



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Joana Rita Fernandes Justo

**TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR NO  
DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL NO  
ÂMBITO DAS MALFORMAÇÕES  
ECOGRÁFICAS E SINAIS  
ECOGRÁFICOS DE ALERTA**

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do mestrado em Genética Clínica  
Laboratorial orientada pela Professora Doutora Isabel Maria  
Marques Carreira e pela Mestre Alexandra Isabel Correia  
Mascarenhas e apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra

Julho de 2022

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira pela orientação, disponibilidade, dedicação e ajuda no decorrer do estágio e por todas as partilhas, vivências e conhecimentos transmitidos ao longo do mestrado.

À Professora Doutora Joana Barbosa de Melo por todos os ensinamentos transmitidos, empenho e ajuda no decorrer do mestrado.

À minha orientadora Alexandra Mascarenhas por todo o apoio, acompanhamento, prestabilidade e simpatia ao longo do estágio.

A toda a equipa, sem exceções, do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela excelente receção e acolhimento, boa disposição/energia e simpatia de todos, pelos conhecimentos e ensinamentos providenciados e por todo o carinho, atenção, paciência, ajuda, disponibilidade e grande apoio que sempre demonstraram para comigo durante a minha passagem pelo Laboratório.

À minha família, em especial pais e irmã, pelo apoio incondicional, investimento, incentivo, força, palavras sábias e amor, essenciais para seguir o meu percurso académico e conquistar os meus objetivos. São os meus grandes pilares.

Aos meus amigos por toda a paciência, amizade, conselhos e força necessária para que eu terminasse esta etapa com sucesso.

Aos meus colegas de estágio, Gui, Pedro e Teresa, pela amizade, companheirismo, partilhas, momentos únicos, apoio, entreajuda e convívio nestes meses tão desafiantes.

Por fim, a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, me incentivaram e ajudaram ao longo deste meu percurso académico.

A todos, mais uma vez, muito obrigada. Cada um teve o seu papel fulcral para que esta experiência, ainda que muito desafiante, tenha sido concluída com sucesso e todos contribuíram para o meu crescimento pessoal e académico.

<b>Índice Geral</b>	
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>2</b>
<b>Índice Geral</b> .....	<b>3</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>6</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>8</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>9</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>12</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>13</b>
<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	<b>14</b>
1.1. Enquadramento e objetivos do estágio .....	14
1.2. Caracterização do laboratório .....	15
<b>Capítulo II – Citogenética e Genómica (perspetiva histórica)</b> .....	<b>16</b>
<b>Capítulo III – Cromossomas e divisão celular</b> .....	<b>20</b>
3.1. Estrutura do cromossoma .....	20
3.2. Divisão celular .....	20
3.3. Nomenclatura.....	22
<b>Capítulo IV – Alterações cromossómicas</b> .....	<b>23</b>
4.1. Alterações cromossómicas numéricas .....	23
4.2. Alterações cromossómicas estruturais.....	24
4.3. Mosaicismo.....	26
<b>Capítulo V – Diagnóstico Pré-Natal</b> .....	<b>27</b>
5.1. Testes não-invasivos .....	28
5.1.1. Ecografia.....	28
5.1.2. Rastreio bioquímico.....	29
5.1.3. Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT).....	29
5.2. Testes invasivos .....	30
5.2.1. Biópsia das Vilosidades Coriónicas (BVC) .....	30
5.2.2. Amniocentese .....	31
5.2.3. Cordocentese .....	32
<b>Capítulo VI – Metodologias das técnicas citogenéticas e moleculares</b> .....	<b>35</b>
6.1. Fase Pré-Analítica.....	35
6.1.1. Colheita e identificação das amostras.....	35
6.2. Fase Analítica .....	37
<b>A – Citogenética Convencional</b> .....	<b>37</b>
A1 – Cultura Celular .....	37
A1.1 – Cultura de Amniócitos .....	39

A1.2 – Cultura de Vilosidades Coriônicas .....	40
A1.3. – Subcultura .....	41
A1.4. – Tripsinização <i>in situ</i> .....	42
A1.5. – Cultura de linfócitos .....	42
A1.6. – Criopreservação de culturas de células.....	43
A2 – Manipulação .....	45
A2.1. Adição da Colcemida.....	45
A2.2. Tratamento Hipotônico.....	46
A2.3. Fixações .....	47
A3 – Espalhamento.....	48
A4 – Bandagem .....	49
A4.1. Bandagem QFQ (bandas Q, por fluorescência e coloração Quinacrina).....	50
A4.2. Bandagem G (usando Tripsina e corante Leishman).....	50
A4.3. Bandagem RHG (Bandas R usando calor e corante Giemsa).....	52
A4.4. Bandagem CBG (bandas C usando hidróxido de bário e corante Giemsa)..	52
A4.5. Bandagem AgNOR (Coloração com nitrato de prata das regiões organizadoras dos nucléolos).....	53
A5 – Análise microscópica.....	54
<b>B – Citogenética Molecular: <i>Fluorescence in situ Hybridization</i> (FISH).....</b>	<b>56</b>
<b>C – Biologia Molecular e Genômica.....</b>	<b>60</b>
C1 – Extração, quantificação e purificação de DNA.....	60
C2 – <i>Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction</i> (QF-PCR).....	62
C3 – Despiste de contaminação materna através da análise de STRs .....	65
C4 – Diagnóstico da Síndrome de X-frágil por PCR .....	67
C5 - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) .....	72
C6 – Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS- MLPA).....	77
C7 – Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH).....	79
C8 – Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) .....	83
6.3. Fase pós-analítica .....	85
<b>Capítulo VI – Análise e interpretação de casos clínicos.....</b>	<b>87</b>
7.1. Caso clínico I.....	87
7.2. Caso clínico II.....	88
7.3. Caso clínico III .....	89
7.4. Caso clínico IV .....	90
7.5. Caso clínico V .....	93

7.6. Caso clínico VI.....	97
7.7. Caso clínico VII.....	101
7.8. Caso clínico VIII .....	104
<b>Capítulo VII – Conclusão .....</b>	<b>107</b>
<b>Capítulo VIII – Bibliografia .....</b>	<b>108</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>121</b>

## Índice de Figuras

**Figura 1** – Representação esquemática de um cromossoma e a sua classificação consoante a posição do centrómero.

**Figura 2** – Esquemas exemplificativos dos mecanismos da Mitose e Meiose.

**Figura 3** – Ideograma do cromossoma 20 com uma resolução de 700 bandas e um padrão de bandas G.

**Figura 4** – Representação esquemática da não-disjunção meiótica e mitótica.

**Figura 5** – Exemplos esquemáticos de alterações cromossómicas estruturais.

**Figura 6** – Representação de uma colheita de vilosidades coriónicas (BVC) transabdominal com o auxílio de uma sonda ecográfica e uma agulha.

