a timidina, adiciona-se às caixas um meio diferente do inicial. O meio base denomina-se de RPMI ao qual é adicionado 10% de FBS e 1% de penicilina-estreptomicina.

A2 – MANIPULAÇÃO E ESPALHAMENTO

O processo de manipulação é semelhante para todas as amostras biológicas referidas anteriormente. No entanto, antes da manipulação pode ser realizada a adição de CRA (*chromosome resolution additive*) nas culturas de vilosidades coriônicas. Este composto permite melhorar a resolução dos cromossomas, facilitando a sua identificação aquando da organização do cariograma. Na figura 6, é possível observar o *workflow* do processo de obtenção de cromossomas em metafase para o estudo citogenético.

Após a adição do CRA nas culturas específicas, inicia-se a manipulação com a utilização da colcemida para induzir o bloqueio celular. A colcemida é um inibidor mitótico que se liga à tubulina e impede a polimerização dos microtúbulos do fuso acromático, logo não ocorre a separação dos cromatídios-irmãos e os cromossomas ficam bloqueados em metafase (Keagle e Gerson, 2013). O objetivo da utilização da colcemida é induzir o bloqueio em pró-metáfase de modo a obter cromossomas distendidos e com um bom limite de resolução. O tempo de atuação da colcemida é crucial para a obtenção

de bons resultados. Se as células estiverem expostas a este composto durante demasiado tempo, os cromossomas vão apresentar um aspeto mais condensado. Em contrapartida, um tempo reduzido irá levar a que os cromossomas fiquem demasiado compridos, comprometendo a análise, uma vez que irão existir demasiadas sobreposições (Howe et al., 2014). Para além do tamanho dos cromossomas, a colcemida também afeta a índice mitótico, ou seja, uma maior exposição a este composto vai permitir obter uma maior quantidade de células em metafase, no entanto, os cromossomas vão estar mais condensados. É necessário estabelecer um tempo adequado para se obter um bom índice mitótico e cromossomas com uma boa resolução (Keagle e Gerson, 2013).

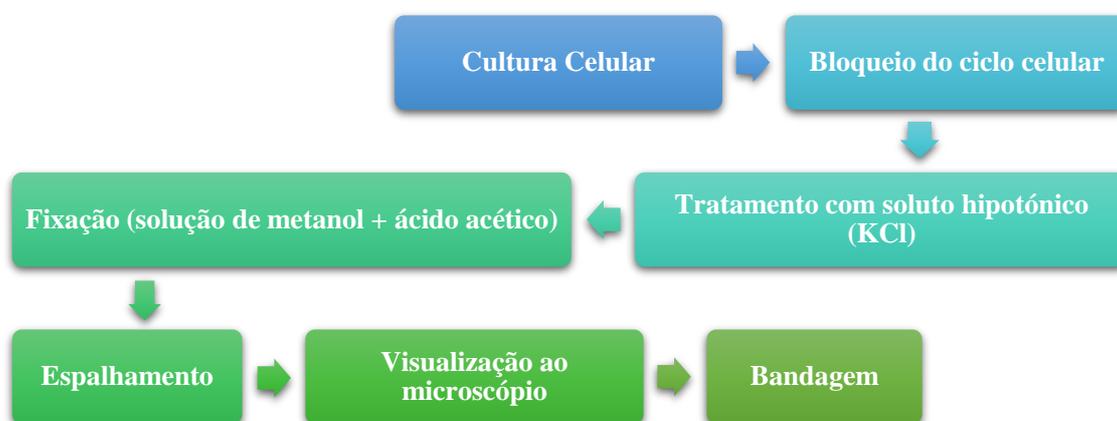


Figura 6 – *Workflow* do processo de obtenção de cromossomas em metafase para o estudo citogenético.

O tempo de colcemida nas amostras de sangue difere do tempo aplicado nas amostras de líquido amniótico ou vilosidades coriônicas, isto porque, os linfócitos já sofreram uma fase de sincronização. Por outro lado, nas restantes amostras o tempo de exposição tem de ser superior para obtermos um maior número de células em metafase.

Após esta fase e seguidamente à centrifugação, é necessário retirar o sobrenadante e efetuar o tratamento com um soluto hipotónico, recorrendo à utilização de cloreto de potássio (KCl). Esta solução vai provocar o aumento da pressão osmótica, permitindo a entrada de água nas células. Por sua vez, estas ficam túrgidas garantindo uma maior dispersão dos cromossomas (Howe et al., 2014). O tempo de exposição ao KCl é crucial, uma exposição prolongada irá levar à lise celular, comprometendo a qualidade do espalhamento. Por outro lado, se a exposição ao soluto hipotónico for baixa, o espalhamento terá uma fraca qualidade, pois os cromossomas não estarão dispersos havendo um grande número de sobreposições (Moore e Best, 2001a).

Tanto na fase de bloqueio como no tratamento hipotónico a incubação é realizada mediante um tempo otimizado numa incubadora a 37°C.

Seguidamente ao tratamento com o soluto hipotónico, realiza-se a fixação através de uma solução de metanol e ácido acético em proporções otimizadas e protocoladas, mediante o tipo de amostra biológica. O fixador tem como função a remoção da água e a preservação da estrutura e da morfologia dos cromossomas. Esta etapa permite tornar os cromossomas mais robustos para as fases subsequentes (Howe et al., 2014). Nas vilosidades coriônicas, amniócitos e fibroblastos, a proporção de metanol e ácido acético varia ao longo das fixações (6 ml de metanol:1 ml de ácido acético; 3:1; 1:1), enquanto nas amostras de sangue, as fixações utilizam sempre a mesma proporção (3:1). Para uma boa fixação do material celular, está recomendada a realização de três suspensões no fixador, espaçadas por centrifugações e seguidas da eliminação do sobrenadante (Moore e Best, 2001a). Após a fixação, as células devem ser armazenadas a 4°C. Nas amostras de vilosidades coriônicas e de líquido amniótico pode ser realizada uma pré-fixação com o objetivo de melhorar a morfologia dos cromossomas. Por outro lado, nas amostras de sangue, a primeira fixação deve ser realizada em agitação contínua, uma vez que o fixador também possui a função de promover a lise dos eritrócitos (Keagle e Gerson, 2013).

Após a realização da manipulação da cultura celular, uma das etapas mais cruciais é o espalhamento. Este procedimento vai definir a qualidade das metafases obtidas para análise, cujo objetivo principal é a obtenção de metafases individualizadas e os cromossomas com o mínimo de sobreposições. A qualidade do espalhamento está dependente de condições atmosféricas, tais como a temperatura e a humidade (Keagle e Gerson, 2013). Uma vez que o tempo de evaporação é crítico para a dispersão dos cromossomas, este procedimento deve ser realizado num espaço onde seja possível controlar estas variáveis ou numa câmara de espalhamento específica (Moore e Best, 2001a; Keagle e Gerson, 2013). No caso de existir uma humidade alta, os cromossomas vão ficar demasiado espalhados, havendo o risco de não se obterem metafases completas. Por outro lado, pouca humidade faz com que os cromossomas não fiquem tão dispersos e apresentem muitas sobreposições, o que dificulta a análise.

No final da fase de manipulação faz-se uma avaliação do espalhamento ao microscópio de contraste de fase. Quando existe uma elevada concentração celular deve-se adicionar fixador ao tubo. Por outro lado, se existir uma baixa concentração celular, deve-se centrifugar o tubo e concentrar a amostra.

Todas as lâminas devem ser identificadas com o tipo de material biológico, o código identificador da amostra, o dia da manipulação e do espalhamento. Deve ainda ser feita a numeração das lâminas de acordo com a qualidade do espalhamento. Assim, o acerto dos tempos de bandagem poderá ser feito nas lâminas cujo espalhamento não estava otimizado.

A3 – BANDAGEM

As técnicas de bandagem produzem uma série de bandas ao longo dos cromossomas permitindo a sua identificação e distinção. A identificação destes padrões permite avaliar a existência de alterações estruturais nos cromossomas, podendo levar à deteção dos pontos de quebra de determinada alteração cromossómica, contribuindo para o sucesso do diagnóstico (Schreck e Distéche, 1994). Os métodos de coloração dos cromossomas podem ser divididos em duas categorias: coloração de todo o cromossoma (bandagem de rotina – GTL; R; QFQ) e métodos diferenciais de estruturas específicas (bandagem CBG e AgNor).

A bandagem Q, G e R são exemplos de colorações da primeira categoria. A bandagem Q foi o primeiro tipo de coloração descoberto. Esta técnica recorria à utilização de mostarda de quinacrina que revelava diferentes intensidades de fluorescência ao longo dos cromossomas usando luz ultravioleta (Figura 7A). Este método foi posteriormente designado por QFQ pelo ISCN. Na base desta técnica estava que, regiões do genoma ricas em adeninas e timinas produziam uma fluorescência mais intensa devido à sua maior abundância. Por outro lado, as regiões ricas em citosinas e guaninas apresentavam uma fluorescência mais fraca (Moore e Best, 2001a).

O segundo método a ser descoberto foi a bandagem G (Figura 7B). Este tipo de bandagem apresenta-se de forma permanente e particular devido à ação da tripsina seguindo-se da coloração com Giemsa. Este método era inicialmente designado por GTG (Bandas G obtidas pela ação da Tripsina e coradas com Giemsa), no entanto, com o aparecimento de novos corantes, como o Leishman, pode apresentar outras designações (GTL). Este corante é semelhante ao Giemsa, mas apresenta ligeiras diferenças ao nível do contraste (Moore e Best, 2001a; Ribeiro, 2018).

O último método de coloração é denominado de bandagem R (Figura 7C). Neste método, o padrão de bandas obtido é aproximadamente o inverso do padrão apresentado pela bandagem G ou Q. A bandagem R obtém-se através da desnaturação dos cromossomas a elevadas temperaturas seguida da coloração com Giemsa ou laranja de

acridina. Teoricamente, a bandagem R marca as regiões claras ricas em genes, logo permite uma melhor visualização de rearranjos estruturais (Moore e Best, 2001a).

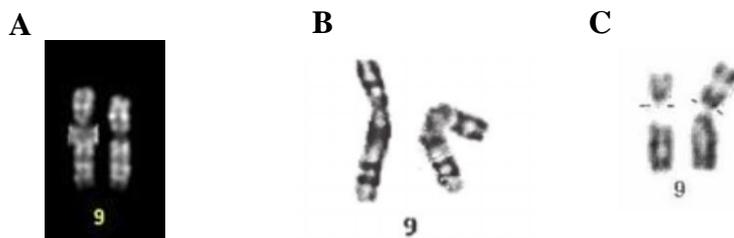


Figura 7 – Exemplo de bandagem Q (A), de bandagem G (B) e bandagem R do cromossoma 9 (C). Fonte: Bruno et al., 20 (A); Huang et al., 2010 (B); Kasakyan et al., 2009 (C).

Durante o estágio foram abordados ambos os tipos de coloração dos cromossomas, mais especificamente a bandagem GTL, CBG e AgNOR.

Relativamente à bandagem de rotina GTL, é necessário ajustar o tempo da lâmina em tripsina (coplin 1), essencial para a obtenção de uma alternância de bandas claras e bandas escuras. O tempo das lâminas em tripsina carece de otimização para se obter um padrão de bandas bem definindo. Caso o tempo em tripsina seja muito prolongado, a morfologia dos cromossomas vai ficar comprometida. Por outro lado, se o tempo for reduzido não será possível distinguir o padrão de bandas.

As lâminas são posteriormente transferidas de uma forma rápida e sequencial para os coplins 2-3 e permanecem alguns minutos no coplin 4. Por fim, faz-se as lavagens das lâminas para remover o excesso de corante fazendo uma passagem das lâminas pelos coplins 5 e 6. Todos os passos, à exceção do 4, são realizados no banho-maria a 37°C (Figura 8).



- Legenda:**
- 1 – Solução de Tripsina;
 - 2 - Solução de NaCl;
 - 3 – Tampão Gurr;
 - 4 – Solução de Leishman;
 - 5 – Tampão Gurr;
 - 6 – H₂O.

Figura 8 – Procedimento da bandagem GTL.

Após a secagem das lâminas, estas podem ser visualizadas ao microscópio ótico de campo brilhante (Figura 9). Nesta última etapa avalia-se a bandagem de modo a ajustar os tempos da permanência das lâminas na tripsina, através da visualização dos cromossomas individualizados, com poucas sobreposições, um tamanho adequado e um padrão de bandas distinguível. No final, obtém-se um padrão de bandas claras que alterna com bandas escuras e que permite a distinção de cada cromossoma. As bandas escuras (heterocromatina) são regiões não codificantes, enquanto as bandas claras (eucromatina) representam as regiões codificantes.

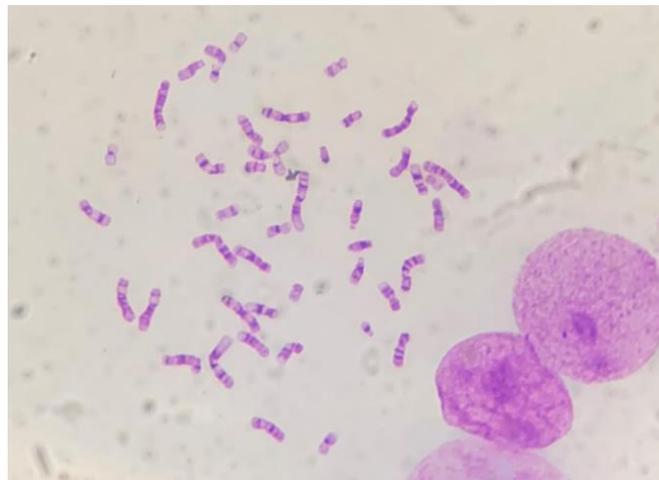
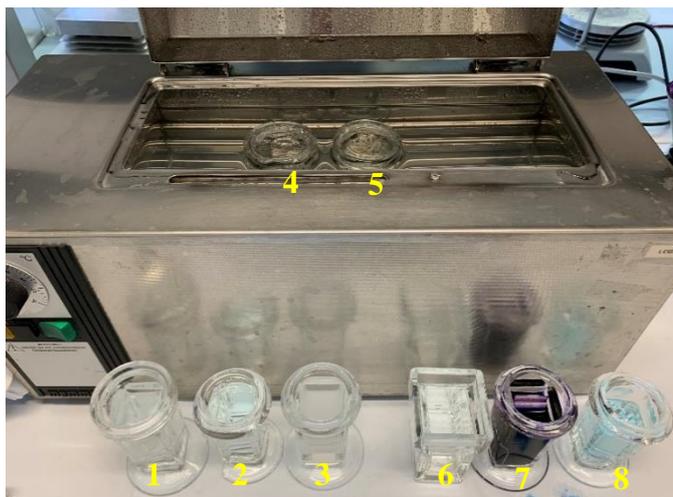


Figura 9 – Avaliação da bandagem GTL ao microscópio.

Nos métodos de coloração diferenciais, tal como o nome indica, visa salientar estruturas específicas dos cromossomas, dando origem a um número de bandas mais restrito. Neste tipo de bandagem temos como exemplos a bandagem CBG, específica para as regiões de heterocromatina constitutiva presente nos centrómeros, braços curtos dos cromossomas acrocêntricos e nas regiões polimórficas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y (Moore e Best, 2001a; Ribeiro, 2018).

A bandagem CBG envolve a solubilização dos fragmentos de eucromatina através de uma série sequencial de tratamentos, iniciando-se com um ácido (HCl), seguido do tratamento com uma base [Ba(OH)₂] e por último um sal (2×SSC). O procedimento da bandagem CBG está representado na figura 10 e consiste na passagem sequencial das lâminas pelos diferentes coplins de vidro numerados de 1 a 8.



Legenda:

- 1 – Solução HCl;
- 2 – Água destilada;
- 3 – Solução de hidróxido de bário a 1%;
- 4 – Água destilada (58°C-60°C);
- 5 – Solução de 2×SCC (58°C-60°C);
- 6 – Água à temperatura ambiente;
- 7 – Solução de Giemsa a 4%;
- 8 – Tampão Gurr.

Figura 10 – Procedimento da bandagem CBG.

A bandagem CBG (Figura 11) é um importante método de coloração complementar para estudar cromossomas marcadores ou então identificar rearranjos nas regiões polimórficas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y. Normalmente, os cromossomas marcadores positivos para bandagem C apresentam um significado clínico menos preocupante, uma vez que à partida não possuem regiões eucromáticas, ou seja, regiões que contêm genes.



Figura 11 – Avaliação da bandagem CBG ao microscópio e exemplo de bandagem CBG. Fonte (cariograma): Estandarte, 2012.

As regiões centroméricas e heterocromáticas são constituídas por sequências altamente repetitivas, assim renaturam de uma forma rápida. A utilização do HCl e do $Ba(OH)_2$ provoca quebras e desnatura o DNA. O tratamento com uma solução salina remove os fragmentos de eucromatina, deixando apenas intactas as regiões que contêm DNA altamente repetitivo. Posteriormente só estas estão disponíveis para a coloração com Giemsa (Schreck e Distèche, 1994).

Outro método de coloração diferencial corresponde à bandagem NOR (*Nucleolar Organizing Region*; Figura 12). Este tipo de coloração, também designada de AgNOR, evidencia as regiões NOR (regiões organizadoras nucleolares) localizadas nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 (Schreck e Distèche, 1994; Ribeiro, 2018).

Estas regiões contêm genes para RNA ribossômico e podem ser coradas com nitrato de prata. A bandagem AgNOR é útil na identificação de rearranjos ou polimorfismos envolvendo os cromossomas acrocêntricos. Após o espalhamento, as lâminas são colocadas numa câmara escura e húmida onde serão adicionadas 2 gotas de nitrato de prata a 50% em cada lâmina (Figura 12). Após a colocação da lamela, as lâminas permanecem na câmara escura entre 18h-24h a 37°C. No dia seguinte, colocam-se as lâminas em água corrente para retirar o excesso de nitrato de prata e para remover as lamelas das lâminas de vidro. Por último, colocam-se as lâminas numa solução de Giemsa durante alguns segundos e posteriormente faz-se uma passagem por tampão Gurr.



Figura 12 – Procedimento inicial da bandagem AgNOR. Adição do nitrato de prata às lâminas e em baixo, exemplo de bandagem AgNor. Adaptado de Guttenbach et al, 1999.

A4 – ANÁLISE AO MICROSCÓPIO

No seguimento da bandagem, as lâminas que apresentam um bom padrão de bandas são analisadas ao microscópio. Inicialmente, na objetiva de 10x, analisa-se a lâmina e

procuram-se metafases com as características adequadas, ou seja, bom espalhamento, metafases individualizadas, poucas sobreposições e tamanho apropriado. Quando a metafase desejada é identificada, observa-se a metafase com a objetiva de imersão, com uma maior ampliação (100x). Se realmente tiver as características mencionadas, então apontam-se as coordenadas e indica-se na folha de análise (anexo I) se a metafase é utilizada para análise, contagem ou fotografia. Este procedimento é repetido várias vezes até se encontrarem metafases com qualidade suficiente para se fazer o diagnóstico. O número de metafases a analisar depende da indicação clínica e a resolução dos cromossomas depende da indicação clínica para o diagnóstico (Figura 13). Por outro lado, o número de kariogramas analisados deve garantir que é possível analisar a estrutura de todos os cromossomas.

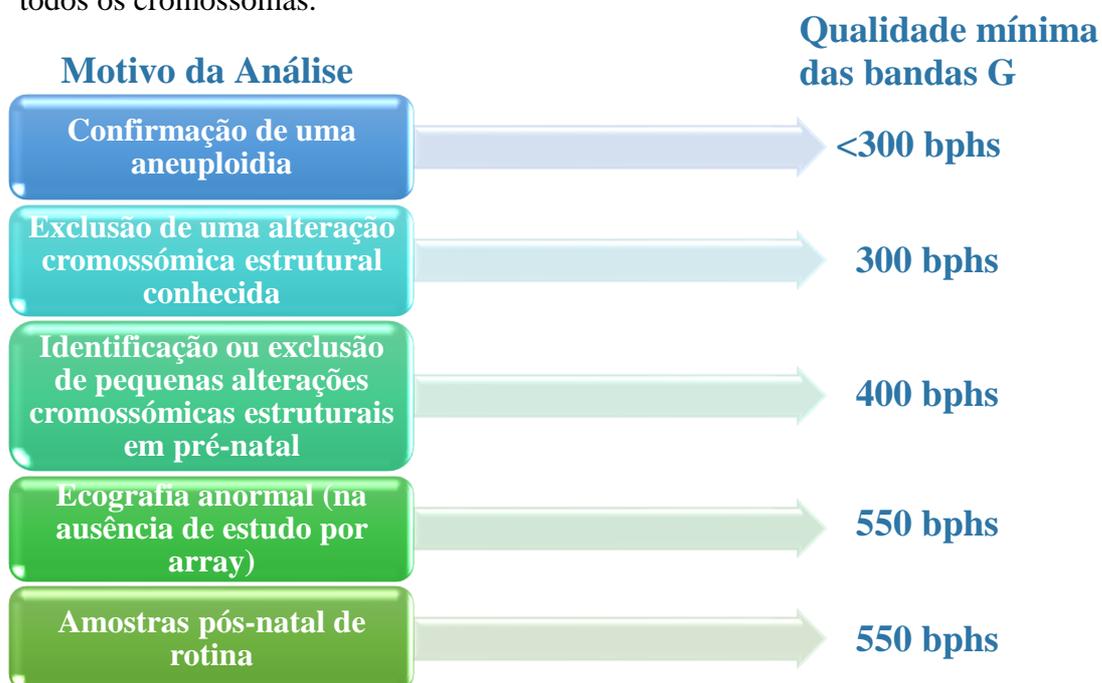


Figura 13 – Qualidade mínima das bandas G consoante o motivo do estudo. Adaptado de Silva et al.,2019

bphs - *bands per haploid set*

Se a metafase for escolhida para análise, então numa folha deve-se fazer a representação esquemática da disposição dos cromossomas, bem como a sua identificação e comparação do padrão de bandas. Nas metafases em que os cromossomas apresentem um padrão de bandas de qualidade e com menos sobreposições, faz-se a captura e organiza-se o kariograma recorrendo ao software Cytovision®. Os cromossomas são analisados desde a extremidade do braço curto até a extremidade do braço longo. As bandas devem ser todas analisadas e comparadas com os ideogramas presentes no ISCN de modo averiguar a presença de alguma alteração cromossómica

estrutural e, sempre que possível, determinar os pontos de quebra. Quando o estudo citogenético estiver concluído, outro técnico é responsável por fazer a revisão do caso de modo a confirmar o diagnóstico. Para se dar um diagnóstico e escrever o relatório é recomendando pelas guidelines internacionais que a análise tenha sido executada em ambas as linhas celulares.

No LCG-FMUC definiu-se que devem ser analisadas 12 a 15 metafases. No entanto, caso seja encontrada alguma alteração cromossômica deve adaptar-se o número de metafases a analisar segundo as *guidelines* descritas em *Prenatal diagnosis best practice guidelines*. No caso de suspeita de mosaïcismo é necessário um estudo extensivo na outra linha celular para se proceder à sua confirmação. O número de metafases para análise depende do cromossoma em questão e se o mosaïcismo aparece apenas numa ou mais células. Portanto, o estudo pode ser moderado (30 metafases) ou exaustivo (50 metafases) (Prenatal diagnosis best practice guidelines, 2009).

No final, após estar confirmado o diagnóstico, é necessário elaborar o relatório. Toda a análise do caso e escrita do relatório devem estar de acordo com as *guidelines* estabelecidas (Silva et al., 2019).

A5 – CRIOPRESERVAÇÃO E RESTITUIÇÃO DE CULTURAS CELULARES

A criopreservação de células é um procedimento muito importante e vantajoso com bastantes aplicações da investigação e na clínica. Criopreservar as células permite prevenir a extinção da linha celular, evitar contaminações, manter a cultura celular em caso de falhas de equipamentos, possibilita a utilização das células para estudos futuros, entre outros (Jang et al. 2017). Este método teve início no final dos anos 80 e permite manter a viabilidade celular durante um tempo indefinido (Whaley et al. 2021; Phelan 2007). Visto que grande parte da massa celular é água, congelar células sem o auxílio de agentes que impeçam a formação de cristais de gelo seria letal. Este facto deve-se às alterações bioquímicas e estruturais resultantes do congelamento da água ao nível intra e extracelular (Whaley et al.2021). Deste modo, o stresse osmótico é considerado o fator com maior relevância para a morte celular durante a criopreservação. Segundo Whaley et al. 2021 existem dois fatores importantes a ter em contro no processo de criopreservação (Figura 14):

- A formação de cristais de gelo que pode comprometer as estruturas das células levando a uma baixa recuperação celular aquando do descongelamento.