**Figura 7** – Representação de uma amniocentese transabdominal com o auxílio de uma sonda ecográfica e uma agulha.

**Figura 8** – Representação de uma cordocentese com o auxílio de uma sonda ecográfica e uma agulha.

**Figura 9** – Separação à lupa do material fetal de uma amostra de vilosidades coriónicas.

**Figura 10** – Esquema exemplificativo do procedimento da criopreservação de culturas celulares.

**Figura 11** – Representação esquemática das várias etapas do estudo citogenético.

**Figura 12** – Procedimento da bandagem GTL.

**Figura 13** – Procedimento da bandagem CBG.

**Figura 14** – Exemplos de metafases com algumas técnicas de bandagem utilizadas em citogenética convencional.

**Figura 15** – Visualização de uma metafase ao microscópio e exemplo de um cariograma obtido de uma metafase com bandagem GTL.

**Figura 16** – Representação esquemática do princípio da técnica de FISH.

**Figura 17** – Técnica de FISH com diferentes tipos de sondas de DNA (marcação direta) para análise de alterações cromossómicas.

**Figura 18** – *Workflow* do procedimento laboratorial da FISH.

**Figura 19** – Análise e interpretação dos resultados QF-PCR.

**Figura 20** - Análise e interpretação dos resultados.

**Figura 21** – Exemplos de resultados obtidos por PCR convencional.

**Figura 22** – Exemplo de um resultado inconclusivo obtidos por PCR convencional e confirmação por *TP-PCR*.

**Figura 23** – Representação esquemática das etapas do procedimento de MLPA.

**Figura 24** – Controlo interno de qualidade da reação MLPA através da análise dos fragmentos Q e D.

**Figura 25** - Representação esquemática do procedimento de MS-MLPA.

**Figura 26** – Representação esquemática da técnica de aCGH.

**Figura 27** – Cariograma representativo do caso clínico I.

**Figura 28** – Cariograma representativo do caso clínico II, com resolução de 400 bandas.

**Figura 29** – Cariograma representativo do caso clínico III.

**Figura 30** – Cariograma representativo do caso clínico IV.

**Figura 31** – Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metafase pela técnica de FISH.

**Figura 32** – Resultados obtidos através do estudo de aCGH.

**Figura 33** – Resultados do estudo citogenético do caso V.

**Figura 34** – Cariograma representativo do caso VI.

**Figura 35** – Resultado obtido através do estudo de aCGH.

**Figura 36** – Análise dos genes envolvidos na alteração encontrada recorrendo à base de dados *UCSC Genome Browser*.

**Figura 37** – Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metafase pela técnica de FISH.

**Figura 38** – Observação ao microscópio de fluorescência de células em metafase dos progenitores, pela técnica de FISH.

**Figura 39** – Resultado obtidos através do estudo de aCGH e análise dos genes envolvidos na alteração encontrada recorrendo à base de dados *UCSC Genome Browser*.

**Figura 40** – Resultados obtidos através da técnica de MS-MLPA, com recurso ao painel de sondas ME028-PWS/AS.

**Figura 41** – Resultados obtidos através da técnica de NIPT.

## **Índice de Tabelas**

**Tabela 1** – Vantagens e desvantagens/limitações das técnicas de citogenética, genética molecular e genómica.



## Lista de Abreviaturas

<b>A</b> – Absorvância	<b>Decipher</b> – <i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources</i>
<b>aCGH</b> – <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>	<b>DGS</b> – Direção Geral de Saúde
<b>ACSS</b> – Administração Central do Sistema de Saúde	<b>DGV</b> – <i>Database of Genomic Variants</i>
<b>ADPM</b> – Atraso de desenvolvimento psicomotor	<b>DMSO</b> – <i>Dimethyl sulfoxide</i>
<b>AFP</b> – Alfa-fetoproteína	<b>DNA</b> – <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>AgNO<sub>3</sub></b> – Nitrato de prata	<b>dNTPs</b> – <i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
<b>AgNOR</b> – Banda NOR usando nitrato de prata	<b>DPN</b> – Diagnóstico Pré-Natal
<b>AMEL</b> – Amelogenina	<b>EBMG</b> – <i>European Board of Medical Genetics</i>
<b>Ba(OH)<sub>2</sub></b> – Hidróxido de bário	<b>EDTA</b> – <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>BACs</b> – <i>Bacterial artificial chromosomes</i>	<b>EG</b> – Etilenoglicol
<b>BVC</b> – Biópsia das vilosidades coriônicas	<b>ESHG</b> – <i>European Society of Human Genetics</i>
<b>C</b> – Citosina	<b>FBS</b> – <i>Fetal bovine serum</i>
<b>CBG</b> – Banda C, usando hidróxido de bário e corante Giemsa	<b>FCS</b> – <i>Fetal calf serum</i>
<b>cfDNA</b> – <i>Cell-free DNA</i>	<b>FF</b> – Fração fetal
<b>ClinGen</b> – <i>The Clinical Genome Resource</i>	<b>FISH</b> – <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
<b>CNV</b> – <i>Copy Number Variation</i>	<b>FMR1</b> – <i>Fragile X Messenger Ribonucleoprotein-1</i>
<b>CO<sub>2</sub></b> – Dióxido de carbono	<b>FMRP</b> – <i>Fragile X mental retardation protein</i>
<b>CQ</b> – Controlo de qualidade	<b>FXPOI</b> – <i>Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency</i>
<b>CRA</b> – <i>Chromosome Resolution Additive</i>	<b>FXTAS</b> – <i>Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome</i>
<b>Cy3</b> – Cianina 3	<b>G</b> – Guanina
<b>Cy5</b> – Cianina 5	
<b>DAPI</b> – 4',6-Diamidino-2-Phenylindole	

**GTG** – Banda G, usando tripsina e corante Giemsa

**GTL** – Banda G, usando tripsina e corante Leishman

**H<sub>2</sub>O** – Água

**hCG** – *Human chorionic gonadotropin*

**HCl** – Ácido clorídrico

**IMG** – Interrupção médica da gravidez

**ISCN** – *International System for Human Cytogenomic 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

**Log** – Logaritmo

**Mat** – Materno

**Mb** – Megabase

**MC** – Mutação completa

**ml** – Mililitros

**MLPA** – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

**MS-MLPA** – *Methylation-Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

**MTX** – Metotrexato

**Na<sup>+</sup>** – S dio

**NaCl** – Cloreto de s dio

**NGS** – *Next Generation Sequencing*

**NIPT** – *Non-Invasive Prenatal Testing*

**nm** – Nan metro

**NOR** – *Nucleolar Organizing Region*

**OMIM** – *Online Mendelian Inheritance in Man*

**p** – Braço curto

**PAPP-A** – *Pregnancy associated plasma protein A*

**Pat** – Paterno

**Pb** – Pares de base

**PBS** – *Phosphate-buffered saline*

**PCR** – *Polymerase chain reaction*

**PDI** – Perturbação do desenvolvimento intelectual

**PEA** – Perturbação do espectro autista

**PHA** – Fitohemaglutinina

**PM** – Pré-mutação

**q** – Braço longo

**QF-PCR** – *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*

**QFQ** – Banda Q obtidas por Fluorescência usando Quinacrina

**RefSeq** – *Reference Sequence*

**RHG** – Banda R, usando calor e corante Giemsa

**RNA** - *Ribonucleic acid*

**rRNA** – *Ribosomal RNA*

**S** – Fase de síntese

**SA** – Síndrome de Angelman

**SNC** – Sistema nervoso central

**SNP** – *Single nucleotide polymorphism*

**SPW** – Síndrome de Prader-Willi

**SSC** – *Saline-Sodium Citrate*

**STRs** – *Short Tandem Repeats*

**SXF** – Síndrome do X-frágil

**T21** – Trissomia 21

**TEA** – Transtorno do espectro autista

**TN** - Translucência da nuca

**TP-PCR** – *Triplet Repeat Primed PCR*

**UK NEQAS** – *United Kingdom*

*National External Quality Assessment*

*Service*

**UTR** – *untranslated region*

**VOUS** – *Variants of uncertain*

*significance*

**WCP** – *Whole chromosome painting*

**μE3** – Estriol não conjugado

## Resumo

O Diagnóstico Pré-Natal (DPN) tem assumido um papel preponderante na detecção precoce de alterações genéticas no feto, com recurso a técnicas imagiológicas (nomeadamente ecografia) e técnicas citogenéticas e moleculares.

A ciência e as tecnologias foram evoluindo ao longo dos anos e, com isso, surgiram inúmeras técnicas que têm contribuído para o estudo do genoma humano e um diagnóstico mais preciso. Dentro da área da citogenética, existem as técnicas de citogenética convencional e molecular e, dentro das técnicas de biologia molecular e genómica, encontram-se as técnicas: QF-PCR, MLPA, MS-MLPA, aCGH e NGS. Todas estas técnicas são essenciais para o estudo de alterações cromossómicas em diagnóstico pré e pós-natal.

A citogenética fornece uma visão geral dos cromossomas e permite ver a sua disposição e organização e a genómica permite visualizar o genoma de forma mais detalhada. Ambas as áreas têm as suas vantagens e limitações, podendo complementar-se entre elas. A escolha da/s técnica/s a utilizar depende da indicação clínica e do objetivo do estudo, com a finalidade de estabelecer uma relação genótipo-fenótipo e contribuir para um diagnóstico correto.

O foco deste trabalho é abordar as técnicas de citogenética e biologia molecular e aplicar as diferentes metodologias em diversos casos clínicos, no âmbito das malformações ecográficas e sinais ecográficos de alerta, de modo a saber definir qual a melhor estratégia de estudo para cada caso, adquirir ferramentas laboratoriais e ser capaz de interpretar os resultados obtidos, elaborar relatórios clínicos e compreender os desafios do diagnóstico pré-natal, integrando todos os conceitos adquiridos no decorrer do mestrado.

**Palavras-chave:** Diagnóstico Pré-Natal; Citogenética; Biologia Molecular; Genómica; Malformações ecográficas; Sinais ecográficos de alerta.

## **Abstract**

Prenatal Diagnosis (PND) has assumed a leading role in the early detection of genetic alterations in the fetus, using imaging techniques (namely ultrasound) and cytogenetic and molecular techniques.

Science and technologies have evolved over the years and, as a result, numerous techniques have emerged which contributes the study of the human genome and to a more accurate diagnosis. Within the field of cytogenetics, there are conventional and molecular cytogenetics techniques, and within molecular biology and genomics techniques, there are the following techniques: QF-PCR, MLPA, MS-MLPA, aCGH and NGS. All these techniques are essential for the study of chromosomal alterations in pre and postnatal diagnosis.

Cytogenetics provides an overview of chromosomes and allows to see their arrangement and organization and genomics allows to visualize the genome in a more detailed way. Both areas have their advantages and limitations, and they can complement each other. The choice of technique/s to be used depends on the clinical indication and the objective of the study, in order to establish a genotype-phenotype relationship and provide a correct diagnosis.

The focus of this work is to approach the techniques of cytogenetics and molecular biology and apply the different methodologies in several clinical cases, in the scope of echographic malformations and echographic warning signs, in order to know how to define the best study strategy for each case, acquire laboratory tools and be able to interpret the results obtained, prepare clinical reports and understand the challenges of prenatal diagnosis, integrating all the concepts acquired during the master's degree.

**Keywords:** Prenatal Diagnosis; Cytogenetics; Molecular Biology; Genomics; Echographic malformations; Echographic warning signs.

# Capítulo I – Introdução

## 1.1. Enquadramento e objetivos do estágio

O estágio curricular, realizado no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial, tem como principais focos adquirir conhecimentos e competências na área, interagir com vários profissionais competentes, ser parte integrante de uma equipa multidisciplinar e compreender a dinâmica de trabalho.

Dado o seu caráter mais profissionalizante, a realização deste estágio é muito importante para consolidar conhecimentos adquiridos no decorrer do mestrado e aplicá-los no domínio prático, compreender a aplicabilidade das diferentes técnicas laboratoriais e definir a melhor estratégia de estudo de acordo com a indicação clínica (especialmente no âmbito do Diagnóstico Pré-Natal) e fomentar a autonomia, responsabilidade, espírito crítico e capacidade de análise de resultados, de modo a obter ferramentas essenciais para, no futuro, integrar uma equipa similar, com sucesso.

O estágio decorreu no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC) e teve a duração de cerca de 8 meses. No decorrer do estágio, foram abordadas metodologias de citogenética convencional e citogenética molecular bem como biologia molecular e genómica, no contexto de diagnóstico pré e pós-natal, e foi possível acompanhar/compreender as diferentes fases do processo laboratorial: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica. Os principais objetivos foram:

- Desenvolver competências para aplicação no contexto da Genética Clínica Laboratorial;
- Ter a capacidade de definir a melhor estratégia de estudo para cada caso;
- Adquirir ferramentas para interpretar os resultados obtidos e elaborar relatórios clínicos;
- Aplicar as normas e boas práticas laboratoriais, compreender a regulamentação e os princípios éticos associados à comunicação dos resultados e aplicar as regras de nomenclatura das alterações cromossómicas, de acordo com o *International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN)*.

## 1.2. Caracterização do laboratório

O Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC) iniciou a sua atividade na área do Diagnóstico Genético Pré e Pós-Natal, no início da década de 90, e foi reconhecido pela Direção Geral de Saúde (DGS) como o Laboratório Público com maior número de diagnósticos estudados. É um laboratório composto por um grupo dinâmico, multidisciplinar, empreendedor e dedicado, dirigido pela Professora Doutora Isabel Marques Carreira, e é constituído por um grupo de técnicos especializados e reconhecidos pela Administração Central do Sistema de Saúde (ACSS), sendo que 9 deles são, ainda, reconhecidos como Especialistas Europeus em Genética Clínica Laboratorial, pelo *European Board of Medical Genetics* da *European Society of Human Genetics* (EBMG-ESHG).

Devido ao facto de estar inserido numa Universidade, o Laboratório, para além de ter a vertente de diagnóstico, está envolvido em diversos projetos de investigação (que compreendem diferentes áreas) e na formação pedagógica em diversas áreas como a medicina, biologia, bioquímica, psicologia, entre outras.