- A diminuição da temperatura pode causar um aumento da concentração de solutos no meio à medida que existe a formação de cristais de gelo no interior da célula.

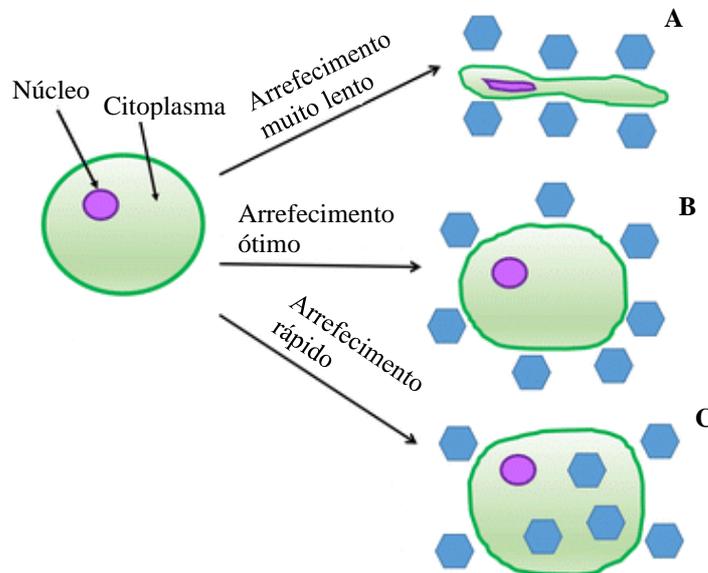


Figura 14 – Alterações no meio celular durante a criopreservação com diferentes tempos de criopreservação. Hexágonos azuis representam a formação de cristais de gelo. (A) Aumento da concentração de eletrólitos e comprometimento da morfologia celular devido à formação de cristais de gelo no meio extracelular. (B) Criopreservação lenta e gradual permite preservar a morfologia e estruturas das células sem comprometer a viabilidade. (C) Formação de cristais de gelo no meio intracelular podendo causar danos nas células comprometendo a sua viabilidade. Adaptado de Wang e Elliott 2017.

Para evitar uma baixa recuperação celular é necessário optar por um bom agente crioprotetor e seguir as etapas protocoladas de forma organizada e criteriosa, respeitando os tempos de criopreservação e descongelamento

O sucesso da criopreservação depende do uso de um bom agente criopreservador que deve ter a capacidade de penetrar nas células e possuir uma baixa toxicidade. O primeiro composto a ser descoberto foi o glicerol, no entanto, o DMSO é o mais utilizado atualmente devido à sua baixa toxicidade e preço relativamente baixo. O modo de ação do DMSO é semelhante ao glicerol, ambos reduzem a concentração dos eletrólitos no meio intra e extracelular, permitindo uma redução do ponto de congelamento e um arrefecimento mais lento e gradual. Deste modo, é possível controlar as perdas de água intracelular, reduzindo a formação de cristais de gelo (Whaley et al.2021; Phelan 2007).

Relativamente à metodologia de criopreservação e reconstituição de culturas celulares, após o isolamento das células, transferimos para o meio de criopreservação e coloca-se em gelo durante um tempo determinado pelo protocolo. Em seguida, as células

devem ser transferidas para gelo seco (-80°C) e por último são criopreservadas em azoto líquido. Por outro lado, o descongelamento deve ser rápido, ou seja, as alíquotas onde estão as células devem ser retiradas do azoto líquido e colocadas a 37°C, para impedir a recristalização do gelo e diluir o agente criopreservador. Em seguida, as células devem passar por uma solução de lavagem (HBSS) e depois transferidas para um novo meio de cultura específico para o tipo de amostra (Phelan 2007; Jang et al. 2017; Whaley et al.2021).

Existem fatores cruciais que devem ser cumpridos com o objetivo de aumentar a taxa de sucesso da criopreservação:

- As células devem estar com um bom índice mitótico;
- Devem ser criopreservadas um grande número de células;
- Deve-se usar um bom agente criopreservador;
- O arrefecimento deve ser lento e gradual;
- O descongelamento deve ser rápido.

Se após a criopreservação houver uma baixa recuperação e viabilidade celular, vários fatores devem ser avaliados para entender a causa subjacente ao insucesso do procedimento. Por um lado, o agente crioprotetor pode não ter sido o mais adequado ou então os tempos de criopreservação e descongelamento não foram rigorosos. Em contrapartida, aquando da criopreservação, o índice mitótico poderia ser reduzido ou a concentração celular baixa.

B – CITOGENÉTICA MOLECULAR

B1 – *FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)*

A citogenética molecular teve início na hibridização *in situ* (ISH), onde o principal objetivo era identificar e localizar sequências específicas nas células ou cromossomas, utilizando isótopos radioativos. Este facto tornava a utilização desta técnica limitada. No entanto, em 1981, Langer et al. otimizou a ISH através da criação de uma sonda que não possuía radioatividade e que podia ser detetada através da marcação com fluorescência de uma molécula para a qual tivesse afinidade (molécula repórter). Com o aparecimento de novas sondas e metodologias, surgiram técnicas mais sensíveis como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) que utiliza sondas marcadas diretamente com fluorocromos (Riegel, 2014). Uma sonda marcada diretamente corresponde a um segmento de RNA ou DNA em cadeia simples, onde foi inserido um fluorocromo através de uma reação

enzimática. O alvo da sonda é uma sequência complementar, que após desnaturar, fica em cadeia simples permitindo a ligação com a sonda (Wolff, 2013).

As sondas utilizadas na FISH determinam a resolução do estudo molecular e podem ser classificadas de acordo com o padrão das sequências que detetam. Atualmente existe uma imensidão de sondas comerciais que podem ser utilizadas para a investigação e diagnóstico na detecção de várias alterações cromossômicas. As sondas podem ser centroméricas (Figura 15A), logo dirigidas para o DNA α -satélite (centrômeros). Em diagnóstico podem ser aplicadas para caracterizar, identificar cromossomas marcadores e ainda para pesquisa de mosaicos. As sondas de sequência única (15B e 15A) são específicas para um locus, logo permitem avaliar alterações que envolvem esse local específico. Existem ainda sondas específicas para as regiões subteloméricas (Figura 15C) e teloméricas, que podem ser aplicadas na detecção de deleções e duplicações nas regiões terminais dos cromossomas, translocações e outros rearranjos cromossômicos envolvendo as regiões abrangidas pela sonda. Existem ainda sondas de pintura (WCP-Figura 15D) que marcam todo o cromossoma ou até sondas que marcam apenas um dos braços cromossômicos. A marcação de todo o cromossoma pode ser útil para caracterizar alterações cromossômicas, nomeadamente inserções (Speicher e Carter, 2005 Wolff, 2013; Riegel, 2014). As sondas podem ser obtidas por variados métodos, nomeadamente por citometria de fluxo ou microdissecção, com posterior amplificação recorrendo à técnica de DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide-primed PCR*) (Riegel, 2014).

Através da FISH foram surgindo novas técnicas mais específicas, como o COBRA (*combined binary ratio labeling FISH*), SKY (*spectral karyotyping FISH* – Figura 15E) e o M-FISH (multicolour FISH).

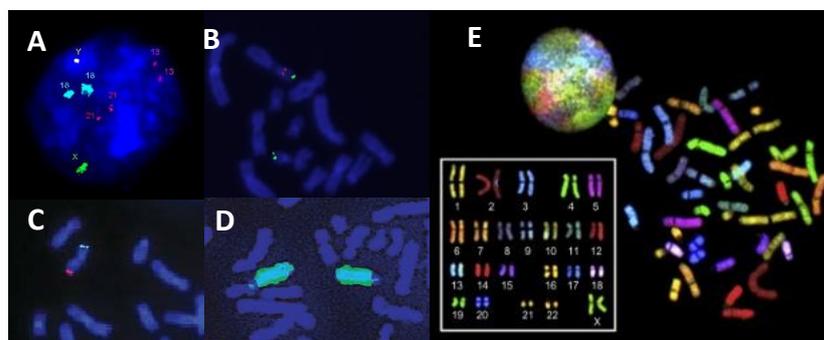


Figura 15 – Exemplos dos diferentes tipos de sondas utilizadas na técnica de FISH. (A) FISH em interfase utilizando sondas centroméricas para os cromossomas X e Y e sondas de sequência única para os cromossomas 13, 18 e 21. Nesta imagem é possível observar um núcleo aparentemente diploide. Fonte: Vorsanova et al., 2010. (B) Sondas de sequência única (vermelho) dirigidas para a região crítica da síndrome de DiGeorge (22q11.21) e sonda controlo (verde). É possível verificar uma deleção dessa região num dos cromossomas. Fonte: Imagem cedida pelo LCG-FMUC. (C) Sondas subteloméricas para o cromossoma 11 (11q – vermelho; 11p – verde). Fonte: Gadzicki et al., 2006. (D) Sonda de pintura dirigida para o cromossoma 14. Fonte: Halder e Jain. 2012. (E) Spectral Karyotyping FISH. Fonte: Chowdhury e Dubey, 2014,

Relativamente à preparação das amostras para hibridização por FISH (Figura 16), são espalhadas 1 a 2 lâminas que ficam à temperatura ambiente para promover o envelhecimento. Quanto mais tempo as lâminas ficarem a envelhecer, maior terá de ser a temperatura usada para a desnaturação. As lâminas podem ser armazenadas a -20°C caso não se hibridizem no dia seguinte. Após a avaliação do espalhamento, se as metafases apresentam muito citoplasma, após o pré-tratamento, deve-se fazer uma digestão com pepsina para remover o citoplasma e tornar acessível os núcleos/metafases à entrada da sonda específica utilizada.

O pré-tratamento tem como objetivo tornar o material mais acessível à sonda e consiste na passagem das lâminas, durante uns minutos, na solução de 2xSSC a 37°C. Em seguida, realiza-se a desidratação através da passagem sequencial das lâminas por etanol a 70%, 85% e 100%. Posteriormente, delimita-se a área de interesse, adiciona-se a sonda à lâmina e coloca-se uma lamela. Depois faz-se a co-desnaturação numa placa de aquecimento. Após o tempo estabelecido no protocolo, as lâminas são colocadas numa câmara húmida e escura durante 16h a 20h para promover a hibridização.

No dia seguinte efetuam-se as lavagens pós-hibridização que têm como objetivo a remoção do excesso de sonda não ligada. Primeiro colocam-se as lâminas numa solução de 2xSSC com Tween para promover a remoção da lamela. O tween é um surfactante não iónico estável e com baixa toxicidade, o que permite a sua utilização como detergente (Johnson, 2013). Nas lavagens pós-hibridização as lâminas são colocadas numa solução de 0.5xSSC a uma temperatura entre os 68°C e os 70°C, durante uns segundos. Depois volta-se a passar as lâminas na solução de 2xSSC com Tween para remover a sonda na totalidade. Finalmente aplica-se o DAPI nas lâminas e colocam-se no frigorífico durante alguns minutos. Em seguida, recorrendo à microscopia de fluorescência efetua-se a análise e o estudo da amostra.



Figura 16 – *Workflow* geral do procedimento da FISH.

C – GENÉTICA MOLECULAR E GENÓMICA

C1 – EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO, QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA E PURIFICAÇÃO

A extração de DNA genómico é um procedimento crucial para as técnicas da biologia molecular, uma vez que é a partir deste ácido nucleico que se realizam diversas metodologias de análise genómica. É importante aplicar um bom método de extração e cumprir rigorosamente todas as etapas protocoladas, pois o sucesso do estudo vai depender da qualidade do DNA genómico obtido (Tan e Yiap, 2009).

O objetivo principal da extração do DNA genómico é então a obtenção desta molécula com uma boa qualidade e quantidade, ou seja, conter baixos níveis de RNA, proteínas ou outros contaminantes que afetem a sua pureza (Gupta, 2019). O DNA genómico pode ser isolado a partir de diversas amostras biológicas. No entanto, em contexto de diagnóstico pré e pós-natal as mais comuns são: amniócitos, vilosidades coriônicas, fibroblastos e sangue periférico.

Desde a primeira extração de DNA bem-sucedida, em 1869 por Friedrich Miescher foram desenvolvidos vários métodos de extração de DNA genómico. Atualmente existem *kits* comerciais que permitem o seu isolamento de uma forma rápida e com uma boa pureza. O método de extração mais adequado depende do objetivo do estudo em curso. No caso do LCG-FMUC, para diagnóstico pré e pós-natal, são utilizados dois métodos de extração:

- Extração de DNA genómico a partir de amostras de sangue periférico por *salting-out*;
- Extração de DNA genómico utilizando colunas de sílica.

O primeiro método é realizado utilizando a um *kit* desenvolvido pela *Agilent Technologies*® e consiste na utilização de soluções com elevada concentração salina para promover a precipitação das proteínas, após um tratamento inicial com proteases. Neste caso, utiliza-se uma solução comercial, denominada de pronase, para promover a degradação de proteínas e nucleases presentes na amostra. Após a precipitação das proteínas, realiza-se uma centrifugação para permitir a sua deposição e transfere-se o sobrenadante para um novo tubo. Seguidamente, realiza-se a precipitação do DNA utilizando etanol, e a eluição num volume adequado ao tamanho do *pellet* obtido após precipitação (Chacon-Cortes e Griffiths, 2014). Este método simples e com baixa

toxicidade torna-se vantajoso, pois permite a obtenção de uma boa quantidade de DNA genómico com elevada pureza sem recurso a solventes orgânicos (Shokrzadeh e Mohammadpour, 2018).

O segundo método utiliza colunas de sílica para isolar o DNA genómico dos restantes componentes celulares, recorrendo a um kit desenvolvido pela Roche®. A sílica apresenta carga positiva, logo tem uma elevada afinidade para as moléculas de DNA que apresentam carga negativa (Tan e Yiap, 2009; Chacon-Cortes e Griffiths, 2014). Após uma digestão celular utilizando um tampão de lise e um tratamento com uma protéase, denominada de proteinase K, efetua-se a precipitação do DNA através da adição de isopropanol. Em seguida, a amostra é transferida para a coluna de sílica e iniciam-se um conjunto de lavagens, de forma sequencial e espaçadas por centrifugações para eliminar os contaminantes. Os tampões de lavagem são normalmente constituídos por etanol, NaCl e outros componentes essenciais para a remoção de proteínas, sais e outros contaminantes. No final, o DNA genómico é eluído da coluna de sílica utilizando um tampão com uma baixa concentração salina (Figura 17) (Tan e Yiap, 2009).

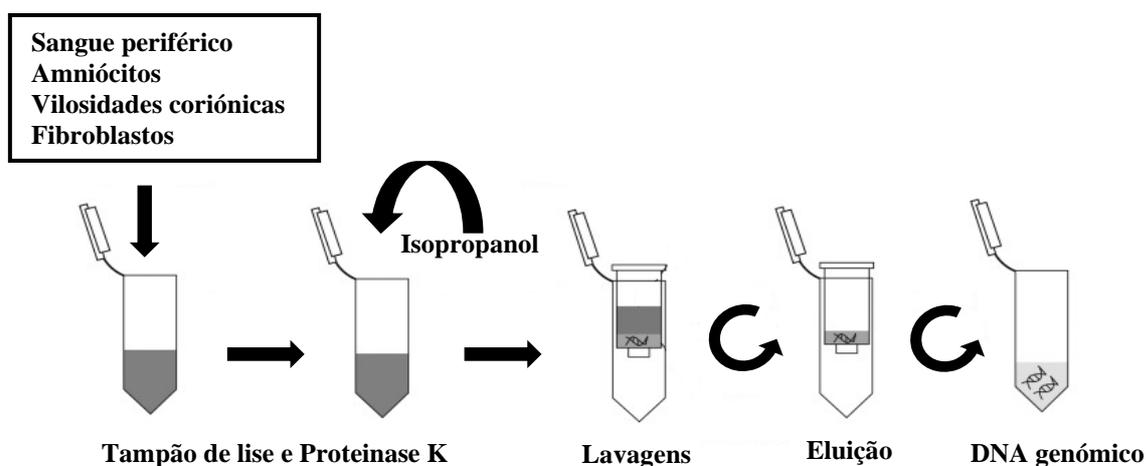


Figura 17 – Esquema simplificado do processo de extração de DNA genómico utilizando colunas de sílica. Adaptado de Haranda, 2016

Este método permite isolar o DNA genómico de uma forma rápida e simples, com uma elevada pureza. No entanto, em comparação com o método de extração por *salting-out*, a concentração final de DNA pode ser inferior.

No final da extração, o DNA é quantificado por espectrofotometria, permitindo uma avaliação quantitativa e qualitativa da amostra. A espectrofotometria permite averiguar a concentração de DNA através da medição da quantidade de luz absorvida pela amostra em comprimentos de onda específicos (Gupta, 2019). Na maioria dos casos, utiliza-se o

rácio entre a absorvância a 260nm (A_{260}) e 280nm (A_{280}) que permite avaliar a sua pureza. O valor desejado deve ser aproximadamente de 1,8. Caso este valor seja inferior, pode indicar a presença de proteínas ou outros contaminantes (Lucena-Aguilar et al., 2016; Gupta, 2019). A relação A_{260}/A_{230} é utilizado com um segundo indicador da pureza do DNA. Para uma amostra ser considerada pura, esta deve ter um valor de A_{260}/A_{230} entre 2,0 e 2,2. Caso o valor obtido seja inferior, poderá indicar a presença de contaminantes que possuam uma absorvância elevada aos 230nm, tais como proteínas, EDTA, lípidos e sais (Lucena-Aguilar et al., 2016).

Em muitos casos é necessário purificar e concentrar o DNA genómico obtido após extração, nomeadamente em amostras de diagnóstico pré-natal para aCGH. No LCG-FMUC utiliza-se um *kit* desenvolvido pela *Zymo Research*®. Este procedimento é também realizado com colunas e consiste na utilização de tampões de lavagem, de forma sequencial, para remover contaminantes da amostra. No final, o objetivo é obter uma maior concentração de DNA genómico, com uma pureza superior à inicial.

C2 – QUANTITATIVE FLUORESCENT-PCR

Desde a década de 70 que a citogenética convencional é a técnica de primeira linha utilizada no diagnóstico pré-natal, nomeadamente na deteção de alterações numéricas envolvendo os autossomas 13, 18 e 21, bem como aneuploidias dos cromossomas sexuais (Badenas et al., 2010). No entanto, os resultados apresentam um tempo de espera mais demorado em comparação com as técnicas moleculares. No caso do diagnóstico pré-natal, era importante implementar metodologias que permitissem reduzir o tempo de espera e comunicar os resultados com uma maior celeridade. A partir da década de 90, utilizou-se a FISH em amniócitos não cultivados para este propósito. Mais recentemente, surgiu o *Quantitative Fluorescent PCR* (QF-PCR) que, assim como a FISH, permitiu diminuir o tempo de resposta, sendo possível a emissão de um relatório em 24h-48h (Nicolini et al., 2004; Badenas et al., 2010). No entanto, a utilização do QF-PCR para o despiste das aneuploidias mais comuns tornou-se mais vantajosa por ser menos laboriosa e permitir o processamento de várias amostras em simultâneo. Além disso, permite a deteção da contaminação materna (Nicolini et al., 2004).

A técnica molecular QF-PCR é então muito utilizada no contexto de diagnóstico pré-natal como um teste rápido para o despiste das aneuploidias mais comuns (cromossomas 13, 18, 21, X e Y), utilizando DNA extraído de amostras de biopsia do trofoblasto, líquido amniótico, sangue fetal ou pele fetal (Inkster et al., 2018). Os

princípios da técnica QF-PCR residem na amplificação, detecção e análise de marcadores genéticos denominados de microssatélites (STRs – short tandem repeats), em *loci* polimórficos dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y e também *loci* não polimórficos dos cromossomas sexuais. Após extração do DNA genómico, é feita uma diluição do DNA para a concentração desejada. Posteriormente, transfere-se para duas misturas de reação que contêm os componentes necessários para a reação de PCR, nomeadamente os *primers* para as regiões alvo. Estes marcadores são amplificados por PCR utilizando *primers* marcados com fluorescência. Em seguida, procede-se à separação dos fragmentos por eletroforese capilar, num analisador genético (Badenas et al., 2010). O número de cópias é posteriormente determinando, calculando a proporção entre a área e a altura dos picos detetados para cada marcador.

A análise do eletroferograma obtido após eletroforese capilar é feita com recurso ao *software GeneMapper*. Um padrão de dois picos iguais na mesma região cromossómica demonstra a presença de duas cópias da região-alvo (1:1 – Figura 18A), em oposição, três picos na mesma região cromossómica (1:1:1 – Figura 18B) ou dois picos com uma razão de 1:2 (Figura 18C) é sugestiva de trissomia dessa região. No caso da amostra ser monossómica ou homozigótica para uma determinada região, apenas vai surgir um pico. Nestes casos o marcador é considerado não-informativo, uma vez que não permite a quantificação do número de alelos dessa região (Figura 18D). As análises dos produtos de amplificação também permitem a determinação do sexo da amostra. Numa amostra do sexo masculino existirá amplificação dos marcadores polimórficos e não polimórficos do cromossoma Y (Figura 18E). A análise da proporção entre o cromossoma X e os autossomas 3 e 7 permite averiguar a presença de alguma síndrome que envolva os cromossomas sexuais. Por outro lado, numa amostra do sexo feminino, não existirá amplificação de regiões específicas do cromossoma Y e a proporção entre autossomas e cromossomas sexuais terá de ser aproximadamente igual (Figura 18F). Existem outros marcadores associados aos cromossomas sexuais que permitem inferir o sexo da amostra com uma maior exatidão.

Depois da análise de resultados deve-se elaborar o relatório de acordo com as *guidelines* internacionais e com o ISCN. Em cada caso, têm de existir pelo menos dois marcadores informativos por cada cromossoma para poder permitir inferir a presença ou ausência de alteração (Silva et al., 2019). A avaliação citogenética é recomendada, pois permite classificar uma potencial alteração cromossómica que pode ter influência em gestações futuras e modificar o risco de recorrência. Além disso, num QF-PCR com

resultado normal pode ser importante avaliar outras regiões do genoma para perceber as causas subjacentes a determinada indicação clínica. Nestes casos poderá ser realizado aCGH ou outra técnica complementar, mediante a preferência do clínico.

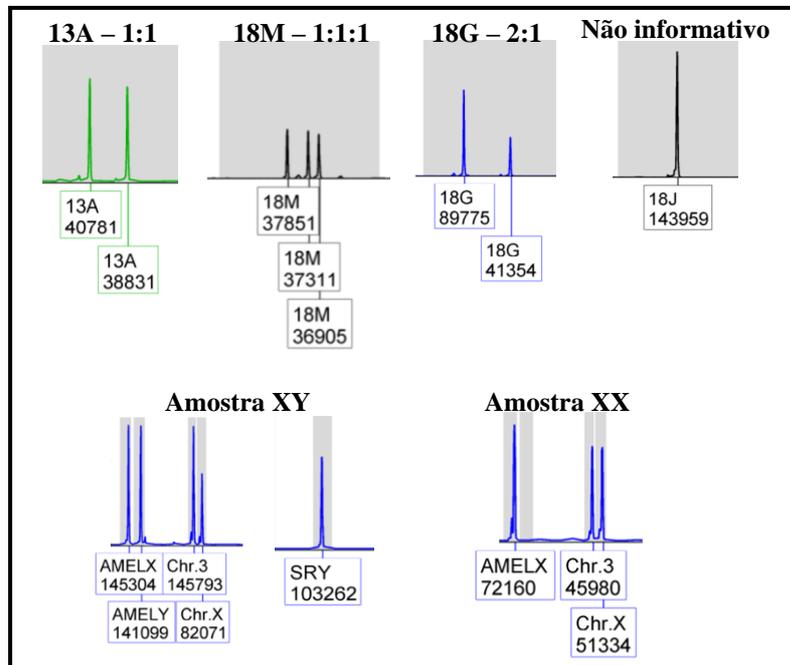


Figura 18 – Análise de fragmentos após QF-PCR. (A) – Resultado dissômico para aquela região do cromossoma 13. (B) – Resultado trissômico para aquela região do cromossoma 18 com as regiões polimórficas de tamanhos diferentes. (C) - Resultado trissômico para aquela região do cromossoma 18, com duas regiões polimórficas de tamanhos iguais e uma diferente. (D) – Marcador não informativo. (E) – Amostra do sexo masculino. Existe amplificação de regiões presentes no cromossoma Y e a proporção entre o cromossoma 3 e cromossomas sexuais indica a presença de dois cromossomas 3 para um cromossoma X. (F) – Amostra do sexo feminino. Não existe amplificação de regiões do cromossoma Y e a proporção entre os cromossomas 3 e os cromossomas X indica a existência de dois cromossomas X.