Os testes genéticos disponibilizados pelo Laboratório incluem: Citogenética Convencional, Citogenética Molecular (FISH), Biologia Molecular (Extração de DNA, diferentes PCR, Diagnóstico da Síndrome de X-frágil, MLPA, MS-MLPA), Genómica (array-CGH) e *NGS* (Rastreamento Pré-Natal Não-Invasivo (NIPT)). Estes testes dão resposta a diversas situações clínicas, incluindo: diagnóstico pré-natal, diagnóstico pós-natal, infertilidade, atraso de desenvolvimento psicomotor, autismo, diferentes alterações de comportamento, entre outros.

O LCG-FMUC integra um sistema de gestão de qualidade que combina o controlo de qualidade interno diário e o controlo de qualidade externo (UK NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*) e, estruturalmente, está dividido em várias secções de trabalho, sendo que, primeiramente, existe um local onde é feita a receção e registo dos dados da amostra e, posteriormente, as amostras serão processadas em diferentes salas (providas de diversos equipamentos, específicos e necessários para a realização dos vários testes genéticos) consoante o estudo requerido.

## **Capítulo II – Citogenética e Genómica (perspetiva histórica)**

A Citogenética é o ramo da Biologia que estuda o material genético a nível celular, analisando tanto o número e estrutura dos cromossomas bem como as alterações, a hereditariedade e as patologias associadas (Lawce e Brown, 1997).

Historicamente, a Citogenética surgiu em 1879 com a primeira descrição de cromossomas humanos, feita por J. Arnold (Arnold, 1879). Em 1882, Walter Flemming visualizou, pela primeira vez, cromossomas humanos (Flemming, 1882) e, em 1900, foi elaborada, por Sutton e Boveri, a teoria da hereditariedade cromossómica.

Já em 1952, Hsu sugeriu que a análise dos cromossomas seria mais fácil através do estudo de culturas celulares em vez de secções histológicas e, baseando-se nesse princípio, examinou culturas celulares embrionárias e obteve metafases mitóticas e um ideograma com 48 cromossomas humanos (Hsu, 1952). No entanto, foi em 1956, que Tijo e Levan estabeleceram, de forma correta e inequívoca, que o complemento cromossómico humano normal era composto por 46 cromossomas (Tijo e Levan, 1956).

Mais tarde (em 1959), Lejeune, Gautier e Turpin observaram um pequeno cromossoma extra (cromossoma supranumerário) em metafases de fibroblastos, provenientes de indivíduos com Síndrome de Down, e ficou identificada a primeira alteração cromossómica (trissomia 21) (Gautier e Turpin, 1958). Nesse mesmo ano, foram identificadas outras alterações cromossómicas, nomeadamente a Síndrome de Turner (45,X) e a Síndrome de Klinefelter (47,XXY) (Jacobs e Strong, 1959) e, em 1960, Patau e Edwards diagnosticaram as trissomia 13 e 18, respetivamente (Patau *et al.*, 1960; Edwards *et al.*, 1960). Já em 1964, Lejeune descreveu a primeira alteração cromossómica estrutural, denominada Síndrome de Cri-du-Chat (Lejeune *et al.*, 1964).

Em 1966, Steele e Breg afirmaram que células de líquido amniótico cultivadas podiam ser utilizadas para determinar a constituição cromossómica do feto (Smeets, 2004). Contudo, só em 1969 é que se começou a recorrer à amniocentese para se fazer o diagnóstico fetal e foi assim que se iniciou a Citogenética em Diagnóstico Pré-natal (Trask, 2002; Wieacker e Steinhard, 2010).



Embora os avanços das técnicas analíticas tenham facilitado o estudo dos cromossomas, ainda não era possível identificá-los individualmente, pelo que não existiam muitas alterações cromossômicas estruturais descritas até ao momento e isso fez com que a citogenética clínica ficasse estagnada. Até que, na década de 70, surgiu a primeira técnica de bandagem cromossômica, descrita por Caspersson, usando marcadores fluorescentes, nomeadamente mostarda de quinacrina, recorrendo à microscopia de fluorescência, designada por QFQ (Bandas Q obtidas por Fluorescência usando Quinacrina) pelo *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN). Desta forma, foi possível obter um padrão de bandas único, característico de cada par cromossômico (Caspersson *et al.*, 1968).

No entanto, apesar de inovadora, esta técnica era demorada e dispendiosa, pelo que era importante desenvolver métodos mais acessíveis/simples. Assim, mais tarde, foram surgindo várias técnicas de bandagem, nomeadamente a bandagem G, R, C e AgNOR (Moore e Best, 2001; Kannan e Zifalil, 2009).

Todas estas descobertas e técnicas desenvolvidas permitiram estudar os cromossomas por microscopia ótica e identificar alterações cromossômicas numéricas e estruturais (equilibradas e desequilibradas), com um limite mínimo de resolução de 5-10 Mb, bem como situações de mosaicismo, através da Citogenética Convencional (Silva *et al.*, 2019).

A ciência e as tecnologias foram evoluindo ao longo dos anos e, com isso, surgiu uma nova técnica que combinava a citogenética convencional com técnicas moleculares, chamada de Citogenética Molecular.

O princípio base das técnicas de citogenética molecular consiste no facto das sequências de nucleótidos complementares hibridizarem entre si e formarem complexos mais estáveis do que as sequências não complementares (Speicher e Carter, 2005). Teve início em 1969, com a primeira experiência de hibridização *in situ* descrita, cujo objetivo era identificar e localizar sequências específicas recorrendo a isótopos radioativos (Gall e Pardue, 1969). No entanto, esta técnica foi rapidamente substituída por técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que utilizam sondas não radioativas marcadas com fluorocromos (Speicher e Carter, 2005).

A citogenética molecular, nomeadamente a *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH), veio colmatar lacunas existentes em citogénica convencional, tais como a identificação de alterações cromossómicas submicroscópicas. A sua introdução na prática clínica aumentou substancialmente o nível de resolução no diagnóstico de rearranjos cromossómicos estruturais (Speicher e Carter, 2005).

A FISH é uma técnica direcionada que se baseia na hibridização *in situ* entre uma sonda de DNA marcada com um fluorocromo e uma sequência de DNA específica no cromossoma alvo, permitindo a visualização de um sinal através de um microscópio de fluorescência. As sondas podem hibridizar em cromossomas em metafase, células em interfase ou em fibras de cromatina (Speicher e Carter, 2005; Kannan e Zifalil, 2009).

Comparando as técnicas, a citogenética convencional tem como vantagem o estudo simultâneo de todos os cromossomas, permitindo a deteção de alterações numéricas ou estruturais. No entanto, tem algumas desvantagens como o facto de: demorar na emissão de um resultado devido à necessidade de cultura celular para se obter o maior número de células em divisão, ser necessário pessoal altamente treinado e qualificado e ter uma resolução relativamente limitada, não sendo possível detetar alterações de tamanho inferior a 3-5 Mb, que correspondem a cerca de 15% das doenças genéticas (ACOG, 2009).

Em contrapartida, a citogenética molecular permite a deteção de alterações cromossómicas mais pequenas (não detetáveis por citogenética convencional), visto que tem um maior poder de resolução e, ainda, permite a deteção de alterações cromossómicas em mosaico. A FISH é uma técnica simples e sensível e pode ser realizada em vários tipos de tecidos, tanto em células em metafase como interfase, pelo que consegue oferecer um resultado mais rapidamente quando se trata de núcleos interfásicos, tendo em conta que não há a necessidade de se estabelecer cultura (Riegel, 2005).

Em relação às desvantagens, a FISH é bastante dispendiosa e a sua análise é complexa. Para além disso, é uma técnica direcionada, ou seja, analisa um número limitado de *loci* no genoma, recorrendo apenas a sondas específicas para as regiões em estudo, não permitindo a avaliação de todo o genoma. Como tal, é utilizada apenas quando existe uma suspeita clínica precisa, para que se possa identificar a presença ou

ausência da zona genômica associada à patologia suspeita (Binns e Hsu, 2002; Bishop, 2010; Machado *et al.*, 2012; Ribeiro *et. al.*, 2018).

Ainda assim, estas técnicas continuavam a ser demoradas, difíceis de automatizar e não davam resposta a todas as situações, pelo que era importante desenvolver tecnologias mais específicas e com maior poder de resolução para responder a casos mais complexos.

Dado o desenvolvimento tecnológico e científico, nos últimos anos surgiram inúmeras técnicas que levaram a um diagnóstico mais preciso, nomeadamente *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR), *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), *Methylation-Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MS-MLPA), *Array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH) e *Next Generation Sequencing* (NGS). Estas técnicas têm contribuído para o estudo do genoma de uma forma mais sensível e abrangente, sendo possível detetar alterações cromossômicas que não eram detetáveis até então e estabelecer novas relações genótipo-fenótipo.

O QF-PCR, MLPA e aCGH permitem avaliar variações no número de cópias. Já as metodologias de NGS são mais detalhadas e permitem sequenciar milhões de pequenos fragmentos de DNA em simultâneo, sendo possível detetar alterações da sequência de DNA comparando com uma referência (Ribeiro *et. al.*, 2018).

Posto isto, as técnicas de citogenética e genómica complementam-se entre elas. Ambas podem ser aplicadas em contexto de diagnóstico pré e pós-natal. A escolha da técnica mais adequada depende do tipo de estudo pretendido e da indicação clínica.

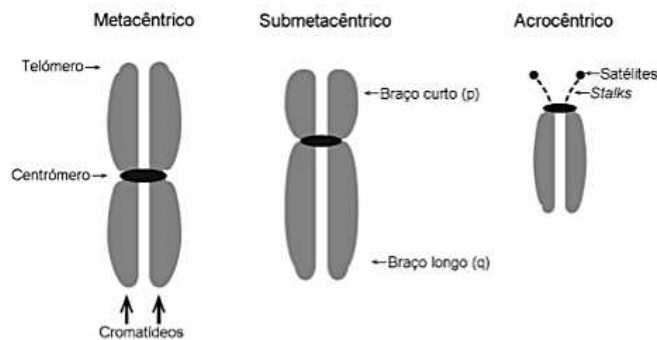
## Capítulo III – Cromossomas e divisão celular

### 3.1. Estrutura do cromossoma

Os cromossomas são constituídos por DNA e proteínas e encontram-se dispersos no núcleo das células. Cada célula humana é composta por 23 pares de cromossomas (22 pares de autossomas e 1 par de cromossomas sexuais).

Cada cromossoma é composto por dois cromátídeos-irmãos formados por DNA de dupla hélice compactado e, estruturalmente, tem várias regiões específicas: o braço curto (p), o braço longo (q), o centrómero, os telómeros e, ainda, os *stalks* dos satélites, existentes nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos, que contêm as regiões organizadoras do nucléolo (NOR) (Figura 1).

Adicionalmente, os cromossomas podem ser classificados segundo o tamanho, posição do centrómero (em metacêntricos, submetacêntricos ou acrocêntricos) e padrão de bandas, formando um cariógrama. A indicação do número de cromossomas e dos cromossomas sexuais é designada por cariótipo e permite registar as alterações cromossômicas eventualmente encontradas (Keagle, 2013) (Figura 1).



**Figura 1** – Representação esquemática de um cromossoma e a sua classificação consoante a posição do centrómero. Adaptado de Keagle (2013).

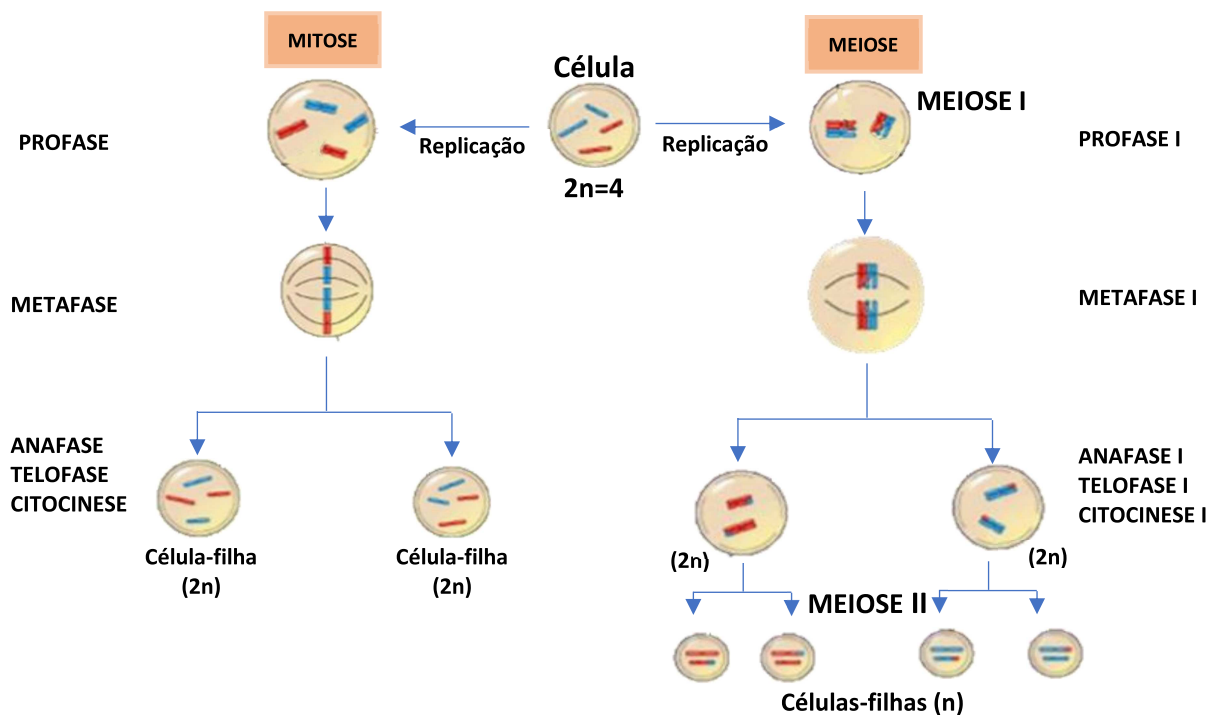
### 3.2. Divisão celular

Para realizar estudos cromossômicos, é necessário obter células em divisão (metafase ou prometáfase). Do ponto de vista genético, a divisão celular desempenha um papel crucial na medida em que promove a transmissão da informação genética da célula-mãe para as células-filhas (Pierce, 2002).