C3 – DIAGNÓSTICO DE X-FRÁGIL POR PCR

A síndrome do X-frágil (FXS) é uma doença genética associada a um déficit cognitivo que pode variar de ligeiro a grave, incluindo distúrbios comportamentais e determinadas características físicas específicas. Esta síndrome é considerada a forma mais comum de perturbação do déficit intelectual hereditário, afetando 1 em 4000 homens e 1 em 5000-8000 mulheres (Biancalana et al., 2015; Ciaccio et al., 2017). Homens com esta síndrome tendem a apresentar uma sintomatologia mais evidente, manifestando um déficit cognitivo mais severo e em determinados casos podem coexistir alguns dismorfismos. Por sua vez, as mulheres nem sempre apresentam um fenótipo tão severo devido ao processo de lionização, indicando uma penetrância reduzida (Biancalana et al., 2015). Etiologicamente a FXS é causada por uma mutação dinâmica na 5´ untranslated region (5´UTR) do gene *fragile X messenger ribonucleoprotein 1 (FMR1)* que possui um

conjunto de repetições CGG, intercaladas por repetições AGG com a função de conferir estabilidade, contribuindo para a diminuição do risco de expansão (Biancalana et al., 2015; Ciaccio et al., 2017). Este gene, localizado no cromossoma Xq27.1, apresenta 17 exões, um tamanho de 39 kb e codifica uma proteína de ligação ao RNA designada de FMRP (Biancalana et al., 2015).

O número normal de repetições na 5'UTR do gene *FMRI* situa-se num intervalo de valores entre 6 e 44 CGG, nesta condição o alelo é estável e não existe risco de expansão. Um número de repetições entre 45 e 54 é considerado um alelo intermédio, este é mais instável, no entanto, não apresenta implicações fenotípicas. A pré-mutação ocorre quando existe um número de repetições entre 55 e 200. Esta expansão aumenta o risco de desenvolver insuficiência ovárica precoce (FXPOI) nas mulheres e síndrome de tremor/ataxia (FXTAS) em ambos os sexos. A expansão dos tripletos acima das 200 repetições constitui a mutação completa (Biancalana et al., 2015; Ciaccio et al., 2017). Na FXS também se verifica uma hipermetilação da região circundante do promotor do gene *FMRI*, que está associada a um mecanismo epigenético de silenciamento de genes. Assim, a transcrição é inibida culminando na ausência da produção da proteína FMRP (Bagni et al., 2012).

Relativamente à metodologia, o diagnóstico da síndrome de X-frágil é realizado recorrendo à técnica de PCR utilizando um par *primers* específicos que flanqueiam a região alvo, descritos por Fu et al., 1991 (Figura 21A). Após a elaboração das misturas de reação que contêm os reagentes necessários para a reação, realiza-se o PCR convencional segundo o método descrito por Wilson et al., 2008.

Após este primeiro PCR com os *primers* C (*forward*) e F (*reverse*), as amostras são analisadas recorrendo a uma eletroforese capilar. Em seguida, recorrendo ao *software GeneMapper*, visualiza-se o tamanho dos fragmentos e calcula-se o número de tripletos CGG. Numa amostra do sexo masculino com um alelo normal, deve obter-se um resultado semelhante ao da figura 19. Para se efetuar o cálculo do número de tripletos, subtrai-se o tamanho da região flanqueadora entre o emparelhamento dos *primers* e o início dos tripletos CGG ao tamanho do fragmento e em seguida divide-se esse valor por três.

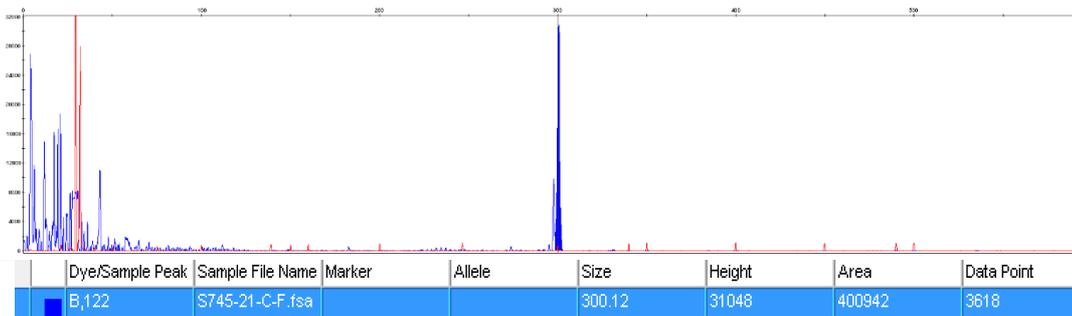


Figura 19 – Resultado do PCR convencional numa amostra do sexo masculino. É possível observar uma amostra do sexo masculino cujo alelo é normal e possui 32 CGG ($300-221=79/3=26,33+6\approx 32$). Imagem cedida pelo LCG-FMUC

Em amostras do sexo feminino com ambos os alelos normais, obtém-se um resultado semelhante ao da figura 20

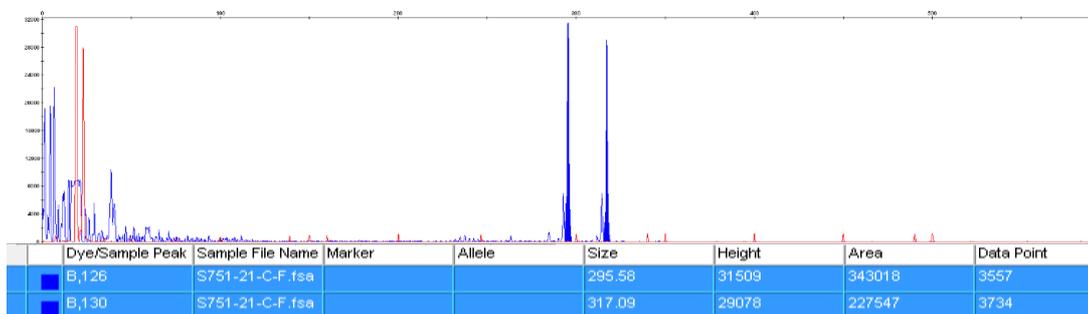


Figura 20 – Resultado do PCR convencional numa amostra do sexo feminino. É possível observar uma amostra do sexo feminino cujos alelos são normais e possuem 31 e 38 CGG, respetivamente (Alelo 1: $296-221=75/3=25+6=31$; Alelo 2: $317-221=96/3=32+6=38$). Imagem cedida pelo LCG-FMUC

Pré-mutações de grande dimensão ou mutações completas não são detetadas por esta técnica. Nestes casos é necessário recorrer ao *Triplet Repeat Primed* PCR (TP-PCR) que além de *primers* que flanqueiam a região alvo, utiliza um terceiro conjunto de *primers* que apresentam complementaridade para os tripletos CGG (Figura 21B).

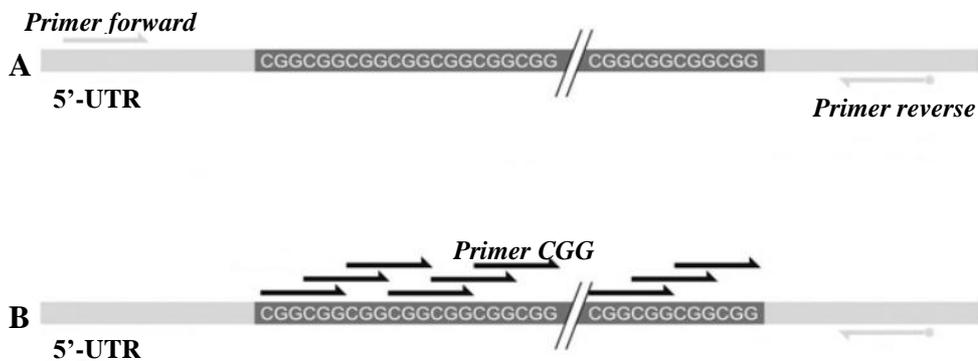


Figura 21 – Representação da localização dos *primers* utilizados no PCR convencional (A) e no TP-PCR (B). Adaptado de Seneca et al. (2012)

No caso de um doente do sexo masculino que seja portador de uma mutação completa, após o PCR convencional não haverá qualquer resultado uma vez que o tamanho do fragmento é superior ao nível de resolução da técnica. Então a amostra é submetida ao TP-PCR e caso se verifique a presença da mutação completa, o resultado deve ser semelhante ao da figura 20. No caso de uma amostra do sexo feminino, após o PCR convencional, será possível visualizar apenas o alelo normal.

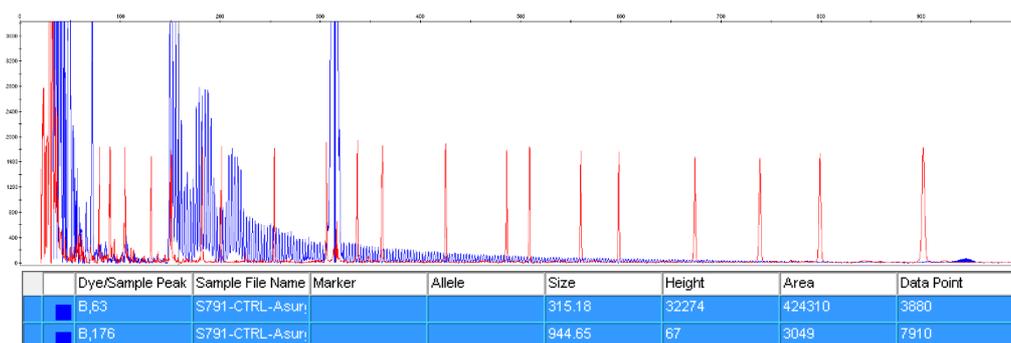


Figura 22 – Resultado do TP-PCR. É possível observar uma amostra do sexo feminino portadora de uma mutação completa e com um alelo normal (Alelo 1: $315-228=87/3=29$ CGG; Alelo 2: $945-228=717/3=239$ CGG). Imagem cedida pelo LCG-FMUC

Além das mutações dinâmicas descritas anteriormente, esta técnica também permite distinguir as mulheres que são homozigóticas, das mulheres com mutação completa e ainda permite identificar as interrupções constituídas pelo trinucleótido AGG (Seneca et al., 2012; Tassone, 2015). Embora seja uma técnica que permite averiguar o número de repetições do trinucleótido CGG de uma forma rápida e simples, esta não deteta mutações pontuais ou outras alterações que envolvam o gene *FMRI* nem mosaïcismo de baixa expressão

C4 – DESPISTE DE CONTAMINAÇÃO MATERNA

A presença de contaminação materna em amostras de vilosidades coriônicas ou líquido amniótico torna-se um risco pré-analítico que pode levar a um diagnóstico incorreto. Estas amostras são colhidas durante um procedimento invasivo por um obstetra/ginecologista e é visualmente guiado ecograficamente.

Em determinadas situações, devido ao difícil acesso ou por erros técnicos, pode haver a colheita de material materno, sejam células hematopoiéticas ou tecido materno (Schrjver et al., 2007; Naga et al., 2011). O processamento das amostras também pode influenciar o risco de contaminação.

No caso de análises em amostras de amniócitos não cultivados, o risco de contaminação materna é superior quando comparado com amniócitos em cultura, pois em cultura as condições são favoráveis ao crescimento de amniócitos e não das células hematopoiéticas. Por outro lado, em amostras de vilosidades coriônicas, se houver uma incorreta separação dos tecidos, tanto o material materno como o fetal vai ser cultivado. Por este motivo, as culturas de vilosidades coriônicas apresentam um risco superior de contaminação materna (Schrjver et al., 2007). Nestas situações, é importante fazer um despiste de contaminação materna para ser possível confirmar que o material que em análise tem apenas origem fetal.

A presença de contaminação materna torna-se particularmente preocupante em estudos que envolvam a amplificação de DNA por PCR, uma vez que se trata de uma técnica sensível, onde a mínima presença de um contaminante pode falsear um resultado, ou em estudos citogenéticos e moleculares de fetos femininos, sendo impossível a distinção da contribuição materna e fetal (Schrjver et al., 2007).

Relativamente ao procedimento, após extração do DNA a partir de amostras de líquido amniótico ou vilosidades coriônicas e do sangue periférico materno é feita uma quantificação por espectrofotometria, seguida de uma diluição para a concentração desejada. Posteriormente, elabora-se uma mistura de reação que contém os componentes necessários para a amplificação das regiões alvo. Neste caso são amplificados vários *loci* polimórficos de diversos cromossomas recorrendo à técnica de PCR. Seguidamente, faz-se a separação dos fragmentos por eletroforese capilar.

A análise consiste na comparação do perfil obtido na amostra fetal com o perfil da amostra materna. Na ausência de contaminação materna observa-se a presença de 2 alelos no perfil da amostra fetal, um de origem materna e outro de origem paterna (figura 23A). Na presença de contaminação materna é possível verificar a existência de um total de 3 picos no eletroferograma, correspondentes aos dois alelos maternos e a um de origem paterna (Figura 23B).

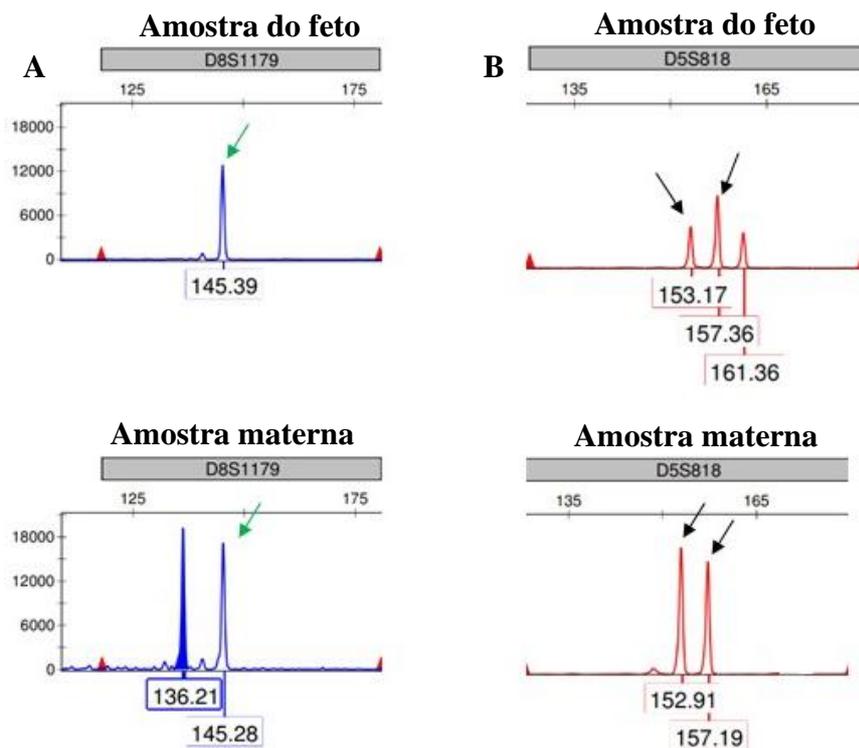


Figura 23 – Exemplo de como é feita a análise dos marcadores para averiguar a presença de contaminação materna. (A) – Amostra fetal homocigótica para aquela região do cromossoma 8 e sem contaminação materna. Existe apenas a presença de um alelo de origem materna. (B) . Amostra fetal com contaminação materna. É possível observar 3 picos na amostra fetal correspondentes aos 2 alelos materno e a 1 alelo de origem paterna. Imagem cedida pelo LCG-FMUC

C5 – MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) E METHYLATION SPECIFIC MLPA (MS-MLPA)

O *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) é uma técnica semi-quantitativa que permite averiguar variações no número de cópias (CNVs). Desenvolvido em 2002 pela MRC-Holland®, o MLPA permite analisar até 50 sequências de DNA numa única reação. Além disso, o seu baixo custo em comparação com outras técnicas moleculares torna a sua utilização bastante vantajosa (Stuppia et al., 2012; Wills et al., 2012). Devido à capacidade de detetar deleções e duplicações ao nível do genoma de uma forma rápida e simples, é utilizado para estudar síndromes específicos onde existe um ou vários genes associados. O MLPA também é utilizado como uma técnica complementar do aCGH, para validação de resultados (Stuppia et al., 2012). Portanto, a partir de pouca quantidade de DNA é possível obter informação relativamente a diversas regiões do genoma, recorrendo a um PCR multiplex com várias sondas diferentes. Estas sondas consistem em dois fragmentos, específicos para determinada sequência, que se ligam à sequência alvo. Um dos fragmentos da sonda é constituído pela sequência *stuffer* que difere de tamanho entre sondas para permitir a sua distinção aquando da análise. A reação

utiliza ainda um *primer* universal que permite a amplificação de todas as sondas (Stuppia et al 2012; Wills et al., 2012).

Relativamente ao procedimento, o MLPA pode dividir-se em 5 etapas (Figura 24): Desnaturação do DNA e hibridização das sondas; Reação de ligação promovida pela ligase; Amplificação por PCR; Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar; Análise dos resultados (Stuppia et al 2012).

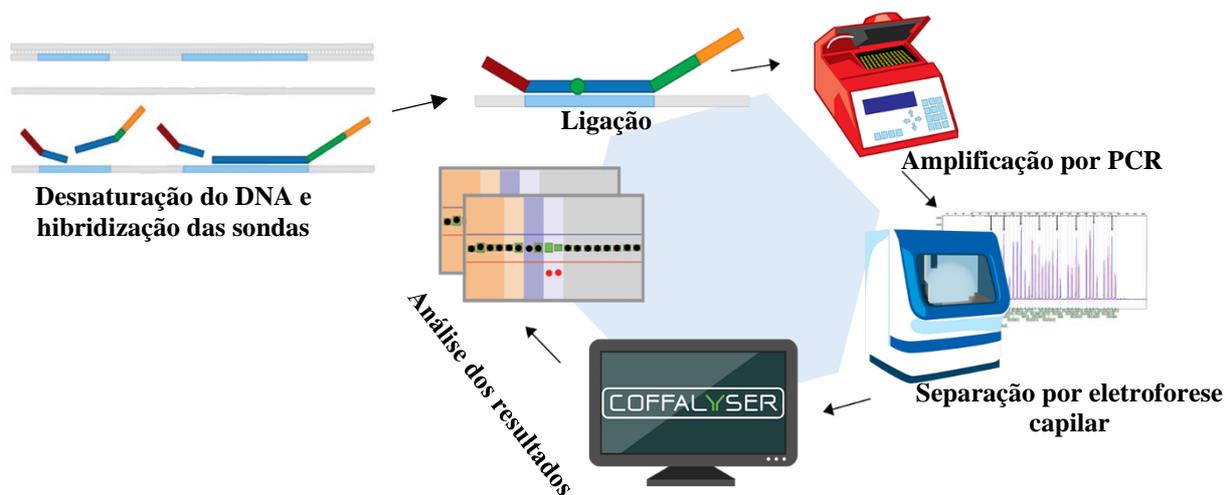
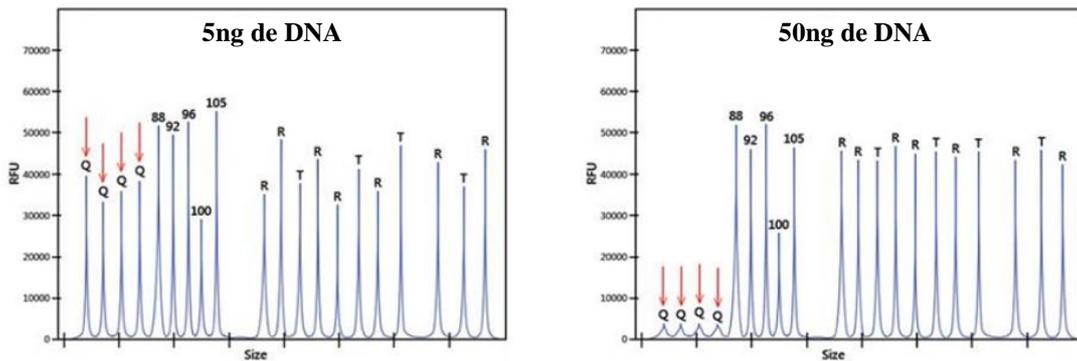


Figura 24 – Representação esquemática da técnica de MLPA. Adaptado de MRC-Holland®

Após a desnaturação do DNA, é realizada a hibridização com uma mistura de sondas. Esta reação ocorre num termociclador, durante cerca de 16h, para permitir a completa ligação das sondas às regiões alvo. Em seguida, dá-se a reação de ligação pela adição da ligase ao tubo da reação, a cerca de 54°C e depois as sondas são amplificadas por PCR (Wills et al., 2012; MRC-Holland®, 2019). Numa reação devem ser utilizadas 3 amostras de referência, um negativo como controlo de qualidade e sempre que possível um controlo positivo. Os *kits* para o MLPA possuem um controlo interno para avaliar a reação. Esse controlo é realizado pela análise de fragmentos relacionados com a desnaturação e quantidade de DNA, denominados por fragmentos D e Q respetivamente. Existe ainda uma sonda padrão de 92bp que permite fazer a comparação com os outros fragmentos (MRC-Holland®, 2019). Quando a quantidade de DNA é insuficiente os fragmentos Q terão um sinal elevado (Figura 25A). Por outro lado, uma boa quantidade terá o efeito inverso. Relativamente aos fragmentos D, idealmente devem aparecer altos, pois caso contrário indica que não houve uma correta desnaturação (Figura 25B) (MRC-Holland®, 2019).

A – Fragmentos Q



B – Fragmentos D

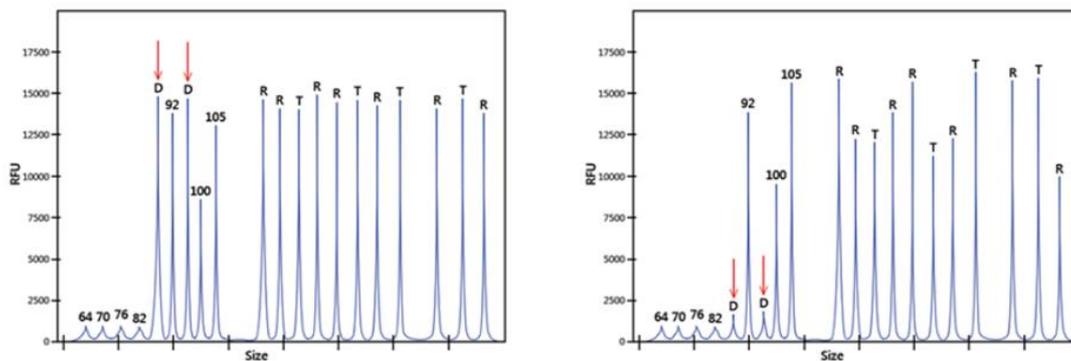


Figura 25 – Controle de qualidade da reação pela análise dos fragmentos Q e D. (A) – Efeito da quantidade de DNA nos fragmentos Q. (B) – Efeito de uma boa desnaturação da amostra (esquerda) em comparação com uma desnaturação incompleta (direita). Na figura é possível observar o fragmento de 92bp correspondente à sonda padrão e ainda os fragmentos 100 e 105 correspondentes aos cromossomas X e Y, respetivamente. Adaptado de MRC-Holland®

Depois de ocorrida a reação, faz-se a análise de resultados no *software Coffalyser*. Nesta análise é possível ver uma representação gráfica dos resultados e os respetivos rácios obtidos por comparação entre as amostras e as referências, que permitem averiguar se foi detetada uma deleção ou duplicação. Um rácio com um valor entre os 0.7 e os 1.3 é considerado normal, ou seja, não foi detetada qualquer alteração. Por outro lado, um rácio superior a 1,3 ou inferior a 0,7 é indicativo de uma duplicação, ou deleção, respetivamente (Wills et al., 2012).

Em comparação com as técnicas da citogenética convencional e molecular, o MLPA consegue detetar alterações com um menor tamanho e ainda cobre mais regiões do genoma que determinadas sondas utilizadas na FISH. No entanto, esta técnica não permite a deteção de alterações cromossómicas equilibradas, alterações de ploidia nem mosaicismo de baixo grau.

O *Methylation Specific MLPA* é uma variação da técnica anterior, que além de permitir detetar CNVs, também possibilita a avaliação do estado de metilação de vários

genes (Nygren et al., 2005; Eggermann et al., 2016). A metilação é um mecanismo epigenético de regulação génica e está associado ao silenciamento de genes (Moore e Fan, 2012). No diagnóstico pré e pós-natal, a avaliação da metilação é importante para diagnosticar síndromes específicas associadas com alterações em genes que sofrem *imprinting* genómico ou em casos de dissomia uniparental. O *imprinting* é um mecanismo biológico reversível responsável por assegurar que os cromossomas de origem materna e paterna possuem assinaturas epigenéticas diferentes, na maioria dos casos associadas à metilação, resultando em diferentes níveis de expressão de determinados genes (Wang, 2013b).