Existem dois tipos de divisão celular: a mitose e a meiose. A mitose ocorre nas células somáticas e resulta em células-filhas com o mesmo número de cromossomas e informação genética da célula-mãe. A divisão mitótica inclui a profase, prometáfase, metafase, anafase, telofase e citocinese. O processo total da mitose, dessa forma, assegura a duplicação e distribuição ordenada do genoma por sucessivas divisões celulares (Pierce, 2002) (Figura 2).

A meiose ocorre apenas nas células da linha germinativa, dando origem aos gametas. Este processo envolve uma duplicação do DNA e duas divisões celulares (Meiose I e Meiose II), que reduzem o número de cromossomas do número diplóide ( $2n=46$ ) para o número haplóide ( $n=23$ ). Assim, cada gameta produzido contém apenas uma cópia de cada cromossoma. Após a fecundação, o número diplóide é restabelecido no zigoto (Keagle, 2013) (Figura 2).

Muitas alterações cromossômicas advêm de erros na divisão celular (nomeadamente, erros no *crossing-over* e não-disjunção na meiose). Estes erros podem levar à formação de um indivíduo ou de uma linhagem celular com cromossomas a mais ou a menos e, conseqüentemente, a quantidade de material genómico será diferente. Para além disso, a não-disjunção mitótica também contribui para doenças genéticas (Pierce, 2002).

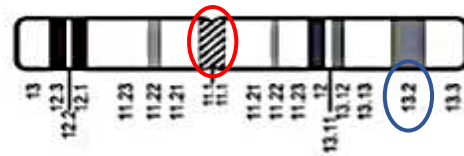


**Figura 2** – Esquemas exemplificativos dos mecanismos da Mitose e Meiose. Adaptado de Keagle (2013).

### 3.3. Nomenclatura

Quando Tjio e Levan reportaram o número correto de cromossomas, surgiu a necessidade de desenvolver uma nomenclatura com um conjunto de normas e *guidelines* específicas que permitissem descrever os cromossomas humanos e as alterações cromossômicas de uma forma clara e universal, para uma melhor compreensão. Assim, em 1960, um grupo de investigadores criou uma nomenclatura conhecida como *Internacional System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN). Esta ferramenta é o método de escrita utilizado para descrever alterações cromossômicas.

A descrição deve ter em consideração o cromossoma, o braço, a região e a banda e deve ser escrita sem qualquer espaço (ISCN, 2020) (Figura 3).



**Figura 3** – Ideograma do cromossoma 20, com uma resolução de 700 bandas e um padrão de bandas G. As bandas escuras representam as bandas G positivas e as bandas claras são G negativas. A heterocromatina está representada com riscas (círculo vermelho). Exemplo de descrição da região 13.2 (círculo azul) do cromossoma 20: 20q13.2 (cromossoma 20, braço longo, região 1, banda 3, sub-banda 2). Adaptado de McGowan-Jordan *et al.* (2016).

## Capítulo IV – Alterações cromossômicas

O principal objetivo da citogenética clínica é diagnosticar alterações cromossômicas. Estas representam uma grande porção das doenças humanas, afetando 1% dos nados-vivos, 2% das gestações de mulheres com mais de 35 anos, 50% de todos os abortos espontâneos no primeiro trimestre e são, ainda, responsáveis por diversas síndromes (Khandekar *et al.*, 2012).

As alterações cromossômicas podem envolver apenas os autossomas, os cromossomas sexuais ou ambos. Para além disso, podem ser classificadas como constitucionais (existem já no embrião) ou adquiridas (surtem no decorrer da vida do indivíduo) e dividem-se em dois tipos: alterações numéricas e alterações estruturais (Gardner e Sutherland, 2004).

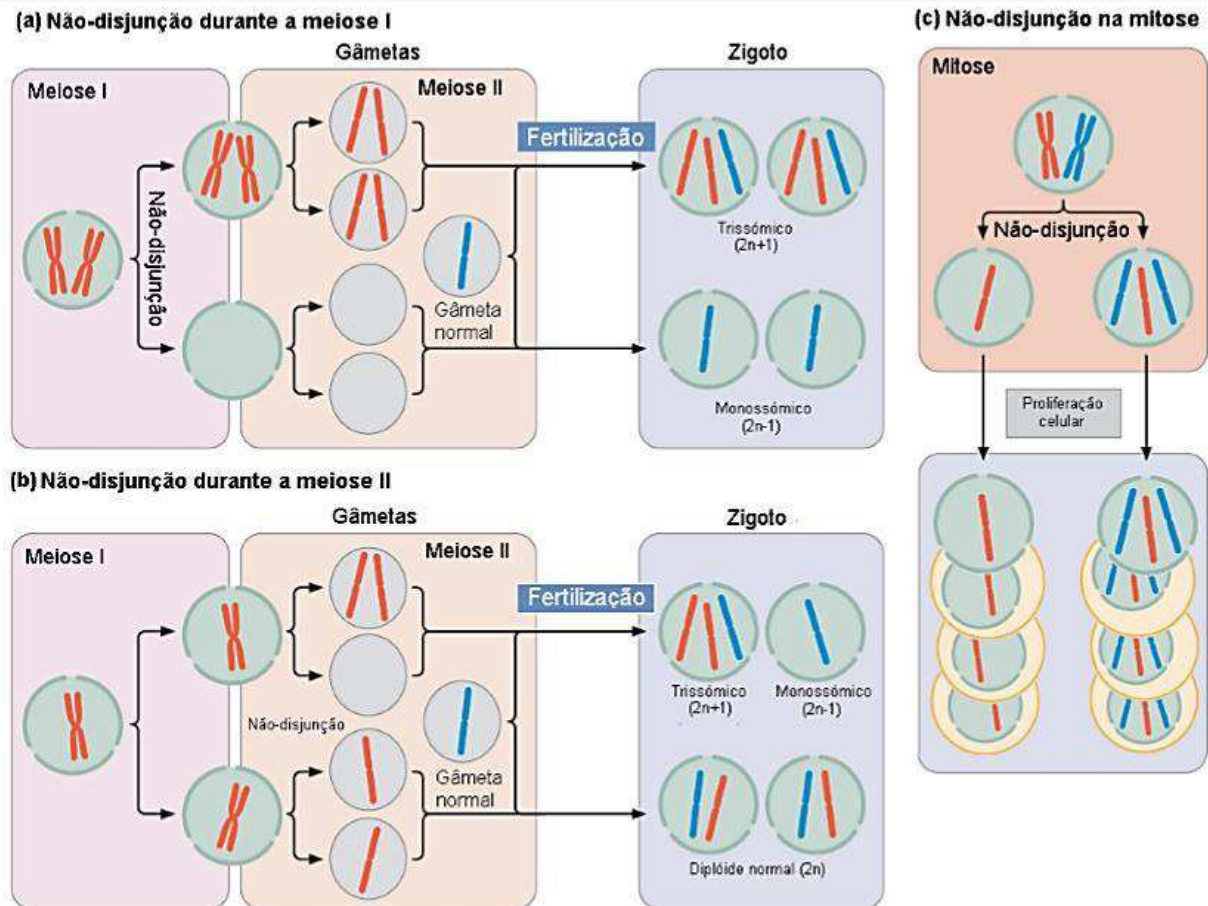
### 4.1. Alterações cromossômicas numéricas

As alterações cromossômicas numéricas resultam da variação do número de cromossomas e são a principal causa de abortos e malformações congénitas (Hassold *et al.*, 1996). Podem ser divididas em dois grupos: euploidias e aneuploidias.

As euploidias correspondem a alterações no genoma que envolvem conjuntos completos de cromossomas, ou seja, variações em que o número de cromossomas é múltiplo do número haplóide e ocorrem, maioritariamente, sob a forma de triploidia ou tetraploidia (Wang, 2013; Kaiser-Rogers, 2017). Já as aneuploidias envolvem a perda ou ganho de um ou mais cromossomas e dividem-se em: trissomia (3 cópias de um cromossoma) e monossomia (apenas 1 cópia de um cromossoma). O mecanismo biológico das aneuploidias é a não-disjunção meiótica ou mitótica (Wang, 2013; Kaiser-Rogers, 2017).

Atualmente, as aneuploidias autossômicas com maior prevalência em nados-vivos incluem a trissomia 13 (Síndrome de Patau), trissomia 18 (Síndrome de Edwards) e trissomia 21 (Síndrome de Down). No que diz respeito às aneuploidias dos cromossomas sexuais, as mais comuns são a monossomia do X (Síndrome de Turner), trissomia XXY (Síndrome de Klinefelter), trissomia XXX e trissomia XYY (Gardner e Sutherland, 2004).

A etiologia deste tipo de alterações cromossômicas é extremamente variável e está principalmente associada a erros durante a divisão celular (não-disjunção cromossômica ou cromatídica na meiose/mitose), resultando na segregação anormal dos cromossomas e, conseqüentemente, num zigoto com uma alteração constitucional (Hassold e Hunt, 2001; Benn e Hsu, 2004; Khandekar *et al.*, 2012) (Figura 4).



**Figura 4** – Representação esquemática da não-disjunção meiótica e mitótica. **(a)** A não-disjunção durante a meiose I origina gametas disômicos e nulissômicos que, após a fertilização com gametas normais, vão originar zigotos trissômicos ( $2n+1$ ) e monossômicos ( $2n-1$ ); **(b)** A não-disjunção durante a meiose II origina 2 gametas normais, um nulissômico e um disômico que, após fertilização, podem originar zigotos trissômicos, monossômicos ou células diplóides normais; **(c)** A não-disjunção mitótica origina 2 linhas celulares (trissômica e monossômica). Adaptado de Pierce (2009).

## 4.2. Alterações cromossômicas estruturais

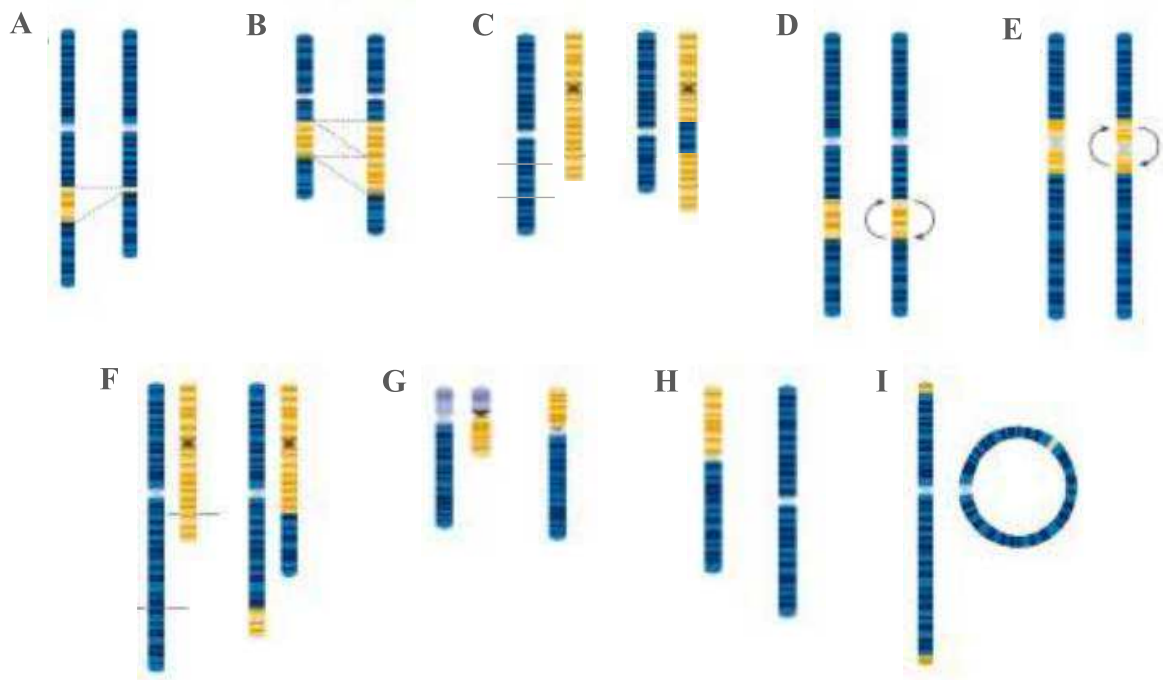
As alterações cromossômicas estruturais envolvem quebras cromossômicas ou *crossing-over* desigual que resultam em perdas, ganhos ou mudança de posição de determinados segmentos cromossômicos, levando ao aparecimento de um cromossoma alterado, mas sem variação do número total de cromossomas. Estas alterações podem



ocorrer *de novo* ou serem herdadas e dividem-se em: alterações estruturais equilibradas (se o conjunto de cromossomas possuir toda a informação genética normal, embora em posição diferente) e alterações estruturais desequilibradas (se o conjunto de cromossomas tiver informação genética adicional ou ausente) (Moore e Best, 2001; Thompson e Thompson, 2015).

Dentro das alterações estruturais equilibradas, fazem parte as translocações, inversões e inserções (Figura 5). Estas não estão, geralmente, associadas a manifestações clínicas no portador. Contudo, podem ter graves consequências clínicas para a descendência, dado que existe maior probabilidade de ocorrerem erros de segregação durante a gametogénese que levam à formação de gâmetas com alterações cromossómicas desequilibradas.

Já as alterações estruturais desequilibradas incluem deleções, duplicações, cromossomas marcadores, isocromossomas ou cromossomas em anel e estão, frequentemente, associadas a manifestações clínicas no portador (Thompson e Thompson, 2015) (Figura 5).