Relativamente ao procedimento, é muito semelhante ao anterior. No entanto, após hibridização das sondas a reação é dividida em duas reações: uma para analisar CNVs e outra para avaliar a metilação, onde será adicionado uma enzima de restrição sensível à metilação – HhaI. Esta enzima é adicionada em simultâneo com a ligase e todo o processo em seguida decorre de forma semelhante ao MLPA (Nygren et al., 2005; MRC-Holland®, 2020).

Na presença de metilação as sondas vão hibridizar com a sequência de DNA e posteriormente ocorrerá a ligação promovida pela ligase (Figura 26). O grupo metilo presente na região vai impedir a ação da enzima de restrição e a sonda é amplificada na reação de PCR subsequente, resultado num sinal normal após a separação por eletroforese capilar. Por outro lado, em regiões não metiladas, as sondas vão ser ligadas pela ligase e digeridas pela enzima de restrição (Figura 26). Neste caso não haverá nenhum sinal, pois a digestão impossibilita a amplificação das sondas (Nygren et al., 2005; MRC-Holland®, 2020).

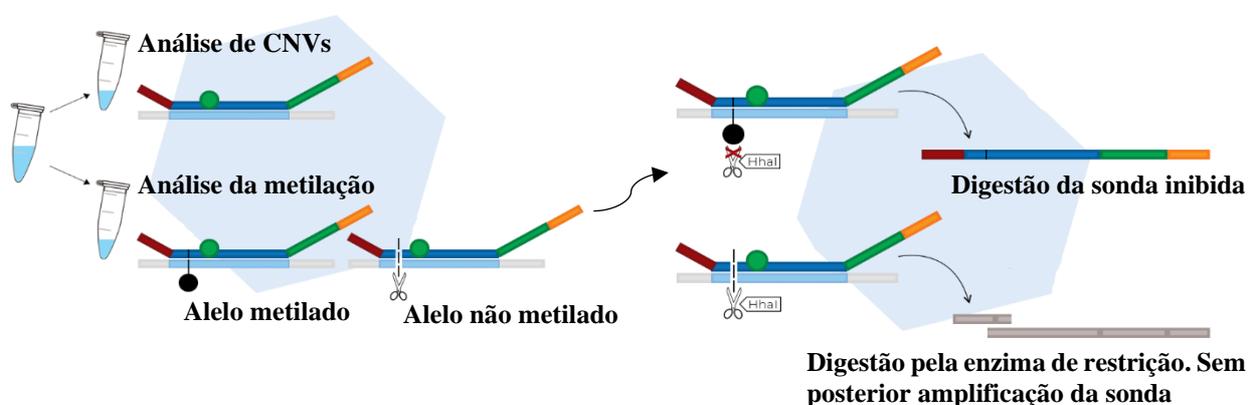


Figura 26 – Representação esquemática do procedimento de MS-MPLA e funcionamento da enzima de restrição. Adaptado de MRC-Holland®

Os resultados obtidos após eletroforese capilar são depois analisados no *Coffalyser* e é feita a comparação com as amostras de referência, permitindo inferir o estado de metilação das regiões em estudo.

C6 – ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (ACGH)

A análise cromossômica baseada em microarrays compreende dois tipos de plataformas, o *Array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH) e o SNParray (Brady e Vermeesch, 2012; Levy e Wapner, 2018). No aCGH é feita a comparação do genoma do doente com um genoma de referência, permitindo determinar as regiões que estão em deleção ou duplicação na amostra em estudo (Levy e Wapner, 2018). Atualmente, esta técnica é amplamente utilizada em casos de indivíduos com perturbação do desenvolvimento intelectual, perturbação do espectro autista e anomalias congénitas múltiplas (Miller et al., 2010). No diagnóstico pré-natal, o aCGH oferece um conjunto de vantagens relativamente à citogenética convencional, permitindo a deteção de desequilíbrios sub-microscópicos e variações no número de cópias (CNVs). A deteção destes rearranjos torna-se bastante relevante, uma vez que as microduplicações e microdeleções em regiões genómicas específicas podem estar associadas com diversas síndromes e patologias. No entanto, nem todas as alterações genómicas detetadas no aCGH são patogénicas, ou seja, nem todas estão associadas a manifestações clínicas. A maioria tem um significado clínico benigno enquanto, em algumas situações, ainda não foi encontrada uma associação entre a alteração e o seu efeito fenotípico, logo estas são classificadas como tendo um significado clínico desconhecido (Levy e Wapner, 2018).

A classificação de CNVs deve seguir um conjunto de parâmetros e estar de acordo com as guidelines internacionais para atribuir a classificação de CNV patogénica, provavelmente patogénica, de significado clínico desconhecido, provavelmente benigna ou benigna. Segundo Riggs et al., 2020, uma CNV pode ser classificado como:

Patogénica:

- As CNVs reportadas estão associadas a algum fenotípico clínico, ou seja, a região inclui genes relacionados com síndromes;
- A penetrância e a expressividade são conhecidas;
- A região não está descrita na base dados *Database of Genomic Variants* (DGV);

- A maioria das alterações visíveis no cariótipo estão incluídas nesta classificação.

Provavelmente patogénica:

- CNVs que podem estar associadas a determinadas patologias, cuja patogenicidade ainda não é totalmente conhecida;
- A CNV inclui genes com função relevante, podendo estar associada a um fenótipo clínico;
- Poucos casos descritos.

Significado clínico desconhecido:

- CNVs que incluem poucos genes, cujo efeito não é conhecido;
- CNVs com pouca informação nas bases de dados ou com informações contraditórias em diferentes publicações.

Provavelmente benigna:

- CNVs sem diferenças significativas entre controlos e os casos;
- CNVs frequentes na população, embora a sua frequência seja inferior a 1%.

Benigna:

- A CNV está descrita na DGV e é reconhecida como um polimorfismo;
- CNVs bem caracterizadas e referidas em múltiplas publicações, sendo consideradas benignas, ou seja, não estão associadas a nenhum fenótipo clínico.

Embora não detete rearranjos que não envolvam o nº de cópias, o aCGH pode eventualmente fornecer indicações para uma alteração cromossómica estrutural e contribuir para um estudo mais dirigido, permitindo a sua confirmação. Esta técnica possui a vantagem de analisar o complemento genético em grande quantidade e ainda a identificação dos genes envolvidos na alteração. Por este motivo, o aCGH tornou-se no teste de primeira linha para a resolução de casos com perturbação do desenvolvimento intelectual idiopática e vários defeitos congénitos (Theisen, 2008). Todavia, mosaicismos de baixa expressão, mutações pontuais, dissomia uniparental e alterações desequilibradas em regiões genómicas sem cobertura pelas sondas, não são detetadas pela técnica, tal como um *array* de elevada densidade pode detetar CNVs sem impacto clínico levando a

uma interpretação difícil, sendo estas consideradas as limitações da técnica (Brady e Vermeesch, 2012).

Por último, existe a questão financeira, dado que o aCGH acaba por ser mais dispendioso em comparação com outras técnicas. Para contornar as limitações relacionadas com a deteção de UPD, mosaicismo ou alterações de ploidia, o aCGH pode ser complementado pela deteção e análise de SNPs. Através da genotipagem de SNPs, é possível detetar as situações acima mencionadas (Brady e Vermeesch, 2012; Levy e Wapner, 2018).

As aplicações do aCGH vão muito mais além do diagnóstico pré e pós-natal, possuindo elevada relevância na oncologia. Determinadas alterações genéticas ocorrem com frequência em vários tipos de cancro e desempenham um papel importante na sua patogenicidade. A deteção destas alterações contribui para um diagnóstico mais eficaz e um melhor prognóstico (Pinkel e Albertson, 2005)

Em termos práticos, para a realização do aCGH, as amostras de DNA obtidas por diferentes métodos de extração devem ser marcadas utilizando fluorocromos que contêm fluorescência (Cy5 [vermelho] – amostras; Cy3 [verde] –referências), seguindo-se a hibridização em lâminas de vidro que contêm oligonucleótidos para as diversas regiões genómicas. A hibridização ocorre na presença da Cot-I para minimizar a hibridização inespecífica. Posteriormente, as lâminas são colocadas num *scanner* e no final é feita uma avaliação de diversos parâmetros para fins de controlo de qualidade. Caso as amostras passem neste controlo, é feita a análise e interpretação dos resultados num *software* denominado de *CytoGenomics* da *Agilent Technologies*® (Figura 27). Além das alterações encontradas, o *software* também fornece o rácio logarítmico das intensidades de fluorescências entre as amostras e as referências. Um valor de 0 ($\log_2 \frac{2}{2}$) indica um equilíbrio do nº de cópias. Porém, um valor de 0,58 ($\log_2 \frac{3}{2}$) ou -1 ($\log_2 \frac{1}{2}$) indica um ganho ou uma perda, respetivamente, em relação às referências (Allemeersch, et al., 2009). Na análise das CNVs recorre-se bases de dados internacionais para efetuar comparações com alterações genéticas já descritas. Inicialmente, exclui-se as alterações do controlo e procede-se à análise das restantes alterações. Em cada tem-se acesso direto ao *UCSC Genome Browser*. Esta base de dados permite adquirir informação sobre alterações já descritas (patogénicas, benignas e de significado clínico desconhecido); genes envolvidos na alteração; informações relativamente a CNVs em indivíduos saudáveis descritas na DGV (*Database of Genomic Variants*); síndromes relacionadas

com alterações na região de interesse, havendo uma ligação direta à base de dados OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*). Além disso, ainda é possível aceder à base de dados *Decipher*, que nos permite averiguar casos descritos com alterações semelhantes e as respetivas manifestações fenotípicas (Hastings et al., 2012).

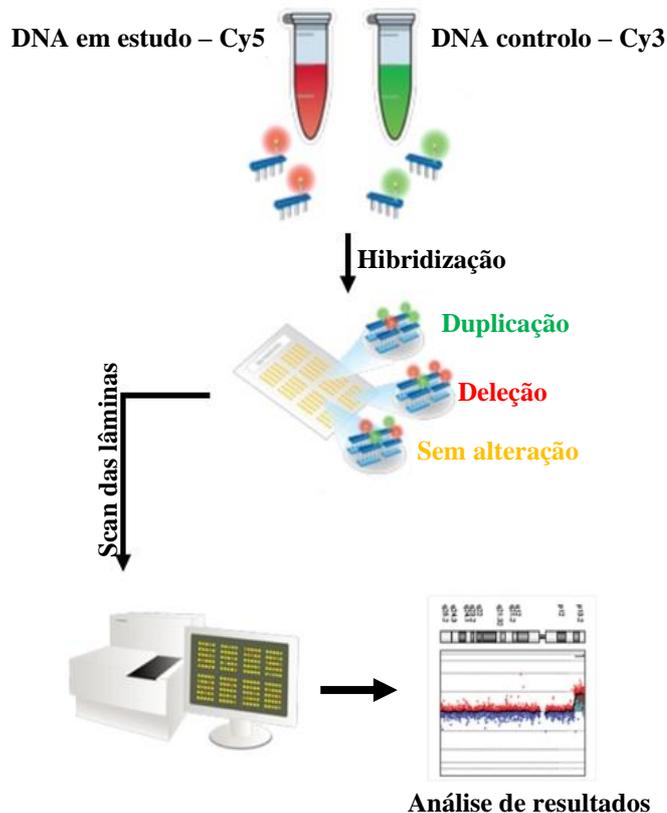


Figura 27 – Esquema representativo da metodologia do aCGH. Inicialmente o DNA das amostras e das referências é marcado diferencialmente com os fluorocromos Cy5 e Cy3, respetivamente. Posteriormente, as amostras são co-hibridizadas competitivamente numa lâmina de vidro que contém os oligonucleótidos. Em seguida é feito o scan das lâminas e por último a análise de resultados no *software*. Adaptado de *Agilent Technologies*®

Sempre que se considera uma alteração como patogénica, deve-se fazer uma pesquisa mais pormenorizada, por exemplo na *PubMed*, de outros casos clínicos semelhantes, com o intuito de reforçar e confirmar o resultado. Um relatório final deve conter uma referência bibliográfica de outros casos similares já descritos e estar de acordo com as guidelines internacionais (Silva et al., 2019).

C7 – NON-INVASIVE PRENATAL TESTING (NIPT)

O teste pré-natal não invasivo (NIPT) é um método de rastreio molecular que utiliza o DNA fetal livre em circulação materna e permite determinar o risco do feto para determinadas alterações cromossómicas, nomeadamente as aneuploidias dos

cromossomas 13, 18 e 21 (Curnow et al., 2019). Adicionalmente, este teste também permite a determinação do sexo fetal e, mediante o método utilizado, também pode fornecer informações relativamente a aneuploidias dos cromossomas sexuais. Este método de rastreio utiliza a sequenciação de nova geração (NGS), permitindo obter uma elevada especificidade e sensibilidade na deteção das aneuploidias mais comuns, quando comparado com os métodos de rastreio convencionais (Kim, 2015; Goldwaser e Klungman, 2017; Curnow et al., 2019). Esses métodos de rastreio baseados na quantificação de proteínas no soro materno e na avaliação marcadores ecográficos, apresentam um valor preditivo positivo baixo, o que leva à necessidade da realização de procedimentos invasivos tendo associado algum risco de perda fetal (Kim, 2015).

Através da utilização do NIPT é possível obter uma taxa de deteção superior a 99% para a trissomia 21, sendo que as restantes aneuploidias apresentam uma sensibilidade e especificidade ligeiramente inferior. Além disso, com um valor preditivo positivo superior a 50% e por isso dez vezes superior ao valor dos métodos de rastreio baseados em biomarcadores, permite reduzir o número de procedimentos invasivos (Goldwaser e Klungman, 2017; Curnow et al., 2019).

O DNA livre em circulação materna (cfDNA) corresponde a uma mistura do DNA materno e DNA fetal, com origem na placenta. Como o material genético não tem origem diretamente no feto, o complemento cromossómico da placenta pode não refletir a constituição cromossómica do feto devido ao mosaicismo confinado à placenta. Este facto pode dificultar a determinação do risco para as alterações que estão a ser analisadas e por isso é necessária a confirmação do resultado por métodos invasivos, como a amniocentese (Goldwaser e Klungman, 2017).

O DNA fetal livre em circulação corresponde a cerca de 3-13% do total do cfDNA e a sua deteção pode ser feita em fases muito precoces da gestação. O NIPT deve ser realizado preferencialmente numa fase inicial da gravidez (10-16 semanas) para permitir a realização de outros procedimentos que possibilitem a confirmação do resultado obtido (Kim, 2015). A fração fetal tem tendência a aumentar ao longo da gravidez e é um dos parâmetros mais importantes para o sucesso da análise e para a precisão do teste. Este valor pode ser afetado por diversos fatores maternos e fetais, nomeadamente pela idade gestacional, pelo índice de massa corporal, condição clínica e pela presença de aneuploidias que podem levar a uma restrição do crescimento intrauterino, diminuindo a fração fetal (Goldwaser e Klungman, 2017; Deng e Liu, 2022).

As plataformas utilizadas no rastreio das aneuploidias fetais baseiam-se em métodos de contagem e métodos de genotipagem utilizando SNPs (Kim, 2015; Goldwasser e Klungman, 2017). No LCG-FMUC realiza-se o segundo método, portanto a detecção das aneuploidias consiste na análise de centenas de SNPs presentes nos cromossomas de interesse.

Relativamente ao procedimento, após a chegada do sangue materno, é feito o isolamento do plasma para posterior extração e purificação do cfDNA. Para controlo de qualidade é feita a quantificação do DNA extraído num fluorímetro Qubit. A concentração das amostras não deve ser superior a 1ng/μL. Em seguida, é feita a preparação das bibliotecas através de um PCR *multiplex* para amplificar as regiões alvo. No final desta reação é feita uma purificação do produto de PCR utilizando a *beads* magnéticas. Depois realiza-se um PCR universal para incluir as sequências que vão permitir a distinção das grávidas após o *pooling*. Para motivos de controlo de qualidade, deve ser realizado um gel de agarose para confirmar o sucesso da reação. Se a amplificação tiver sido adequada, deverá observar-se uma banda com cerca de 218bp, que corresponde ao tamanho dos fragmentos amplificados (Figura 28). À semelhança do PCR anterior, no final deste também é realizada uma purificação com *beads* magnéticas. No entanto, a proporção de *beads* é inferior para permitir apenas a captura a dos fragmentos de interesse. Em seguida, quantifica-se o produto de PCR purificado, em duplicado, por fluorimetria. Neste caso o valor da concentração será a média das duas medições. Por último, é realizado o *pooling* onde deve ser adicionada uma quantidade equimolar de cada biblioteca. Depois são executadas diluições sucessivas do *pool* para uma molaridade de 5.2pM, que corresponde ao valor ótimo para a sequenciação por síntese na plataforma MiSeq (Illumina).

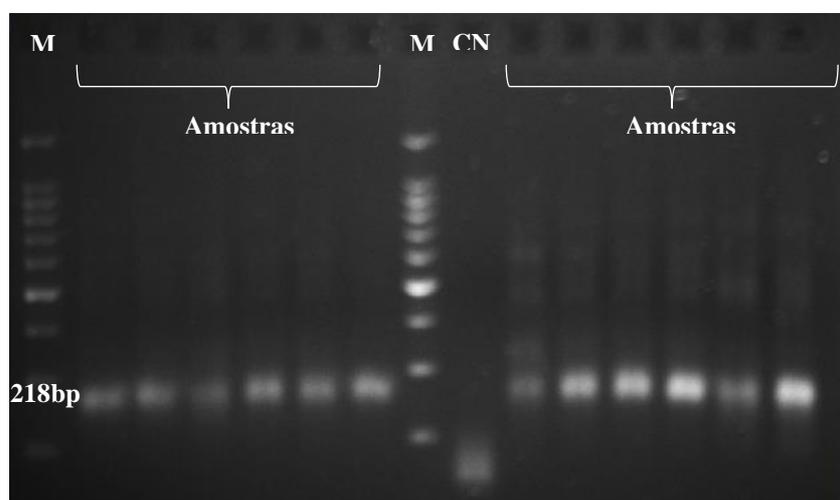


Figura 28 – Gel de agarose para controlo de qualidade da reação do PCR universal. As amostras devem apresentar uma banda com cerca de 218bp.

M – Marcador de peso molecular; CN - Controlo Negativo

No final da sequenciação é gerado um ficheiro FASTQ e realiza-se um controlo de qualidade através da análise dos vários parâmetros atribuídos pelo sequenciador. Para a análise dos dados recorre-se ao *Clarigo Reporter V2* (Figura 29). Um dos primeiros parâmetros a ser analisado é a fração fetal e caso este valor seja inferior a 3% o resultado é dado como inconclusivo. Deve também ser realizada uma análise detalhada dos parâmetros do processo, pois estes permitem avaliar a qualidade da sequenciação, a reprodutibilidade dos dados, a correlação entre as amostras, entre outros.

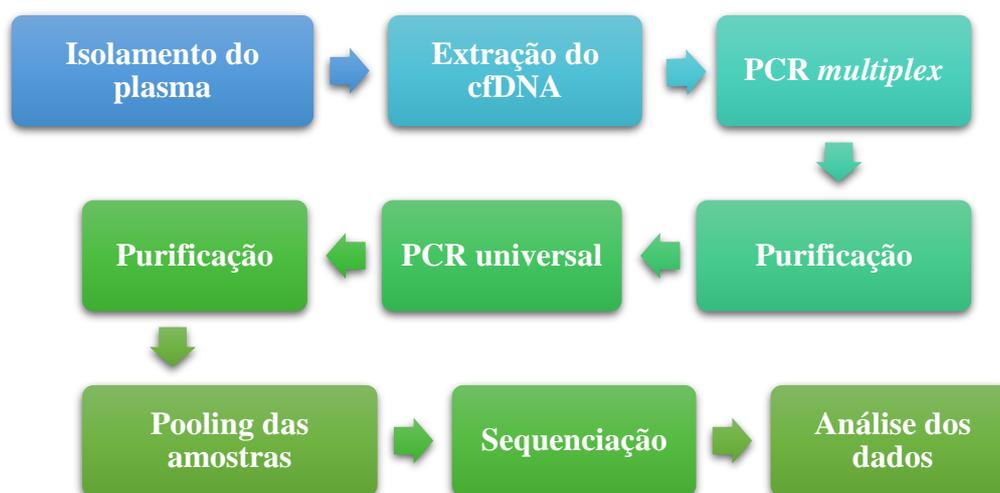


Figura 29 – Workflow geral do procedimento do teste pré-natal não invasivo. (NIPT)

Apesar das inúmeras vantagens do NIPT como um método de rastreio para as aneuploidias mais comuns, este método também apresenta algumas limitações. Em concreto, não é possível a deteção de rearranjos equilibrados, microduplicações ou microdeleções, aneuploidias parciais e situações de mosaico. Além disso, o NIPT baseado na análise de SNPs não pode ser aplicado em gravidezes múltiplas nem em gestações resultantes de procriação medicamente assistida recorrendo a dadoras de óvulos (Kim, 2015).

2.3.3 FASE PÓS-ANALÍTICA

A fase pós-analítica corresponde à fase final do procedimento laboratorial que culmina na obtenção de um resultado, estando dependente da qualidade das fases anteriores. Esta fase inclui a interpretação dos resultados, a sua comunicação e o fornecimento de informação relevante para o *follow-up* do doente (Sikaris, 2015). O armazenamento de toda a informação clínica e laboratorial também está contemplado na

fase pós-analítica. No entanto, a parte mais crítica e relevante está relacionada com uma correta análise e comunicação dos resultados, sempre tendo em conta as limitações das técnicas utilizadas e as *guidelines* internacionais existentes para emissão de resultados.

Existem vários aspetos que um laboratório certificado deve ter em conta para garantir a qualidade dos procedimentos, nomeadamente o tempo de resposta (Tabela II), que deve ser o mais curto possível, e as taxas de sucesso. Além disso, como foi referido anteriormente, o relatório de resultados deve seguir as recomendações internacionais estabelecidas para haver uma correta comunicação dos resultados de uma forma padronizada (Hastings et al, 2012; Schifman et al., 2014). Um relatório deve ser informativo, claro e objetivo, evitando fazer descrições muito extensas e com informação pouco relevante. Para isso, todos os relatórios devem estar de acordo com as normas estabelecidas pela ISO15189 e devem incluir uma secção com informações sobre o doente, a amostra e o hospital (Silva et al.,2019). No relatório devem constar dados relacionados com a indicação clínica, os testes requeridos, a metodologia, o resultado, escrito de acordo com o ISCN e a sua interpretação. Por último, deve ter as assinaturas dos técnicos envolvidos na análise, bem como a assinatura do diretor/a do laboratório. Além disso, deve fazer-se referência às limitações da técnica (Silva et al.,2019). No anexo II é possível observar um modelo de um relatório de resultados.

Tabela II – Tempos de resposta mediante o tipo de amostra biológica disponível para análise. Adaptado de Hastings et al, 2012

Tipo de amostra biológica	Tempo de resposta (dias)
Culturas de amniócitos ou vilosidades coriônicas	17
Culturas de linfócitos ou de tecido sólido	28
Culturas de medula óssea e tumores sólidos	12
Culturas de curta duração a partir de vilosidades coriônicas; culturas de linfócitos ou medula óssea (urgente)	7
Despiste das aneuploidias mais comuns por FISH ou QF-PCR	4
Amostras de pré-natal para aCGH	17
Amostras pós-natal para aCGH (probando)	60
Amostras pós-natal para aCGH (probando + progenitores)	90
Amostras dos progenitores após resultado de aCGH do probando	60

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*; **QF-PCR** – *Quantitative fluorescent PCR*; **aCGH** - *Array Comparative Genomic Hybridization*.

Em relação às taxas de sucesso, estas possuem um valor mínimo, que está dependente da amostra biológica, quase sempre igual ou superior a 90%. No caso de culturas de amniócitos, vilosidades coriônicas e amostras de sangue fetal ou sangue periférico em pós-natal a taxa de sucesso mínima deverá ser de 98%. Em amostras de fibroblastos, quer de origem fetal ou pós-natal, a taxa de sucesso mínima é de 60%, tal como para produtos de abortamento. Nestes casos a taxa de sucesso está dependente das condições da amostra. No caso da análise ser realizada por técnicas moleculares mais específicas como MLPA, FISH ou QF-PCR é expectável que a taxa de sucesso tenha um valor superior (Hastings et al, 2012).

No final, os resultados e o respetivo relatório são guardados na pasta do doente.

3. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE CASOS CLÍNICOS

Na área da citogenética foram acompanhados 8 casos desde a cultura celular até à análise e elaboração do relatório. Do total de casos, 5 eram de pré-natal e 3 de pós-natal. Nos casos de pré-natal, 1 não apresentava qualquer alteração visível pela citogenética e em 4 foram encontradas alterações cromossômicas numéricas ou estruturais. Em concreto, trissomias do cromossoma 18 e 21 e ainda uma translocação robertsoniana entre os cromossomas 14 e 22. No último caso de pré-natal que vai ser discutido em seguida, realizou-se a técnica de FISH (caso 4) e foi detetada uma alteração cromossômica estrutural. Nos casos de diagnóstico pós-natal também não foi encontrada qualquer alteração cromossômica.

Durante o estágio também foram atribuídos 3 casos clínicos (Tabela III) como forma de avaliação da capacidade crítica e de análise adquirida na área da citogenética. De todos os casos, estes vão ser discutidos em seguida.

Na área da genética molecular/genómica foram acompanhados diversos casos que foram analisados mediante a técnica molecular mais adequada (Tabela III). Alguns vão ser discutidos em seguida.

Em todos os casos foram elaborados os relatórios de resultados segundo as *guidelines* para diagnóstico pré e pós-natal.

Tabela III – Resumo dos casos clínicos com referência à indicação clínica e técnicas utilizadas.

Casos	Indicação clínica	Técnicas realizadas
Caso 1	Feto com anomalias ecográficas às 19 semanas e 3 dias.	Estudo do cariótipo e QF-PCR
Caso 2	Feto com rastreio combinado= 1:10 e estudo anterior por QF-PCR que detetou uma trissomia 21.	Estudo do cariótipo e QF-PCR
Caso 3	Feto com suspeita de mosaico 45,X/46,XY detetado na biópsia do trofoblasto.	Estudo do cariótipo
Caso 4	Feto com cardiopatia, possível agenesia/hipoplasia da nuca e <i>truncus</i> arteriosos tipo I.	MLPA e FISH
Caso 5	Feto cuja progenitora é portadora de uma pré-mutação detetada em estudos anteriores das repetições do trinucleótido CGG.	Estudos das repetições do trinucleótido CGG por PCR e despiste de contaminação materna
Caso 6	Feto com anomalias cardíacas congénitas, nomeadamente transposição dos grandes vasos às 20 semanas e 4 dias.	aCGH
Caso 7	Bebé síndromico com suspeita de Rubinstein-Taybi.	aCGH e estudo do cariótipo
Caso 8	Feto com restrição do crescimento intrauterino e perímetro abdominal inferior ao normal para a idade gestacional.	aCGH e MS-MLPA
Caso 9	Feto com rastreio combinado para trissomia 21 de 1/240.	NIPT

QF-PCR – *Quantitative fluorescent PCR*; **MLPA** - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; **FISH** – *Fluorescence in situ hybridization*; **aCGH** - *Array Comparative Genomic Hybridization*; **MS-MLPA** - *Methylation Specific MLPA*; **NIPT** – *Noninvasive prenatal testing*

3.1 CASO CLÍNICO 1

Feto com anomalias ecográficas às 19 semanas e 3 dias: fenda labial, intestino ecogénico e hidronefrose moderada.

Neste caso foi requerido um estudo do cariótipo, havendo o estudo anterior por QF-PCR, cujo resultado não indicava a presença de aneuploidias mais comuns.

A metodologia consistiu numa cultura de amniócitos para a obtenção e estudo de metafases. Seguindo-se a bandagem GTL como método de coloração para a análise das bandas cromossómicas.

A avaliação cromossómica de 27 metafases de duas linhas celulares, com uma resolução de 400 bandas, revelou um cariótipo do sexo feminino, constituído por 46 cromossomas (46, XX -Figura 30). Portanto, não foi detetada nenhuma anomalia cromossómica numérica ou estrutural nesta amostra de líquido amniótico. Este resultado está de acordo com aquele obtido por QF-PCR. Podem ainda ser realizados outros estudos adicionais, como aCGH, para esclarecer o fenótipo detetado ecograficamente.

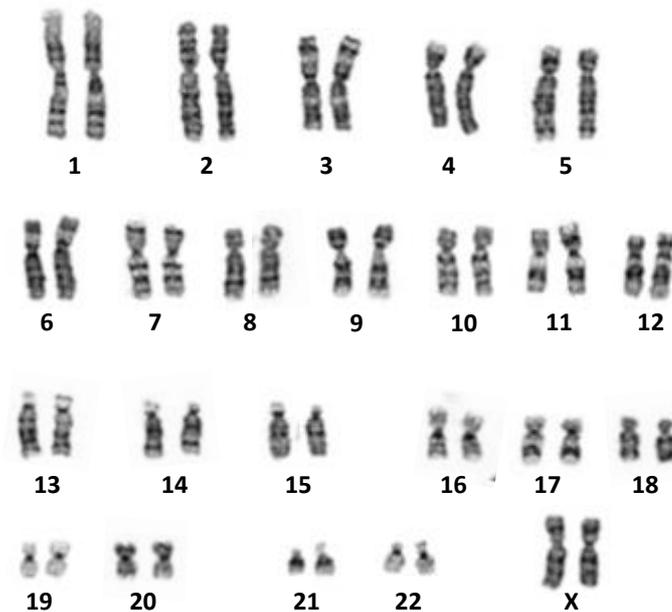


Figura 30 – Cariograma representativo do caso 1 (46,XX). Pela análise citogenética não foi possível encontrar nenhuma alteração cromossómica numérica ou estrutural.

3.2 CASO CLÍNICO 2

Feto com rastreio combinado = 1:10 e estudo anterior por QF-PCR, que detetou uma trissomia 21.

Foi realizado o estudo cromossômico para averiguar se se tratava de uma trissomia 21 livre ou resultante da segregação de uma translocação robertsoniana ou uma translocação recíproca durante a meiose.

Após uma cultura de vilosidades coriônicas para a obtenção e estudo de metafases, utilizou-se bandagem GTL como método de coloração para a análise das bandas cromossômicas.

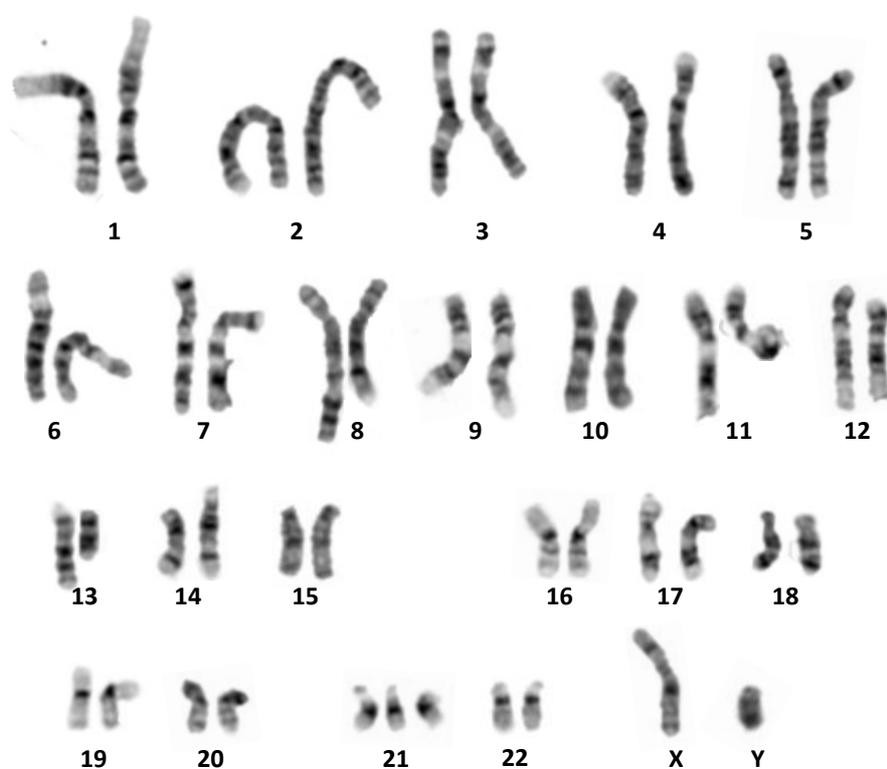


Figura 31 – Cariograma representativo do caso 2 (47,XY,t(8;13)(q24.1;q14),+21) . É possível observar a existência de um cromossoma 21 suprenumerário e uma translocação aparentemente equilibrada entre os cromossomas 8 e 13.

A avaliação cromossômica de 19 metafases de duas linhas celulares, com uma resolução de 400 bandas, revelou um cariótipo do sexo masculino, constituído por 47 cromossomas, apresentando três cópias do cromossoma 21. Além disso, verificou-se a presença de uma translocação recíproca aparentemente equilibrada envolvendo os braços longos dos cromossomas 8 e 13, cujos pontos de quebra estão localizados em 8q24.1 e 13q14 (Figura 31).

A análise citogenética revelou a presença de um cromossoma 21 supranumerário, sendo compatível com a síndrome de Down e, por isso, confirma-se o resultado obtido por QF-PCR. Por se tratar de uma alteração cromossômica numérica, o risco de recorrência é aproximadamente 1%. A análise revelou ainda a presença de uma translocação recíproca, aparentemente equilibrada, entre os cromossomas 8 e 13. Para averiguar a origem desta alteração devem realizar-se estudos citogenéticos nos progenitores. Este resultado e as suas implicações devem ser discutidas numa consulta de aconselhamento genético e poderá ser oferecido diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

3.3 CASO CLÍNICO 3

Feto com suspeita de mosaico 45,X/46,XY detetado na biópsia do trofoblasto.

Neste caso foi realizada uma amniocentese para confirmação do mosaicismo fetal. A metodologia consistiu numa cultura de amniócitos para a obtenção e estudo de metafases. Seguindo-se a bandagem GTL como método de coloração para a análise das bandas cromossómicas.

A avaliação cromossómica de 28 metafases de duas linhas celulares, com uma resolução de 400 bandas, revelou uma situação de mosaico, onde 50% das células tinham uma constituição cromossómica masculina e as restantes apresentavam monossomia do cromossoma X (Figura 32).

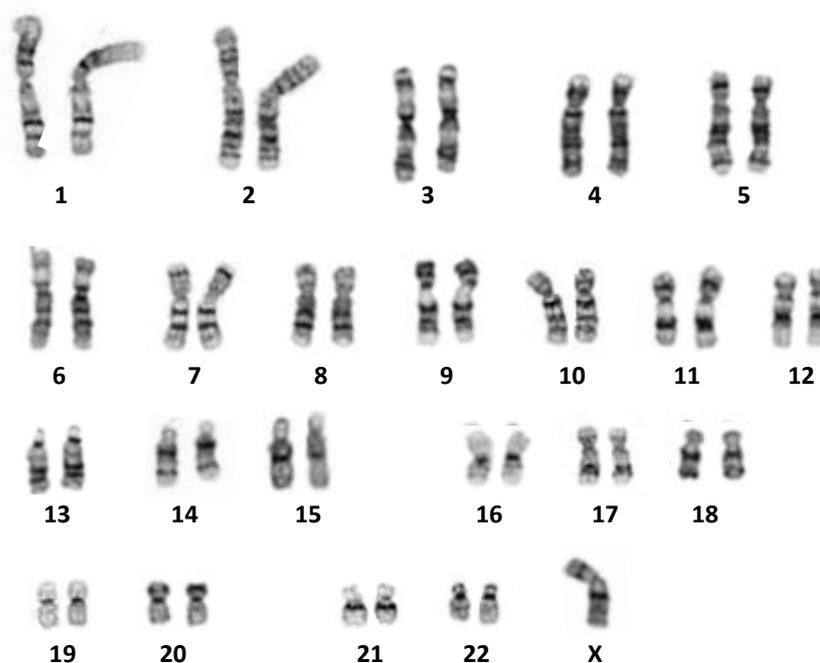


Figura 32 – Cariograma representativo de uma das linhas celulares encontradas no caso 3 (mos 45,X[14]/46,XY[14]). Neste cariógrama está representado a ausência do cromossoma Y num feto com suspeita de mosaico 45,X/46,XY.

A análise citogenética revelou uma situação de mosaico nesta amostra de líquido amniótico e por isso confirma-se o mosaicismo fetal. Segundo o que está descrito na literatura, o espetro fenotípico desta alteração é bastante amplo. Apesar disso, em cerca de 90%-95% dos casos há um desenvolvimento fenotípico tipicamente masculino, podendo existir problemas de fertilidade (Chang et al., 1990; Gardner e Amor 2018). No entanto, existem casos em que os indivíduos demonstram ambiguidade genital e outros manifestam um fenótipo feminino com manifestações da síndrome de Turner (Gardner e

Amor, 2018). Por se tratar de uma situação de mosaico não é possível prever a sua distribuição nos diferentes tecidos. Este resultado e as suas implicações devem ser discutidas numa consulta de aconselhamento genético.

3.4 CASO CLÍNICO 4

Feto com cardiopatia, possível agenesia/hipoplasia da nuca e *truncus* arteriosos tipo I.

Em estudos anteriores foi detetada uma deleção em 22q11.2 por MLPA (Figura 33). Neste sentido, foi realizada a confirmação por FISH para a síndrome de microdeleção – DiGeorge (22q11.2).

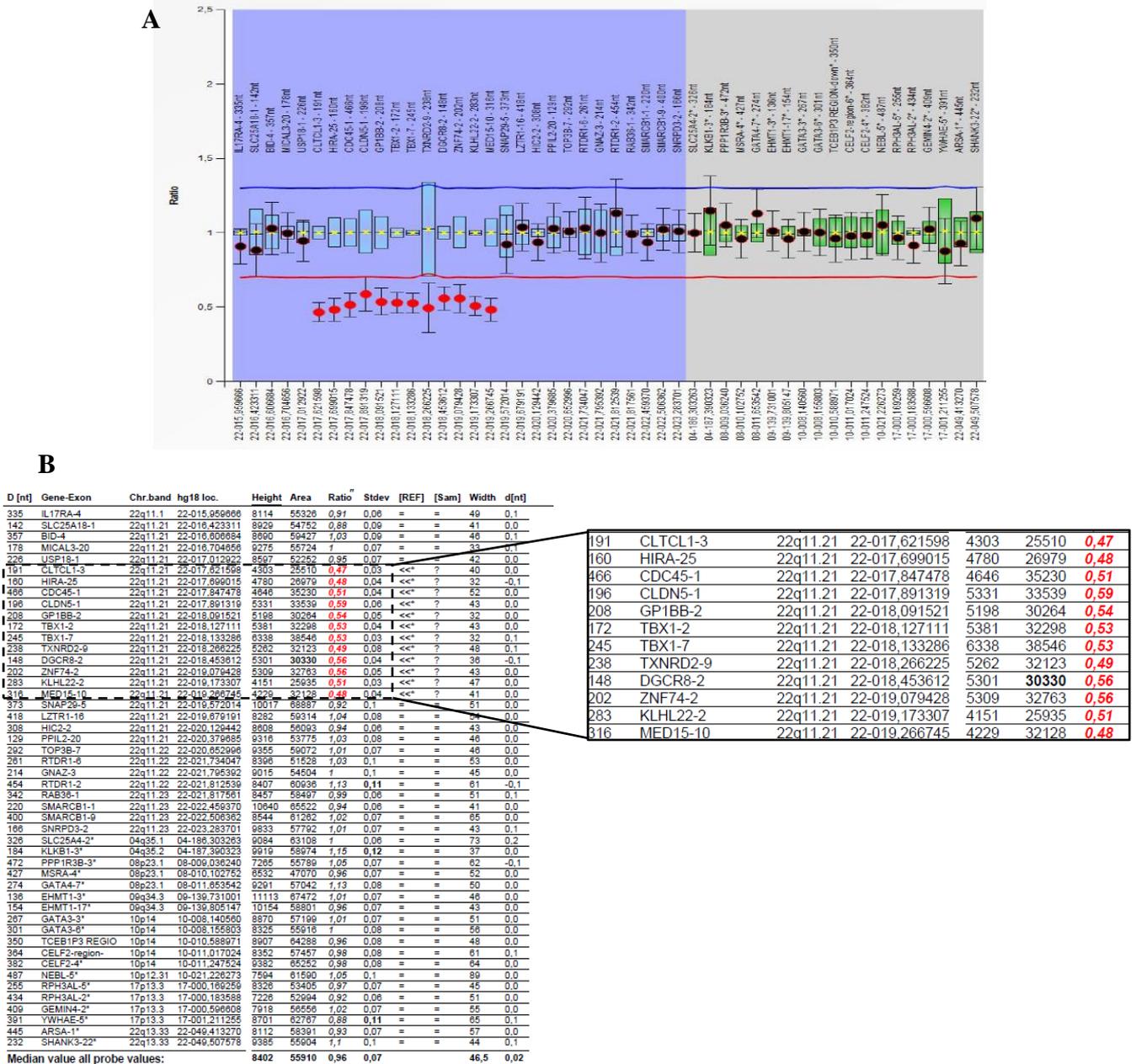


Figura 33 – Resultado da técnica de MLPA. Representação esquemática do rácio das sondas da amostra conforme exibido pelo software (A). Resultado detalhado que inclui a localização e os rácios das diferentes sondas nesta amostra (B). É possível observar a região deletada no cromossoma 22 nesta amostra de líquido amniótico (rácio < 0,7 indica uma deleção em heterozigotia).

rsa 22q11.21(CLTCL1,HIRA,CDC45L,CLDN5,GP1BB,TBX1,TXNRD2,DGCR8,ZNF74,KLHL22,MED15)x1

A análise anterior por MLPA com sondas do painel P250, revelou uma deleção em heterozigotia na região 22q11.21, com uma extensão mínima de 2Mb, envolvendo os genes *CLTCL1*, *HIRA*, *CDC45L*, *CLDN5*, *GP1BB*, *TBX1*, *TXNRD2*, *DGCR8*, *ZNF74*, *KLHL22* e *MED15*.

Para confirmação da alteração utilizou-se a técnica de *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) em células de cultura de líquido amniótico, com a sonda de sequência única N25 da Cytocell® Aquarius, dirigida para o cromossoma 22q11.2, associada à síndrome de DiGeorge. Esta sonda hibridiza em duas regiões do cromossoma 22, representadas na figura 34A. As duas sequências únicas servem de controlo uma à outra e por isso esta sonda permite a detecção de deleções na região crítica da síndrome de DiGeorge e na região terminal do cromossoma 22.

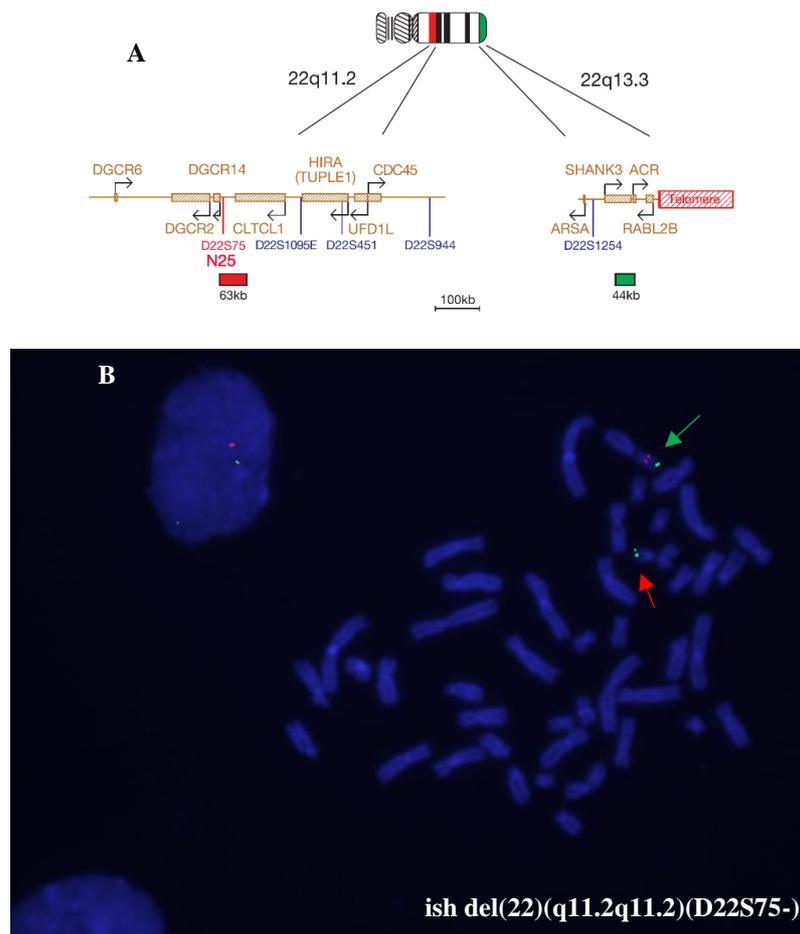


Figura 34 – (A) Locais de hibridização da sonda N25 da Cytocell®. Observação ao microscópio de fluorescência de uma metafase e uma interfase pela técnica de FISH. (B) Na imagem é possível identificar os dois cromossomas 22, um com deleção da região 22q11.2 (seta vermelha) e outro com os dois sinais de hibridização (seta verde). O sinal verde serve de controlo interno e corresponde ao *locus* N85A3.

O estudo da técnica de FISH, nas metafases e interfases analisadas, revelou uma deleção na região 22q11.2, compatível com a síndrome de DiGeorge (Figura 34B), confirmando o resultado obtido pela técnica de MLPA.

Após estudo dos progenitores pela mesma técnica, que revelou um resultado normal, foi possível concluir que a alteração no feto era *de novo* (Figura 35). Neste caso, pode ainda ser realizado um estudo citogenético (convencional e/ou molecular) para excluir a existência de um possível rearranjo equilibrado nos progenitores que possa estar na origem do desequilíbrio genómico observado no feto.

Este resultado e as suas implicações devem ser discutidas numa consulta de aconselhamento genético.

Mãe



Pai

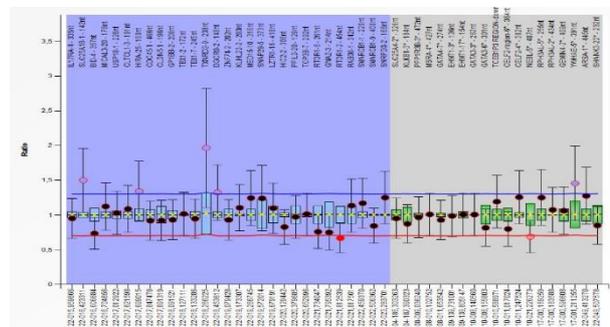


Figura 35 –Representação esquemática do rácio das sondas conforme exibido pelo *software*, nos progenitores. É possível concluir que nenhum dos progenitores é portador da alteração encontrada no feto.

3.5 CASO CLÍNICO 5

Feto cuja progenitora é portadora de uma pré-mutação ($55 \leq n^\circ$ de repetições CGG < 200) detetada em estudos anteriores das repetições do trinucleótido CGG (Figura 36A). Além disso, o probando tem uma irmã que herdou a pré-mutação (Figura 36B), detetada também em estudos anteriores.

Uma vez que existe o risco de expansão do alelo materno, por apresentar alguma instabilidade, foi requerido o estudo do número de repetições do trinucleótido CGG no feto, através de uma biópsia das vilosidades coriônicas.

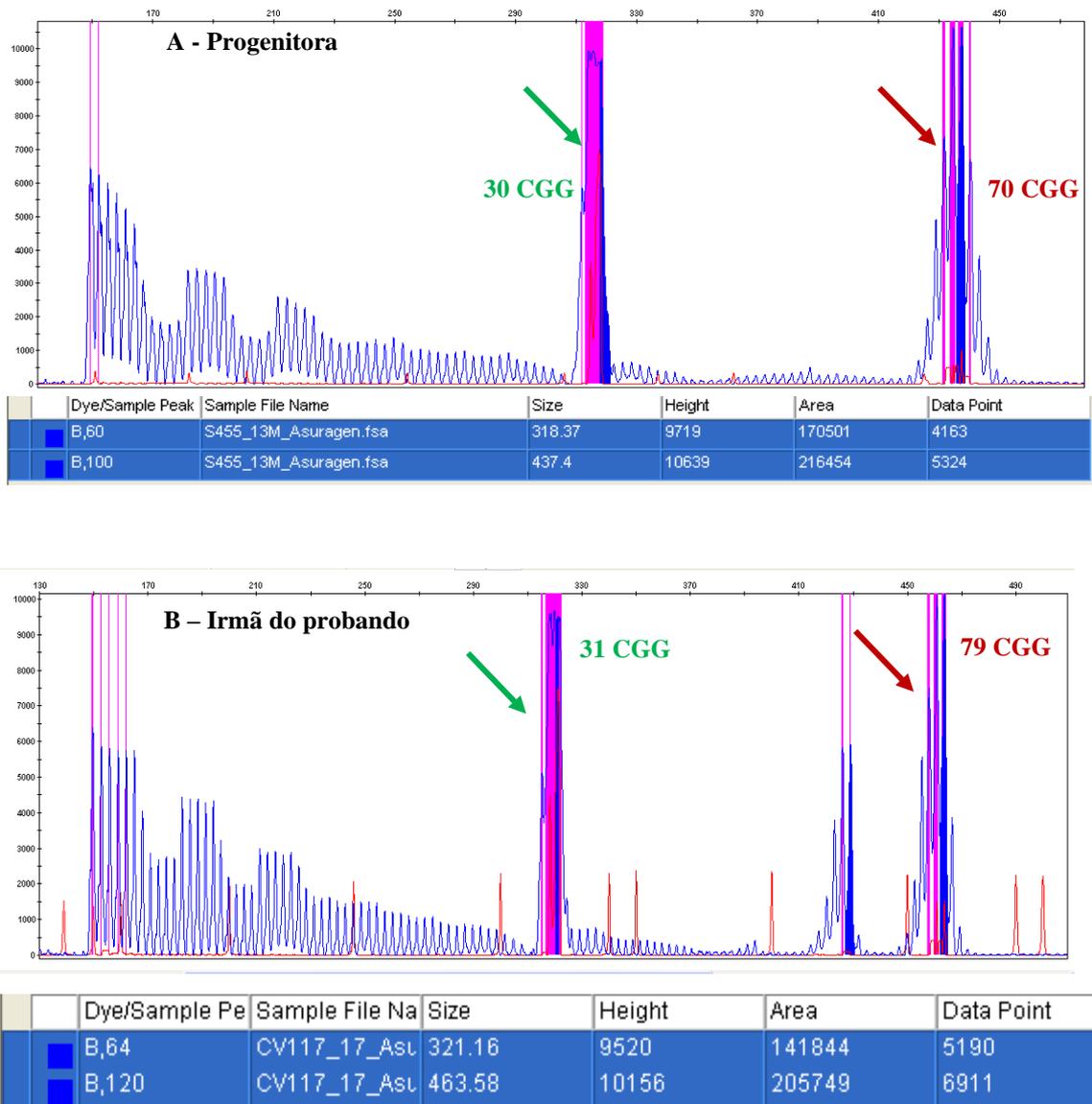


Figura 36 – Eletroferogramas obtido após TP-PCR. É possível verificar que, tanto a progenitora do probando (A) como a sua irmã (B) são portadoras de um alelo normal (seta verde; 30 e 31 repetições CGG, respectivamente) e um alelo com pré-mutação (seta vermelha; 70 e 79 repetições CGG, respectivamente).

Neste caso, o feto tem 50% de probabilidade de herdar o alelo materno normal e 50% de herdar o alelo com pré-mutação, que pode sofrer uma expansão para mutação completa.

Dado que a mutação completa está associada à síndrome de X-frágil, sendo esta caracterizada por existir um déficit cognitivo, distúrbios comportamentais e alguns dismorfismos, é importante a avaliação pré-natal do nº de repetições CGG. Além disso, mesmo que o feto herde o alelo com a pré-mutação, existe uma relação com a síndrome de tremor/ataxia nos homens e insuficiência ovárica precoce nas mulheres (Biancalana et al.,2015).

Para esta análise recorreu-se então ao *Triplet Repeat Primed* PCR (TP-PCR) para analisar o número de repetições CGG do gene *FMRI*.

A análise do resultado obtido permite verificar que se trata de um feto do sexo masculino, portador de um alelo normal para o gene *FMRI* (Figura 36). Além disso, existe suspeita de uma contaminação materna residual correspondente ao alelo materno com a pré-mutação.

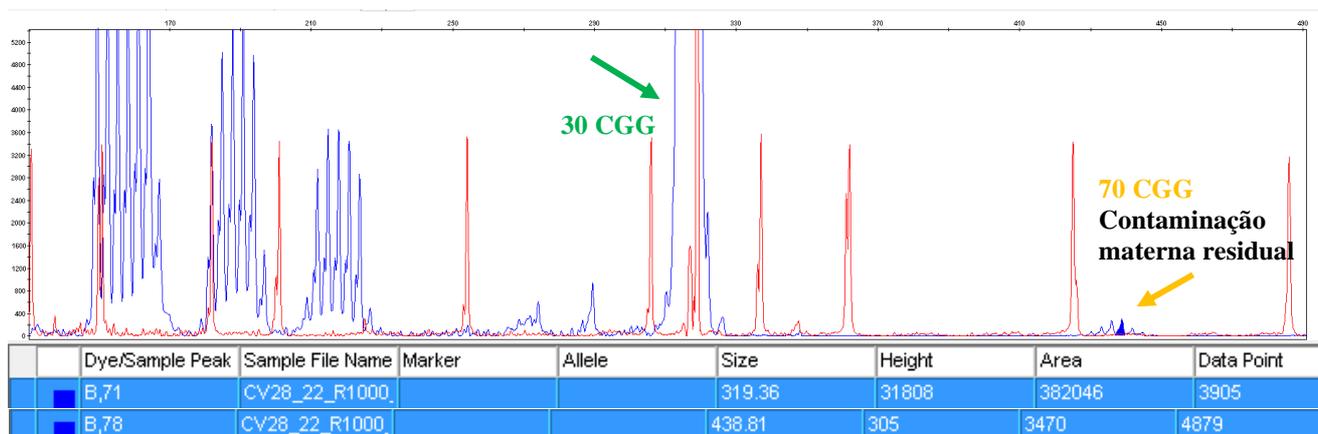


Figura 37 – Eletroferograma obtido após TP-PCR (c.-129CGG[30]). É possível verificar que o feto é portador de um alelo normal (seta verde). Além disso, observa-se uma contaminação materna residual (seta amarela).

A presença de contaminação materna foi posteriormente confirmada por PCR, utilizando o *kit Identifiler™*, utilizando DNA obtido a partir de uma amostra de sangue materno e da biópsia do trofoblasto. Depois foi efetuada a comparação entre os perfis obtidos após eletroforese capilar.

Após análise dos diferentes marcadores confirmou-se a presença de contaminação materna residual nesta amostra de vilosidades coriônicas. Na figura 38 está representado um exemplo do resultado para um dos marcadores.

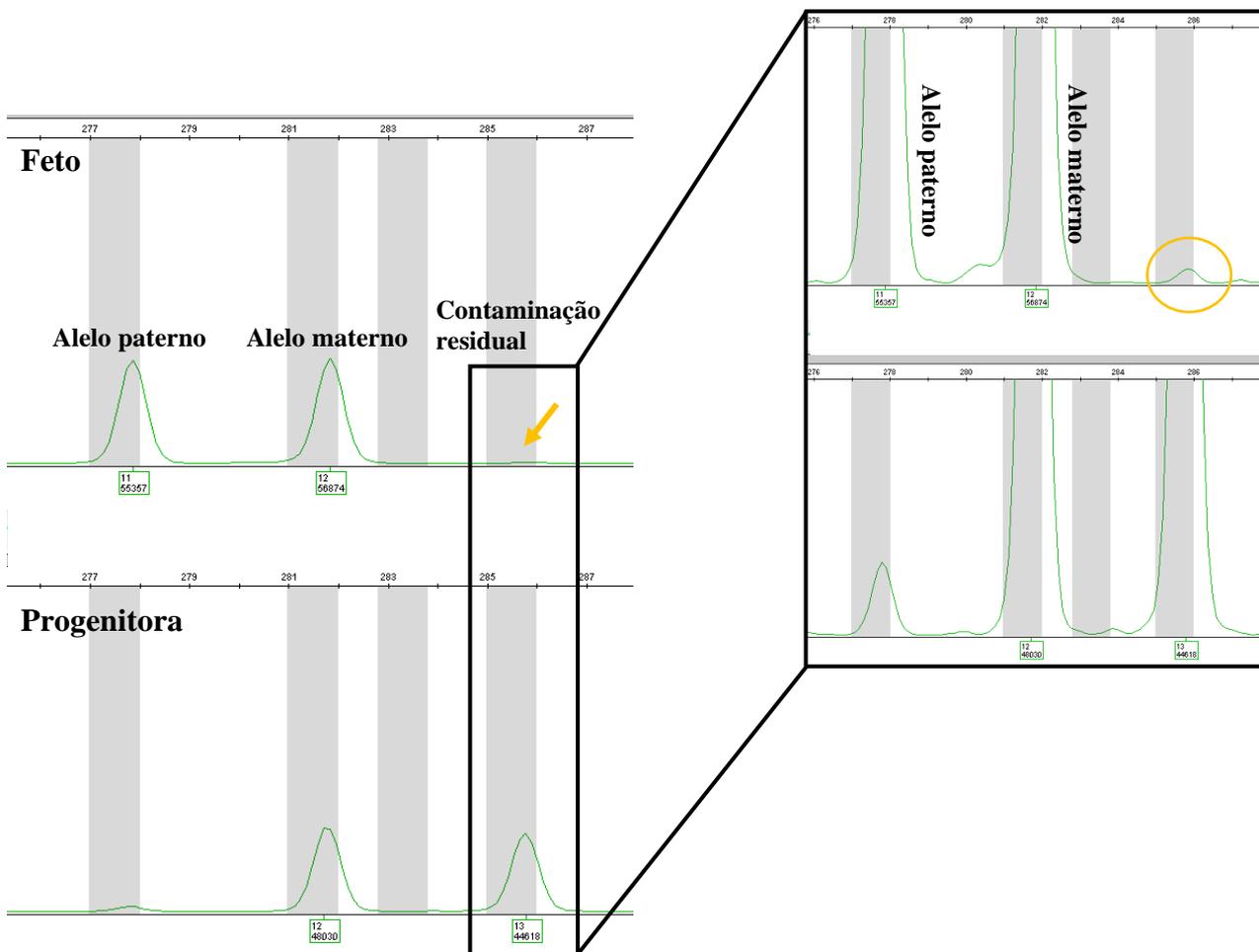


Figura 38 – Resultado do despiste de contaminação materna para um dos marcadores analisados. A progenitora é heterozigótica para este marcador e na primeira figura é possível observar um ligeiro aumento do sinal correspondente ao segundo alelo materno. A presença de contaminação fica mais evidente na segunda figura após ampliação. No entanto, verifica-se que é apenas uma contaminação residual.

3.6 CASO CLÍNICO 6

Feto com anomalias cardíacas congênitas, nomeadamente transposição dos grandes vasos às 20 semanas e 4 dias.

Neste caso foi requerido um estudo por oligoarray-CGH com 180K para esclarecimento do fenótipo apresentado.

A análise por aCGH-180K, utilizando um filtro de análise recomendado para diagnóstico pré-natal, em que são interpretadas as variantes com dimensão superior a 400kb, revelou um desequilíbrio genómico. Foi detetada uma deleção em homozigotia no braço longo do cromossoma 22(q11.21) de aproximadamente 115kb, entre as posições 18,894,835 e 19,010,508 (Figura 39A). Esta alteração envolve seis genes, três reportados na base de dados OMIM (601279-*DGCR6*, 606810-*PRODH*, 618040-*DGCR5*). O gene *PRODH* está ainda reportado no OMIM Morbid Map, existindo uma associação com uma suscetibilidade para esquizofrenia e hiperprolinemia tipo 1 (Figura 39B).

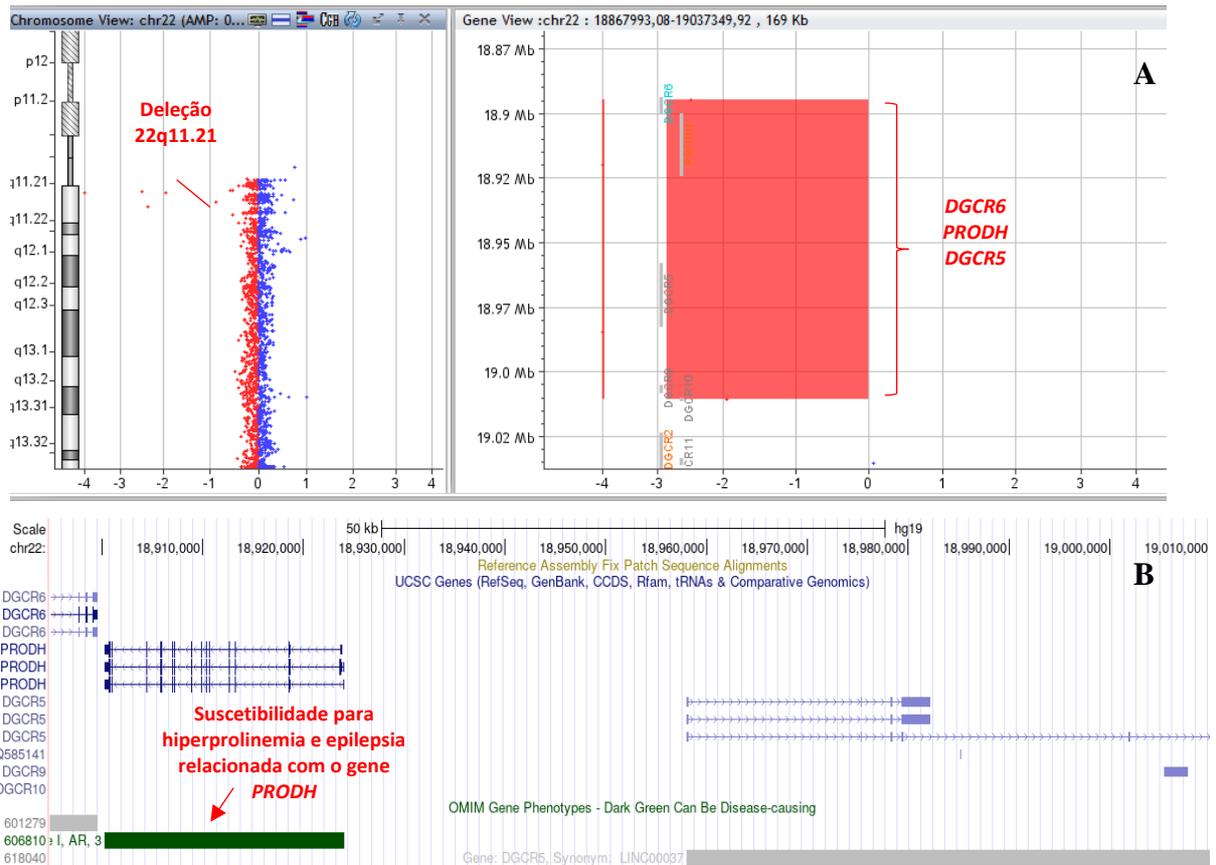


Figura 39 – Resultado do aCGH para o cromossoma 22 (arr[GRCh37] 22q11.21(18894835_19010508)x0 mat pat) (A) Um log ratio de -2,846 é indicativo de uma deleção homozigótica. Análise da alteração encontrada recorrendo à base de dados *Genome Browser* (B).

Os pontos de quebra localizam-se no segundo intrão do gene *DGCR6*, no quinto intrão do gene *DGCR5* e no primeiro exão do gene não codificante *DGCR10*. Na base de dados ClinGen, estão reportadas CNVs em deleção sobreponíveis e ainda algumas sobreponíveis e outras menores descritas na base de dados DGV. Na base de dados Decipher, estão descritos casos com deleções semelhantes que apresentam déficit intelectual, atraso global de desenvolvimento, classificadas como provavelmente benignas e de significado clínico desconhecido. Está reportado um doente com uma deleção semelhante em 22(q11.21), em homozigotia, envolvendo o gene *PRODH*, com hiperprolinemia tipo 1 severa, atraso de desenvolvimento psicomotor severo e epilepsia (Jacquet et al., 2003). Além disso, deleções envolvendo os genes *DGCR6* e *PRODH* foram identificadas em doentes com defeitos cardíacos (Gao et al., 2015).

Para averiguar a origem desta alteração, foi realizado um aCGH dirigido nos progenitores (Figura 40). Após esta análise, concluiu-se que deleção em homozigotia foi herdada de ambos os progenitores heterozigóticos para a deleção.

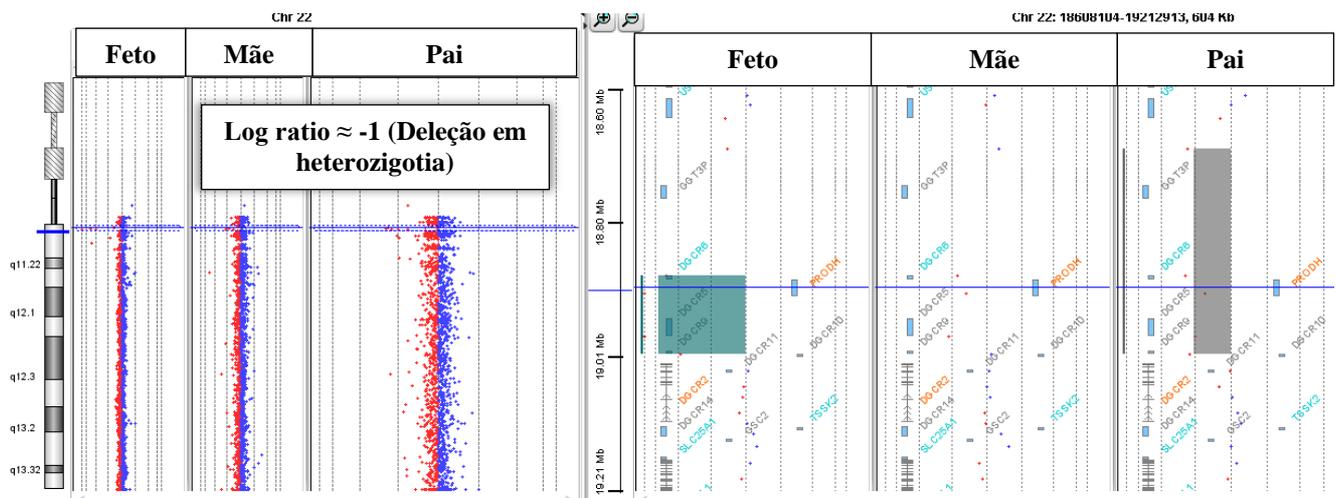


Figura 40 – Resultado do aCGH dirigido nos progenitores. Um log ratio de ≈ -1 é indicativo de uma deleção em heterozigotia em ambos os progenitores.

Esta deleção provavelmente patogénica associada a uma suscetibilidade para epilepsia e hiperprolinemia tipo 1 pode ter consequências fenotípicas graves para o feto. A hiperprolinemia tipo I é uma doença metabólica rara que resulta de defeitos na prolina desidrogenase, podendo levar a manifestações neurológicas (Jacquet et al., 2003). Estes resultados e as suas implicações devem ser discutidos numa consulta de aconselhamento genético e poderá ser oferecido diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

3.7 CASO CLÍNICO 7

Bebé síndrômico com suspeita de Rubinstein-Taybi.

Foi realizado um estudo por oligoarray-CGH com 180K para esclarecimento do fenótipo apresentado.

A análise por aCGH-180K detetou uma deleção em heterozigotia no braço longo do cromossoma 2 (q37.3) de aproximadamente 4.1Mb, entre as posições nucleotídicas 238,868,829 e 243,028,452, cujos pontos de quebra localizam-se numa região intergênica (Figura 41A). Esta alteração envolve 39 genes descritos na base de dados OMIM e 9 genes reportados no OMIM Morbid Map (*PER2* – 603426; *TRAF3IP1* – 607380; *TWIST2* – 607556; *NDUFA10* – 603835; *CAPN10* – 605286; *KIF1A* – 601255; *AGXT* – 604285; *D2HGDH* – 609186; *PDCD1* – 600244) (Figura 41B).

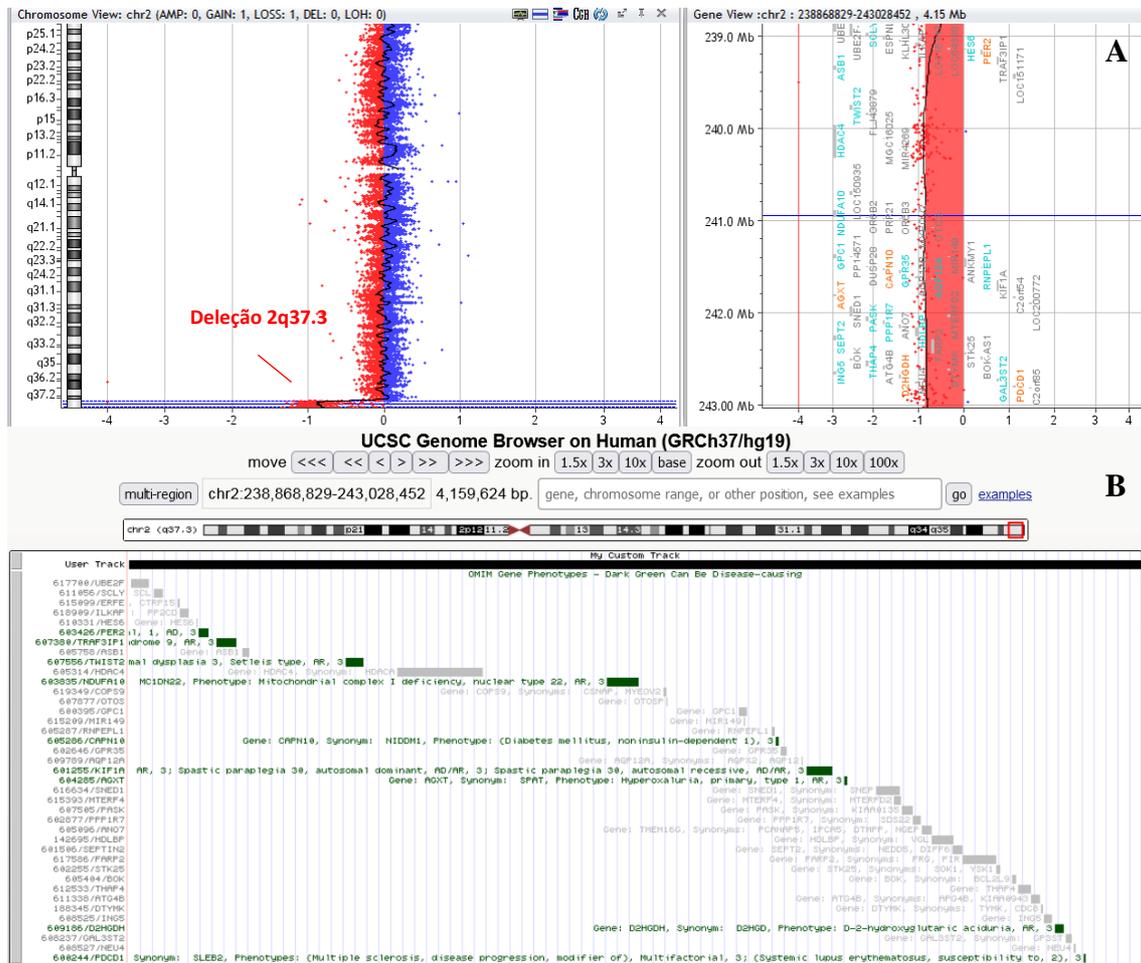


Figura 41 – Resultado do aCGH para o cromossoma 2 (arr[GRCh37]2q37.3(23886829_243028452)×1). Um log ratio de -0,836 é indicativo de uma deleção em heterozigotia (A). Análise da alteração encontrada recorrendo à base de dados *Genome Browser* (B).

Existem casos descritos na base de dados Decipher que apresentam uma deleção semelhante e outras na mesma região, mas com uma extensão menor, classificadas como patogénicas, provavelmente patogénicas e de significado clínico desconhecido, que manifestam atraso global do desenvolvimento, hipotonia e malformações. Outros manifestam défice cognitivo e baixa estatura.

Foi também detetada uma duplicação de significado clínico desconhecido no braço longo do cromossoma 15 (q13.3) de 520kb, entre as posições nucleotídicas 32,098,670 e 32,618,383 (Figura 43A). Esta alteração envolve dois genes descritos na base de dados OMIM (*OTUD7A* – 612021; *CHRNA7* – 118511). O ponto de quebra inicial está localizado no exão 1 do gene *OTUD7A* e o ponto de quebra final localiza-se numa região intergénica (Figura 43B).

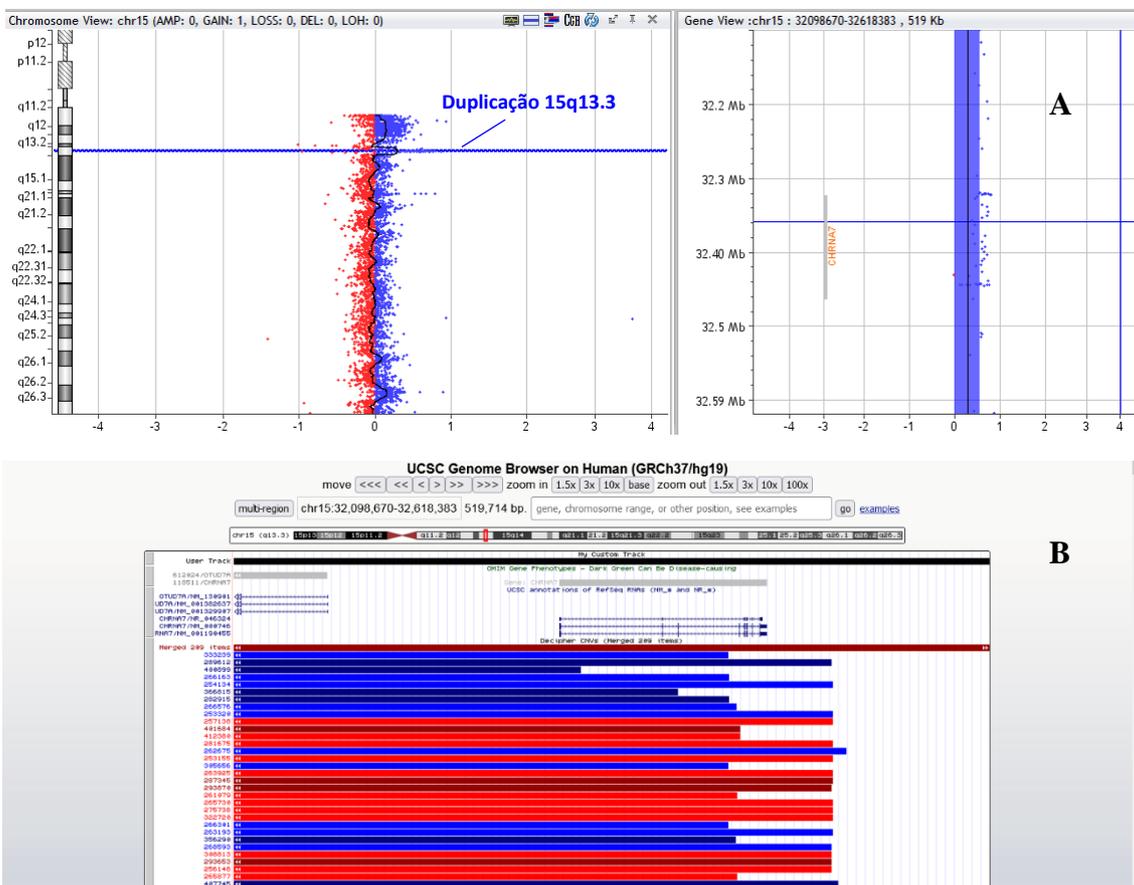


Figura 43 – Resultado do aCGH para o cromossoma 15 (15q13.3(32098670_32618383) ×3). Um log ratio de 0,541 é indicativo de uma duplicação (A). Análise da alteração encontrada recorrendo à base de dados *Genome Browser* (B).

Na ClinGen estão reportadas várias CNVs em duplicação sobreponíveis, classificadas como de significado clínico incerto, benignas e provavelmente benignas. Existem casos descritos na base de dados Decipher que apresentam uma deleção

semelhante, classificadas como de significado clínico desconhecido e algumas como benignas ou provavelmente benignas que manifestam déficit cognitivo, atraso global do desenvolvimento, perturbação do espectro autista (366506; 399214; 283967). Segundo Gillentine et al., 2017, o impacto no fenótipo de duplicações envolvendo o gene *CHRNA7* ainda é pouco compreendido, pois são encontradas tanto em indivíduos saudáveis como em doentes. No entanto, duplicações deste gene parecem estar relacionadas com déficit cognitivo, perturbação do espectro autista e hiperatividade. Também estão descritas CNVs em duplicação na DGV

Neste caso existe então uma trissomia parcial do cromossoma 14 e uma monossomia do cromossoma 2. As duas alterações detetadas nestes cromossomas são sugestivas de uma alteração cromossômica estrutural, nomeadamente uma translocação envolvendo o cromossoma 2 e 14. Assim foram realizados estudos citogenéticos para confirmação da alteração (Figura 44).

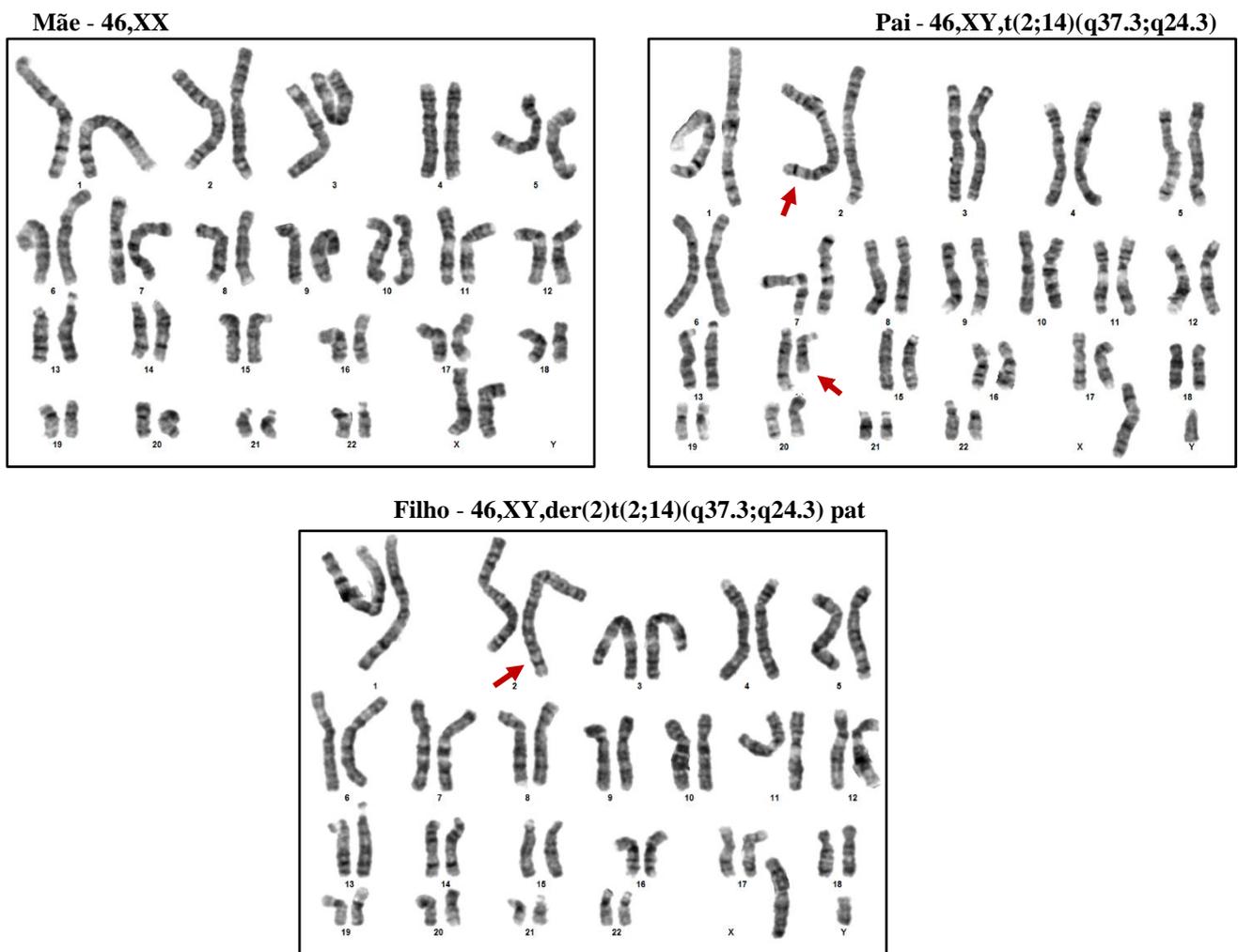


Figura 44 – Estudo citogenético no bebé e nos progenitores. No estudo cromossômico da mãe não foi detetada nenhuma alteração. No entanto, o progenitor é portador de uma translocação aparentemente equilibrada entre os cromossomas 2 e 14. O bebé herdou a translocação na forma desequilibrada resultante da segregação adjacente 1 aquando da meiose paterna.

Confirmada a presença de uma translocação, foram realizados estudos citogenéticos nos progenitores para determinar a origem da alteração. Esta análise permitiu concluir que o resultado observado no bebê é de origem paterna, que herdou a translocação na forma desequilibrada resultante da segregação adjacente 1.

Relativamente à duplicação no cromossoma 15, pode ser realizado MLPA ou *array* dirigido para determinar a origem da alteração uma vez que, devido ao seu tamanho, não é possível a deteção pela citogenética convencional.

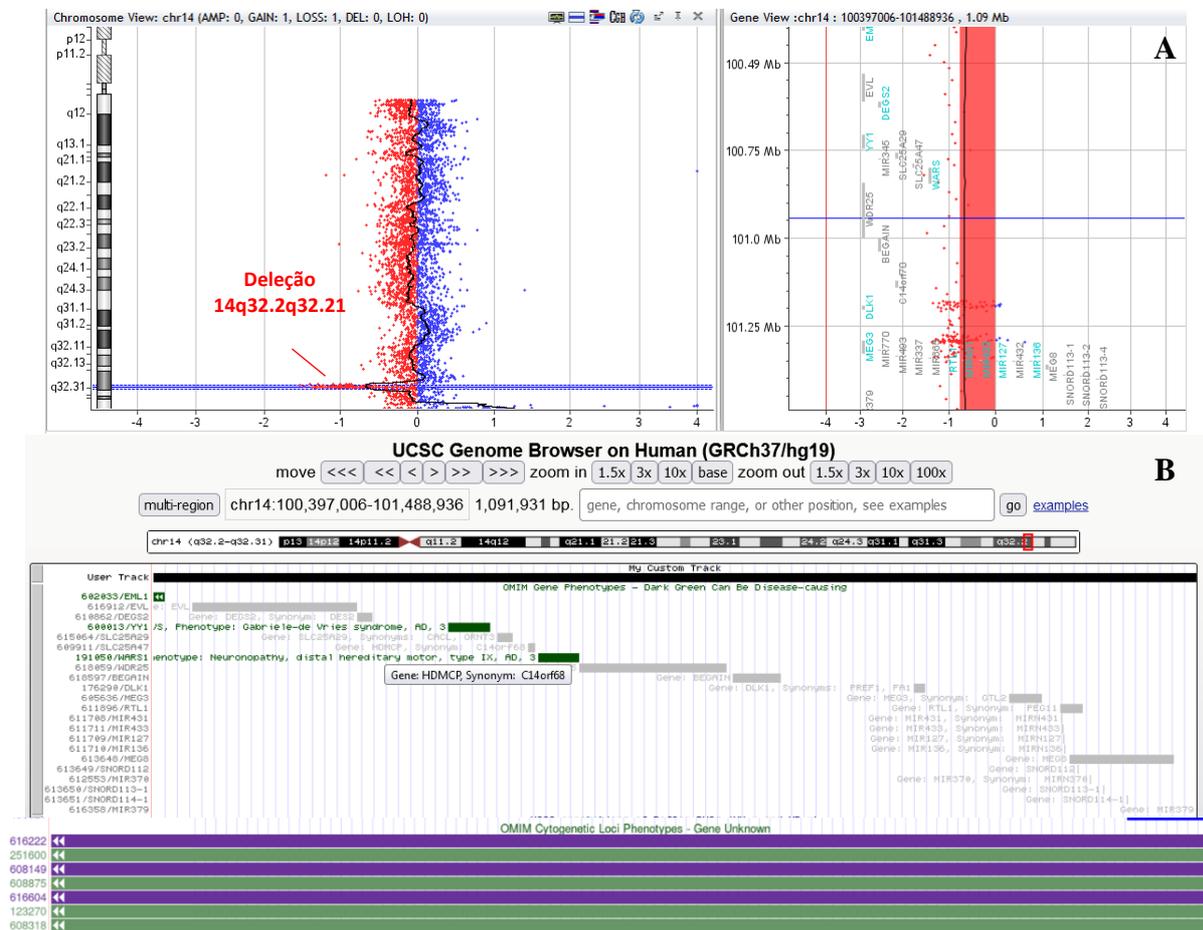
Este resultado e as suas implicações devem ser discutidas numa consulta de aconselhamento genético e poderá ser oferecido diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

3.8 CASO CLÍNICO 8

Feto com restrição do crescimento intrauterino e perímetro abdominal inferior ao normal para a idade gestacional.

Para entender a causas subjacentes às alterações ecográficas detetadas, foi realizada um estudo por oligoarray-CGH com 180K.

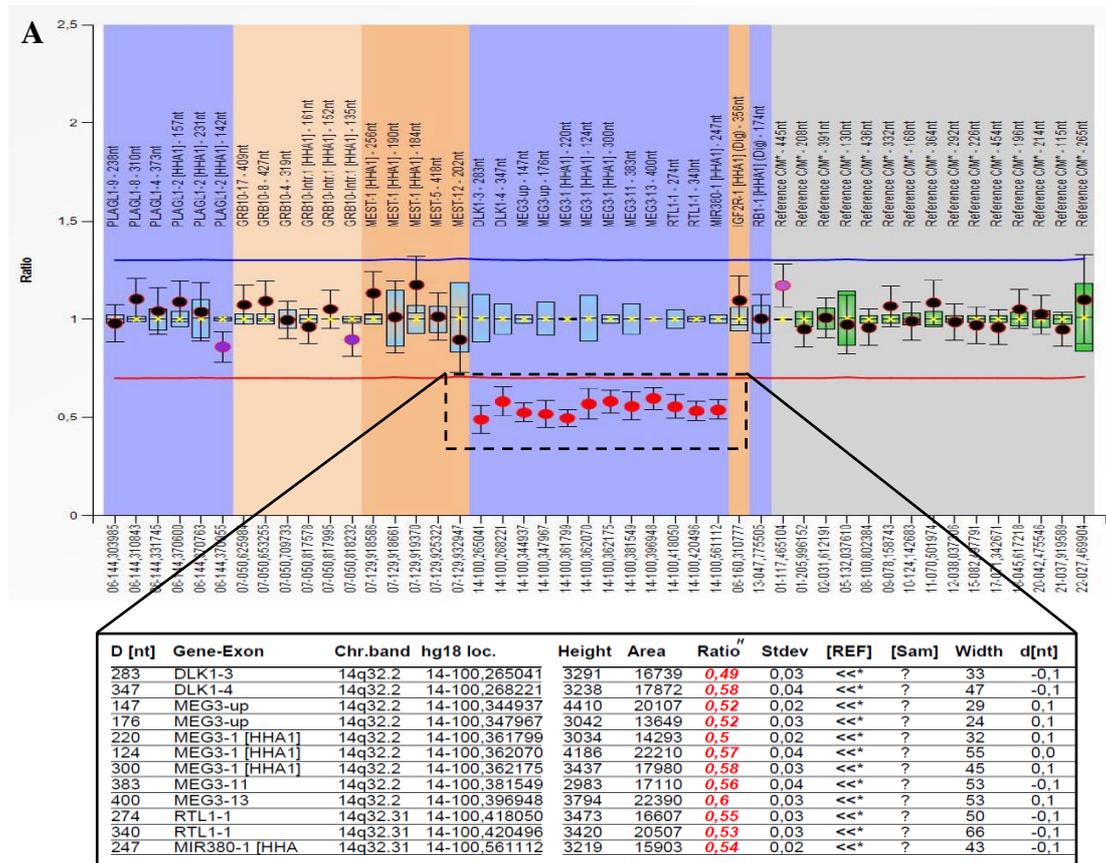
A análise por aCGH-180K utilizando um filtro de análise recomendado para diagnóstico pré-natal, em que são interpretadas as variantes com dimensão superior a 400kb, revelou uma deleção em heterozigotia no cromossoma 14(q32.2q32.31) (Figura 45A). Esta alteração de 1.92 Mb, entre as posições 100,397,006 e 101,488,936, envolve 25 genes descritos na base de dados OMIM e 3 reportados no OMIM Morbid Map (*EML1* – 602033; *YY1* – 600013; *WARSI* – 191050) (Figura 45B).



existem duas CNVs em deleção sobreponíveis, classificadas como patogénicas. Existem ainda casos descritos na base de dados Decipher que apresentam deleções semelhantes, classificadas como provavelmente patogénicas e de significado clínico desconhecido, que manifestam défice cognitivo, baixa estatura, alguns dismorfismos, e em pré-natal restrição do crescimento intrauterino (Decipher: 356301; 263711; 249082; 255698). Na base de dados DGV estão descritas CNVs em deleção, embora com um tamanho inferior.

A deleção envolve uma região que contém genes sujeitos a *imprinting* genómico. Deleções nesta região 14q32 podem estar associadas à síndrome de Temple (caso a deleção ocorra no alelo paterno) ou Kagami-Ogata (se a deleção ocorrer no alelo materno). Por este motivo, é importante a avaliação do padrão de metilação para determinar se a alteração ocorreu no cromossoma de origem paterno ou materno (Ogata e Kagami, 2016). Por este motivo, realizou-se a técnica de MS-MLPA.

Após confirmação da deleção por MLPA (Figura 46A) e estudo da metilação (MS-MLPA) com sondas do painel ME032 UPD7-UPD14, concluiu-se que a alteração encontrada no feto é *de novo* (Figura 46B).



Mãe

Pai

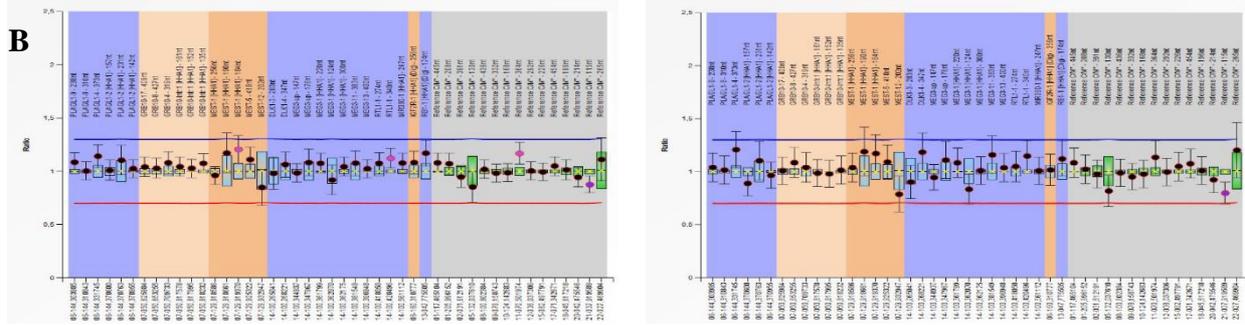


Figura 46 – Confirmação da deleção encontrada no feto por MLPA (rsa 14q32.2(*DLK1,MEG3,RTL1,MIR380*)x1). É possível observar a região deletada no cromossoma 14 (rácio < 0,7 indica uma deleção em heterozigotia) (A). Estudo nos progenitores (B). É possível concluir que nenhum dos progenitores é portador da alteração encontrada no feto.

O estudo por MS-MLPA (Figura 47) permitiu identificar que a deleção ocorreu no cromossoma de origem paterno, estando associada com a síndrome de Temple. Num caso normal, visto que o gene *MEG3* é de expressão materna e por isso o alelo paterno está metilado, o rácio de metilação deveria ser de 50%. Como a enzima utilizada é sensível à metilação, iria haver a digestão das sondas que se ligaram ao alelo materno e consequentemente não haveria amplificação. No alelo paterno, devido à metilação a ação da enzima seria inibida e seguidamente ocorria a amplificação. No entanto, com um rácio de 0, podemos inferir que a deleção ocorreu no alelo paterno.

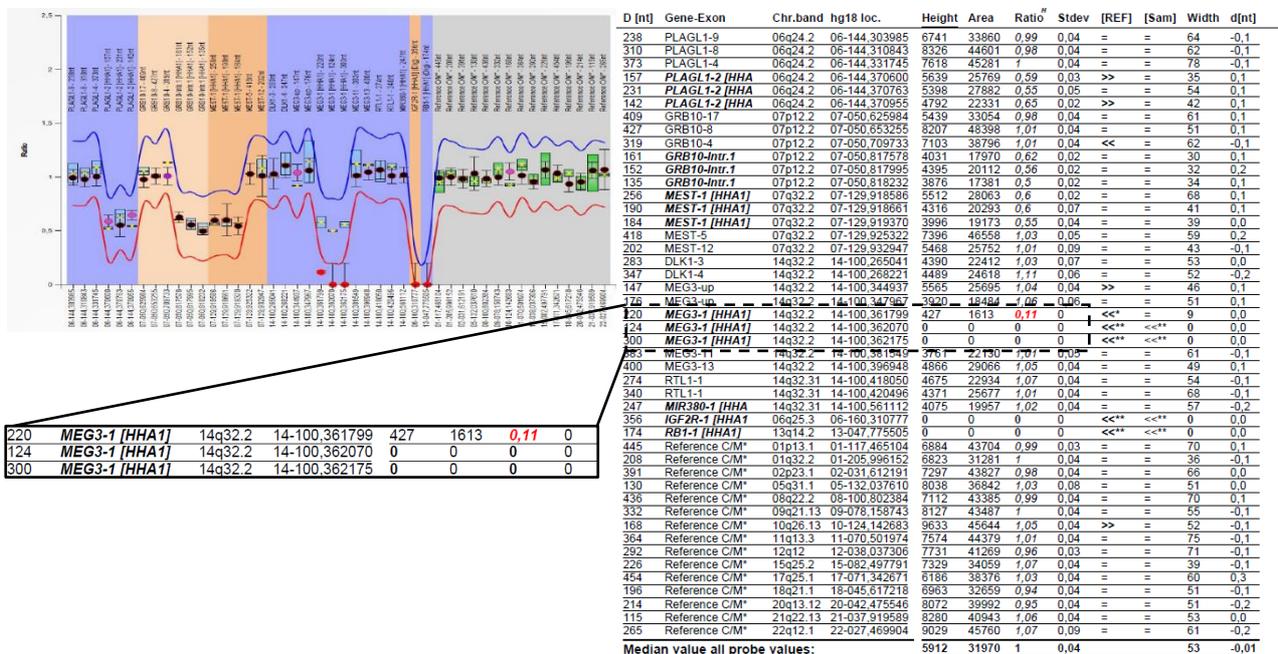


Figura 47 – Estudo da metilação por MS-MLPA. É possível verificar que a deleção ocorreu no cromossoma de origem paterna.

Este feto do sexo masculino possui uma deleção patogénica, *de novo*, associada à síndrome de Temple. O diagnóstico desta síndrome em pré-natal é particularmente difícil,

sendo essencialmente caracterizada por uma restrição do crescimento intrauterino. Por outro lado, em pós-natal esta síndrome cursa com déficit cognitivo, baixa estatura, atraso global do desenvolvimento, dismorfismos faciais, entre outros (Prasasya et al., 2020). Estes resultados e as suas implicações devem ser discutidos numa consulta de aconselhamento genético.

3.9 CASO CLÍNICO 9

Feto com rastreio combinado para trissomia 21 de 1/240.

Neste caso foi requerido o teste pré-natal não invasivo (NIPT) e para isso utilizou-se DNA livre em circulação (cfDNA), extraído e purificado a partir de uma amostra de sangue materno. A análise por NGS para detecção de aneuploidias fetais dos cromossomas 13, 18 e 21 ocorreu após amplificação por PCR. Na sequenciação foi utilizada a plataforma MiSeq da Illumina e a análise do resultado foi realizada através do Clarigo Reporter V2.

Na figura 48 é possível observar o resultado obtido para esta amostra. A fração fetal de 7.3% permitiu determinar o sexo fetal (gender evidence ≈ 1 - feminino) e o risco para as trissomias 13, 18 e 21.

A evidência de trissomia é um valor empírico que evidencia a presença de trissomia fetal para um cromossoma específico, onde um valor superior a +2.0 é um indicador de trissomia. O *Z-score* é uma medida estatística onde um maior valor indica uma maior evidência para trissomia. No caso da trissomia 18 e 21 a *trisomy call*, que corresponde ao resultado automático para risco de trissomia baseado na evidência de trissomia e no *Z-score*, é negativa se *Z-score* for inferior a 3.5 e a evidência de trissomia inferior a -0.5. Por outro lado, é positiva se estas duas medidas forem superiores a 3.5 e a 2.0, respetivamente. Relativamente à trissomia do cromossoma 13, a *trisomy call* é negativa caso o *Z-score* e a evidência de trissomia sejam inferiores a 4 e -0.5 respetivamente. Um valor positivo é atribuído se estes valores forem superiores a 4 e 2, respetivamente.

Portanto, este feto do sexo feminino apresenta um risco elevado para trissomia 21 (Figura 48A e 48B).

A análise dos parâmetros do processo (Figura 48C) permite verificar o sucesso da sequenciação e contribui para fiabilidade do resultado obtido. O valor da cobertura deve estar idealmente entre os 2 e 3 mil milhões de *reads* e a correlação da amostra deve ser superior a 99%. Caso os valores sejam inferiores ao esperado, então o resultado pode ser inconclusivo devido à má qualidade do DNA inicial ou da biblioteca. Outros fatores a ter em conta são a fração de dímeros de *primers* (<5%) e a fração de homozigotia (50%-60%). Uma percentagem elevada de dímeros de *primers* torna os resultados menos fiáveis. Em relação à fração de homozigotia, como no NIPT é feita a comparação do genoma materno com o fetal, a percentagem deve estar dentro do valor mencionado

anteriormente. Caso contrário, poderá indicar uma terceira fonte de DNA, comprometendo os resultados.

Os gráficos de evidência (Figura 48B) resumem a relação entre a fração fetal com a evidência de trissomia para o *Z-score* obtido.

A Test Results

Fetal fraction*: 7.3%

Condition tested	Trisomy Call*	Trisomy Evidence*	Z-score*
Trisomy 13	negative	-10.8	-2.5
Trisomy 18	negative	-11.4	-2.6
Trisomy 21	positive	7.0	6.4

Gender evidence*: 0.91. Gender call*: female.

C Process parameters

<u>Sample coverage*</u> :	2.092M reads
<u>Sample correlation*</u> :	99.50%
<u>Sample correlation σ-fold*</u> :	-2.4
<u>Classified read fraction*</u> :	94.39%
<u>Primer dimer read fraction*</u> :	5.01%
<u>Homozygous coverage fraction*</u> :	54.27%

B Graphs

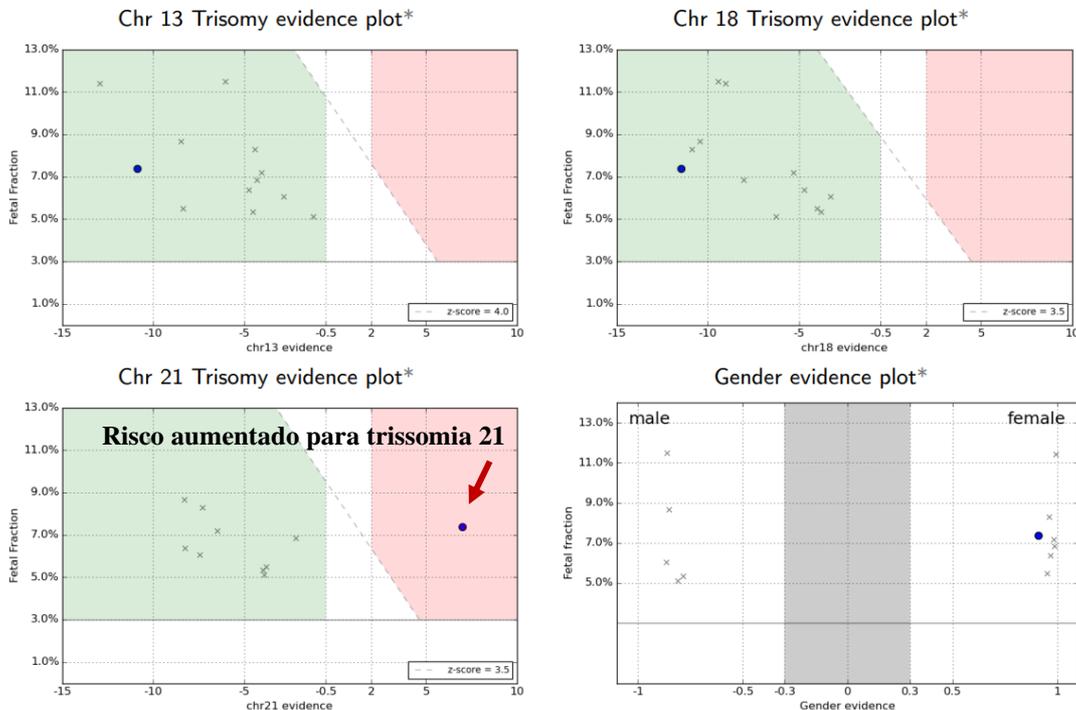


Figura 48 – Resultado obtido para esta amostra. (A) Resultado do teste – um *gender evidence* de 1 é indicativo de um feto do sexo feminino. Por outro lado, um valor de -1 indica um feto do sexo masculino. *Trisomy call* - com base no *Z-score* e na evidência de trissomia indica se há risco de trissomia dos cromossomas 13, 18 e 21 (B) Parâmetros do processo – avalia o sucesso da reação; (C) Gráficos da evidência (Normal – Zona verde; Risco de trissomia – Zona vermelha).

Uma vez que o NIPT é um teste de rastreio, para confirmação do resultado obtido a grávida pode realizar um método invasivo de diagnóstico para estudo do feto, pela citogenética ou técnicas da biologia molecular.

4. CONCLUSÃO

O estágio no LCG-FMUC permitiu compreender que o conhecimento de todas as etapas do ciclo laboratorial é crucial para o sucesso dos resultados, assim como o controle de qualidade. A garantia da qualidade ao longo das etapas laboratoriais permite obter resultados mais precisos e confiáveis, contribuindo para uma comunicação de resultados mais atempada. A celeridade na entrega de resultados torna-se ainda mais relevante nos casos de pré-natal.

Este trabalho permitiu ainda verificar que as técnicas da citogenética e genómica tornam-se uma mais-valia para o diagnóstico pré e pós-natal, pois permitem a caracterização de alterações cromossómicas subjacentes a diversas patologias e síndromes. A citogenética, embora permita a análise da estrutura dos cromossomas e a deteção de alterações cromossómicas equilibradas, apresenta algumas limitações ao nível da resolução. A utilização da FISH, como um complemento à citogenética, permite incrementar o poder de resolução. No entanto, acaba por ser uma técnica mais dirigida, sendo o caso de outras técnicas moleculares, como o MLPA e o QF-PCR.

A aplicação de técnicas mais abrangentes, como o aCGH, permite a deteção de alterações que não seriam detetáveis pela citogenética convencional e uma melhor caracterização de alterações detetadas no cariótipo, como é o caso de alguns cromossomas marcadores. Apesar disso, a citogenética convencional também apresenta um papel importante na caracterização de alterações cromossómicas equilibradas, tendo influência no risco de recorrência de determinada alteração.

Embora as técnicas mais abrangentes possibilitem a deteção de alterações com um tamanho menor, é necessário ter em conta que, estas também produzem uma grande quantidade de dados, muitas vezes de difícil interpretação. Neste sentido, além do desenvolvimento tecnológico dos diferentes equipamentos e metodologias, também é importante a realização de mais estudos para compreender a relação genótipo-fenótipo de várias alterações. Este desenvolvimento irá permitir dar resposta a casos complexos e contribuir para um melhor aconselhamento genético.

Portanto, tanto as técnicas da citogenética convencional, como as técnicas moleculares podem ser utilizadas em conjunto, contribuindo para um diagnóstico mais completo. A seleção das diferentes técnicas depende do objetivo do estudo e para a sua correta aplicação devem ser conhecidas as vantagens e limitações inerentes a cada uma. Além disso, os resultados obtidos devem ser interpretados com prudência e

responsabilidade, pois a correta caracterização das alterações é fundamental para se estabelecer uma relação genótipo-fenótipo adequada.

5. REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2002) An Overview of the Cell Cycle. *In: Molecular Biology of the Cell* 4ed. Garland Science.

Allemeersch J, Vorren SV, Hannes F et al. (2009) An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. *BMC Bioinformatics* 10:380.

Badenas C, Rodríguez-Revenga L, Morales C et al. (2010) Assessment of QF-PCR as the First Approach in Prenatal Diagnosis. *Journal of Molecular Diagnostics* 2(6): 828–834.

Bagni C, Tassone F, Neri G et al. (2012) Fragile X syndrome; causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation* 4314- 4322.

Behjati S, Tarpey PS (2013) What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood.Education and Practice Edition* 236-238.

Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S et al. (2015) EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *European Journal of Human Genetics* 23:417-425.

Boyle T, Griffin D (2001) The cytogenetics of pregnancy. *In: Rooney Human Cytogenetics: Constitutional Analysis – A Practical Approach*. Oxford University Press 55-78.

Bruno R, Valetto A, Berini V et al. (2015) A 17q duplication prenatally detected. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 54(3): 326-9.

Carraro P, Plebani M (2007) Errors in a Stat Laboratory: Types and Frequencies 10 Years Later. *Clinical Chemistry* 1338-1342.

Chacon-Cortes D, Griffiths L (2014) Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 2014(2): 1-9.

Chang HJ, Clark RD, Bachman H (1990) The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases. *The American Journal of Humana Genetics* 46(1): 156-167.

Cho EK, Kim J, Yang A et al. (2017) 2q37 Deletion syndrome confirmed by high-resolution cytogenetic analysis. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 22(2): 129-132.

Chowdhury M, Dubey S (2014) Chapter 24 - Role of Cytogenetics and Molecular Genetics in Human Health and Medicine. *Animal Biotechnology* 451-472.

Ciaccio C, Fontana L, Milani D et al. (2017) Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. *Italian Journal of Pediatrics*.

Clouston HJ (2001) Lymphocyte culture. Boyle T, Griffin D (2001) The cytogenetics of pregnancy. *In: Rooney Human Cytogenetics: Constitutional Analysis – A Practical Approach*. Oxford University Press 33-45.

Coté R (1998) Aseptic Technique for Cell Culture. *In: Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons Inc.

Coté R (1999) Assessing and Controlling Microbial Contamination in Cell Cultures. *In: Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons Inc.

Curnow KJ, Sanderson RB, Beruti S (2018) Noninvasive Detection of Fetal Aneuploidy Using Next Generation Sequencing. *Methods in Molecular Biology* 1885(22): 325-345.

Deng C, Liu S (2022) Factors Affecting the Fetal Fraction in Noninvasive Prenatal Screening: A Review. *Frontiers in Pediatrics* 10: 812781.

Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH et al. (1960) A new trisomic syndrome. *Lancet* 787-90.

Eggermann T, Brioude F, Russo S et al. (2016) Prenatal molecular testing for Beckwith-Wiedemann and Silver-Russel syndromes: a challenge for molecular analysis and genetics counselling. *European Journal of Human Genetics* 24(6): 784-793.

Estandarte A (2012) A Review of the Different Staining Techniques for Human Metaphase Chromosomes. University of London.

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) In: Gersen SL and Kealge MB (eds.) The Principles of Clinical Cytogenetics 3 ed. Springer 415-439.

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

Gadzicki D, Baumer A, Wey E et al. (2006) Jacobsen Syndrome and BeckwithWiedemann Syndrome Caused by a Parental Pericentric Inversion inv(11)(p15q24). *Annals of Human Genetics* 958-964.

Gao W, Higaki T, Eguchi-Ishimae M, Iwabuki H et al. (2015) DGCR6 at the proximal part of the DiGeorge critical region is involved in conotruncal heart defects. *Human Genome Variation* 2: 1-7.

Gardner RJM, Amor DJ (2018) Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling 5ed. Oxford University Press.

Gayon J (2016) From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies* 225-230.

Giani AM, Gallo GR, Gianfranceschi L et al. (2020) Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 9-19.

Gil MM, Molina FS, Rodríguez-Fernández M et al. (2020) New approach for estimating risk of miscarriage after chorionic villus sampling. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 656-663

Gillentine MA, Berry LN, Goin-Kochel RP et al. (2017) The Cognitive and Behavioral Phenotypes of Individuals with CHRNA7 Duplications. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 47(3): 549-562.

Goldwaser T, Klugman S (2018) Cell-free DNA for the detection of fetal aneuploidy. *Fertility and Sterility* 109(2): 195-200.

- Gupta N (2019) DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology* 36(2): 116-117.
- Guttenback M, Haff T, Steinlein C et al. (1999) Ectopic NORs on human chromosomes 4pter and 8q11: rare chromosomal variants detected in two families. *Journal of Medical Genetics*.
- Halder A, Jain M (2012) *Molecular Cytogenetics Manual*. All India Institute of Medical Sciences.
- Harand S (2016) DNA and RNA extractions from mammalian samples. *In: Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples*. Springer 125-138.
- Hastings R, Howell R, Bricarelli FD et al. (2012) A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. *European Cytogeneticists Association* 11-19.
- Heather JM, Chain B (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 1-8.
- Howe B, Umrigar A, Tsien F (2014) Chromosome Preparation From Cultured Cells. *Journal of Visualized Experiments* (83):50203.
- Huang X, Li X, Tan C et al. (2010) Genome-Wide Scanning Reveals Complex Etiology of Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 222(4): 311-8.
- Inkster A, Thomas MA, Gamache NS et al. (2018) A Challenging Prenatal QF-PCR Rapid Aneuploidy Test Result Caused by a Maternally Inherited Triplication within Chromosome Xq26.2 156(1): 5-8.
- Jacobs PA, Strong JA (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 302-3.
- Jacquet H, Berthelot J, Bonnemains C et al. (2003) The severe form of type I hyperproliferative anaemia results from homozygous inactivation of the *PRODH* gene. *Journal of Medical Genetics* 40(1): 1-3.

Jang TH, Park SC, Yang JH et al. (2017) Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research* 12-18.

Johnson M (2013) Detergents: Triton X-100, Tween- 20, and More. *Mater Methods* 2: 163.

Kaiser-Rogers K, Rao KW (2013) Structural Chromosome Rearrangements. *In: Gersen SL and Keagle MB (eds.) The Principles of Clinical Cytogenetics* 3 ed. Springer 139-168.

Kannan TP, Zilfalil BA (2009) Cytogenetics: Past, Present And Future. *The Malaysian Journal of Medical Sciences* 16(2): 4-9.

Kasakyan S, Lohmann L, Aboura et al. (2009) De novo complex intra chromosomal rearrangement after ICSI: characterisation by BACs micro array-CGH. *Molecular Cytogenetics* 1(1):27.

Keagle MB (2013) DNA, Chromosomes, and Cell Division. *In: Gersen SL and Keagle MB (eds.) The Principles of Clinical Cytogenetics* 3 ed. Springer 9-21.

Keagle MB, Gersen SL (2013) Basic Cytogenetics Laboratory Procedures. *In: Gersen SL and Keagle MB (eds.) The Principles of Clinical Cytogenetics* 3 ed. Springer 53-65.

Kim K (2015) Advantages of the single nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Korean Society of Medical Genetics* 12: 66-71.

Kotikalapudi R, Patel RK (2015) Comparative Study of The Influence of EDTA and Sodium Heparin on Long Term Storage of Cattle DNA. *Cell Journal* 181-186.

Lejeune JM, Gautier M, Turpin R (1958) Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 1721-1722.

Levy B, Wapner R (2019) Prenatal Diagnosis by Chromosomal Microarray Analysis. *Fertility and Sterility* 109(2): 201-2012.

Lippi G, Mattiuzzi C, Favaloro EJ (2015) Pre-analytical variability and quality of diagnostic testing. Looking at the moon and gazing beyond the finger. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science* 04-08.

Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C et al. (2016) DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservations and Biobanking* 14(4): 264-270.

Malheiro MI, Porto B (2012) Citogenética Humana. *In: Azevedo C e Sunkel C, Biologia Celular e Molecular* 5ed. Lidel 166-188.

McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (2020) An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Karger.

MLPA® General Protocol.

Moore C, Best R (2001) Chromosome Preparation and Banding. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-7.

Moore LD, Le T, Fan G (2013) DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38: 23-38.

Nagan N, Faulkner NE, Curtis C et al. (2011) Laboratory Guidelines for Detection, Interpretation, and Reporting of Maternal Cell Contamination in Prenatal Analyses. *The Journal of Molecular Diagnostics* 13(1): 7-11.

National Institute of General Medical Sciences (14/02/2022).

Nicolini U, Lalatta F, Natacci F et al. (2004) The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Human Reproduction Update* 541-548.

Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM et al. (2005) Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research* 33(14): e128.

Ogata T, Kagami M (2016) Kagami–Ogata syndrome: a clinically recognizable upd(14)pat and related disorder affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region. *Journal of Humana Genetics* 61(2): 87-94.

Patau K, Smith DW, Therman E et al. (1960) Multiple congenital anomalies caused by an extra autosome. *Lancet* 790-3

Phelan MC (2007) Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *In: Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons Inc.

Pinkel D e Albertson DG (2005) Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nature Genetics* 37: 11-17.

Prasasya R, Grotheer KV, Siracusa LD et al. (2020) Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome: clinical presentation, genotypes, models and mechanisms. *Human Molecular Genetics* 29(R1): R107-R116.

Proença B (2014) Técnicas Invasivas de Diagnóstico e Terapêutica Embrio-Fetal. Universidade do Porto

Ribeiro I, Carreira I, Melo J (2018) Abordagens Citogenéticas e Genómicas: Perspetiva no Diagnóstico em Oncologia e nas Patologias do Neurodesenvolvimento. *Revista Internacional em Língua Portuguesa* 149-172.

Riegel M (2013) Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and Molecular Biology* 194-209.

Riggs ER, Anderson EF, Cherry AM et al. (2020) Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics in Medicine* 22(2): 245-257

Sato JD, Kan M (1998) Media for Culture of Mammalian Cells. *In: Current Protocols of Cell Biology*. John Wiley & Sons Inc.

Schifman RB, Cembrowski GS, Wolk DM et al. (2014) Quality Management. *In: Garcia LS, Clinical Laboratory Management* 2ed. American Society for Microbiology 421-446.

Schreck R, Distèche C (1994) Chromosome banding techniques. *Current Protocols in human genetics*.

Schrijver I, Cherny SC, Zehnder JL (2007) Testing for Maternal Cell Contamination in Prenatal Samples. *The Journal of Molecular Diagnostics* 9(3): 394-400.

Segeritz CP, Vallier L (2017) Cell Culture. Basic Science Methods for Clinical Researchers 151-172.

Seneca S, Lissens W, Endels K et al. (2012) Reliable and Sensitive Detection of Fragile X (Expanded) Alleles in Clinical Prenatal DNA Samples with a Fast Turnaround Time. The Journal of Molecular Diagnostics 560-568.

Shokrzadeh M, Mohammadpour A (2018) Evaluation of a modified salt-out method for DNA extraction from whole blood lymphocytes: A simple and economical method for gene polymorphism. Pharmaceutical and Biomedical Research 4(2): 28-32.

Sikaris K (2015) Performance criteria of the post-analytical phase. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 949-958.

Silva M, Leeuw Nicole, Mann Kathy et al (2019) European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. European Journal of Human Genetics 27: 1-16.

Skubisz M, Tong S (2012) The Evolution of Methotrexate as a Treatment for Ectopic Pregnancy and Gestational Trophoblastic Neoplasia: A Review. ISRN Obstetrics and Gynecology 1-8.

Slovak ML, Theisen A, Shaffer LG (2013) Human Chromosome Nomenclature: An Overview and Definition of Terms. *In*: Gersen SL and Kealge MB (eds.) The Principles of Clinical Cytogenetics 3 ed. Springer 23-49.

Speicher MR, Carter NP (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. Nature reviews. Genetics 6(10)-782-92.

Stuppia L, Antonucci I, Palka G et al. (2012) Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. International Journal of Molecular Sciences 13(3) 3245-3276.

Tan SC, Yiap BC (2009) DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2009:574398.

Tassone F (2015) Advanced technologies for the molecular diagnosis of fragile X syndrome. Expert Review of Molecular Diagnostics 15(11): 1465-1473.

Theisen A (2008) Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). Nature Education 1(1):45.

Thompson MT, Thompson JS (2015) Genetics in Medicine 8ed. Elsevier.

Vorsanova S, Yurov YB, Iourov IY (2012) Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. Molecular Cytogenetics 1-15.

Wang JC (2013a) Autosomal Aneuploidy. In: Gersen SL and Kealge MB (eds.) The Principles of Clinical Cytogenetics 3 ed. Springer 113-137.

Wang JC (2013b) Genomic Imprinting and Uniparental Disomy. In: Gersen SL and Kealge MB (eds.) The Principles of Clinical Cytogenetics 3 ed. Springer 473-498.

Wang S, Elliott GD (2017) Synergistic Development of Biochips and Cell Preservation Methodologies: A Tale of Converging Technologies. Current Stem Cell Reports.

Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 737-738.

Whaley D, Danyar K, Witek RP et al. (2021) Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. Cell Transplantation.

Willis AS, Veyver I, Eng C (2012) Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. Prenatal Diagnosis 32(44) 315-320.

Wilson JA, Pratt VM, Phansalkar A et al. (2008) Consensus Characterization of 16 *FMR1* Reference Materials: A Consortium Study 2-12.

ANEXOS

ANEXO I – EXEMPLO DA FOLHA DE ANÁLISE CITOGENÉTICA

Lâmina	Referência	Análise	Contagem	Fotografia	Comentário
1	42,8 - 104,5			✓	47,XY,+21
	14,0 - 103,0	✓			47,XY,+21
	12,0 - 99,5		✓		47,XY,+21
	12,3 - 105,0		✓		47,XY,+21
2	48,9 - 106,0			✓	47,XY,+21
	47,0 - 100,0		✓		47,XY,+21
	4,6 - 104,6		✓		47,XY,+21
3	13,2 - 103,0	✓			47,XY,+21
	9,0 - 103,0			✓	47,XY,+21
	6,7 - 102,0		✓		47,XY,+21
4	47,2 - 104,0		✓		47,XY,+21
	46,3 - 101,3		✓		47,XY,+21
	45,5 - 102,3		✓		47,XY,+21
	45,0 - 102,3		✓		48,XY,+21,-22
	45,7 - 105,0			✓	47,XY,+21
	40,0 - 102,0			✓	47,XY,+21
	15,0 - 105,4			✓	47,XY,+21
5	13,0 - 106,5		✓		47,XY,+21
6	43,2 - 102,4		✓		47,XY,+21
	37,3 - 101,6		✓		47,XY,+21
	12,5 - 102,0		✓		47,XY,+21
	7,0 - 102,0		✓		47,XY,+21
	7,0 - 101,3		✓		47,XY,+21
8	47,0 - 103,5		✓		

Análise cromossômica	45	46	47	48	49	Total	Cariótipo <u>47,XY,+21</u>
Nº de Met. analisadas							
Nº de Met. contadas							
Nº de Fotografia							

Conclusão

O Técnico que estudou o caso Pedro Veiga O Técnico que corrigiu _____ A Responsável pela Unidade _____

ANEXO II – MODELO DO RELATÓRIO DE RESULTADOS

Laboratório de Citogenética e Genómica
Pólo III das Ciências da Saúde
3000-548 Coimbra, Portugal



Nome:	Nº da amostra:
Sexo:	Tipo de amostra:
Data de nascimento:	Data da colheita:
Morada:	Data de entrada:
Médico requisitante:	Nº do processo externo:
Hospital:	
Data de emissão do relatório:	

Análise requisitada: Estudo do Cariótipo.

Indicação clínica: Anomalias ecográficas às 12 semanas e 2 dias: higroma.

Metodologia: Cultura de vilosidades coriônicas para a obtenção e estudo de metafases. Utilizou-se bandagem GTL como método de coloração para a análise das bandas cromossómicas.

Resultado (ISCN-2020): 47,XY+18

Interpretação: A avaliação cromossómica de 17 metafases com uma resolução de 550 bandas, de uma só linha celular revelou um cariótipo do sexo masculino, constituído por 47 cromossomas apresentando três cópias do cromossoma 18.

Conclusão: A análise citogenética revelou a presença de um cromossoma 18 extra, sendo compatível com a síndrome de Edwards (trissomia 18). Por se tratar de uma alteração cromossómica numérica, o risco de recorrência é aproximadamente 1%, não sendo possível excluir a existência de mosaicismo gonadal. Este resultado e as suas implicações devem ser discutidas numa consulta de aconselhamento genético e poderá ser oferecido diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

_____ Técnico que realizou a análise NOME A	_____ Técnico que conferiu a análise NOME B	_____ Diretor/a do Laboratório
---	---	-----------------------------------

Limitações do teste: A citogenética convencional apresenta um limite de resolução entre os 5-10Mb. Poderá não ser possível detetar mosaicismos de baixa expressão.