**Figura 5** – Exemplos esquemáticos de alterações cromossômicas estruturais. **A)** Deleção; **B)** Duplicação; **C)** Inserção; **D)** Inversão paracêntrica; **E)** Inversão pericêntrica; **F)** Translocação recíproca; **G)** Translocação robertsoniana; **H)** Isocromossoma; **I)** Cromossomo em anel. Adaptado de Nascimento *et al.* (2021).

### **4.3. Mosaicismo**

O termo mosaicismo refere-se à presença de duas ou mais linhagens celulares num indivíduo ou amostra tecidual e resulta de erros de não-disjunção durante a mitose. Quanto mais cedo ocorrer o erro mitótico, maiores poderão ser as implicações clínicas (Kaiser-Rogers, 2017).

O mosaicismo tanto pode ser numérico como estrutural (embora seja menos comum) e é detetável por citogenética convencional, FISH em interfase e aCGH.

Existem vários tipos de mosaicismo, nomeadamente mosaicismo verdadeiro, pseudomosaicismo e mosaicismo confinado à placenta.

O mosaicismo verdadeiro diz respeito à presença de uma alteração cromossómica em várias células e em linhas celulares diferentes. Já o pseudomosaicismo é quando se encontra uma alteração cromossómica numa única linha celular. Pode ser considerado um fenómeno de cultura. O mosaicismo confinado à placenta consiste na presença de uma alteração cromossómica presente apenas no tecido placentar, sendo que o feto não apresenta essa alteração (Thompson e Thompson, 2015).

A interpretação de uma situação de mosaico é muito complexa, especialmente em pré-natal, porque o seu impacto tem um espectro muito variável e depende da altura em que ocorreu o erro de segregação, da alteração cromossómica, das proporções dos diferentes complementos cromossómicos e dos tecidos afetados (Thompson e Thompson, 2015).

## Capítulo V – Diagnóstico Pré-Natal

O Diagnóstico Pré-Natal (DPN), desde a sua introdução, em 1966, por Steele e Breg, tem vindo a assumir um papel preponderante na deteção de alterações genéticas antes do nascimento com a ajuda de técnicas imagiológicas (sobretudo ecografia) e de vários testes de genética clínica laboratorial (Gardner e Sutherland, 2004).

O DPN é um “conjunto de procedimentos com o intuito de determinar se um embrião ou feto é portador ou não de uma anomalia congénita” (Despacho nº 5411/ 97 de 6 de agosto) e tem demonstrado ser essencial na deteção precoce de diversas anomalias no feto, nomeadamente malformações congénitas e doenças genéticas resultantes de alterações cromossómicas que, de outra forma, só seriam detetáveis após o nascimento (Diário da República, 2007; Gardner e Amor, 2018).

O DPN é muito importante, pois a sua realização contribui para perceber atempadamente se o feto tem alguma anomalia (defeito congénito/distúrbio genético), para tomar uma decisão quanto ao decurso da gravidez em tempo útil, após consultas de aconselhamento genético, e para diminuir a ansiedade de um casal em gravidezes de alto risco (Binns e Hsu, 2002).

Por um lado, se o casal optar por prosseguir com uma gravidez, é dada a oportunidade de se antecipar/programar a estratégia de tratamento da mesma e de se prepararem psico, socio, médica e financeiramente (se possível) para os cuidados pós-natais que serão necessários (Nussbaum *et al.*, 2004; Gardner e Sutherland, 2004).

Por outro lado, poderá ser oferecida a opção da interrupção médica da gravidez (IMG), após uma avaliação da situação pela comissão de ética e técnica, e o casal poderá decidir não prosseguir com a mesma. A interrupção médica da gravidez, em Portugal, pode ser realizada até às 24 semanas de gestação em caso de haver seguros motivos de que o feto possa vir a sofrer de uma doença grave ou malformação congénita incuráveis, segundo o Artigo nº 142 da Lei nº16/2007. Pode, ainda, ser feita depois das 24 semanas, se for uma situação incompatível com a vida (Diário da República, 2007).

A informação sobre o feto é obtida a partir de estudos pré-natais não-invasivos e invasivos, sendo que os primeiros são testes de rastreio (onde se incluem as ecografias,

o exame bioquímico e o *Non-Invasive Prenatal Testing* (NIPT)) e os segundos são de diagnóstico.

Os testes de rastreio permitem calcular o risco de um feto para uma alteração cromossômica ou anomalia congênita e estão disponíveis para todas as grávidas (à exceção do NIPT, maioritariamente no primeiro trimestre). Caso o risco seja elevado, é feito DPN com testes invasivos para detetar a presença (ou não) de uma anomalia no feto (Wieacker e Steinhard, 2010; Carlson e Vora, 2017).

## **5.1. Testes não-invasivos**

### **5.1.1. Ecografia**

As ecografias são feitas, sempre que necessário, no decurso da gestação e permitem determinar, com grande precisão, a idade gestacional, monitorizar o crescimento do feto ao longo da gravidez e são muito importantes para a deteção de malformações fetais (associadas a causa genética ou não) (Wieacker e Steinhard, 2010).

Na grande maioria, são feitas 3 ecografias (uma em cada trimestre). A 1ª ecografia (realizada entre as 11 e as 13 semanas) é fundamental para a avaliação da idade gestacional, do número de fetos, da sua vitalidade e desenvolvimento. De entre vários parâmetros avaliados, destacam-se a translucência da nuca (TN), em que é medida a espessura da parte posterior do pescoço do feto para avaliar se existe acumulação de líquido nessa região (e o valor deve ser inferior a 3 mm) e a presença/ausência dos ossos do nariz. No 2º trimestre, faz-se uma ecografia morfológica (entre as 18 e 23 semanas de gestação) para avaliar, de um modo sistemático, todas as estruturas anatómicas/órgãos do feto e analisar, de forma mais pormenorizada, se existem anomalias fetais. Por fim, a ecografia do terceiro trimestre é realizada entre as 28 e 32 semanas de gestação e serve, essencialmente, para avaliar o crescimento e peso fetal e fazer uma reavaliação morfológica (Nussbaum *et al.*, 2004; Callaway *et al.*, 2013).

### **5.1.2. Rastreio bioquímico**

O rastreio bioquímico pode ser realizado tanto no primeiro como no segundo trimestre da gravidez e tem como objetivo quantificar a concentração de algumas proteínas no sangue materno e avaliar os resultados.

No primeiro trimestre, são quantificados, entre outros marcadores séricos, a subunidade  $\beta$  da gonadotrofina coriônica humana ( $\beta$ -hCG) e a proteína plasmática associada à gravidez (PAPP-A), presentes no sangue materno e, no segundo trimestre, para além dos mencionados anteriormente, são também quantificados os valores da  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), inibina-A e estriol não conjugado (uE3). Estes três últimos biomarcadores são muito importantes para o cálculo de risco de o feto ter alguma das trissomias mais comuns ou ter defeitos no tubo neural (Binns e Hsu, 2002; Nussbaum *et al.*, 2004; Pennings *et al.*, 2009).

O rastreio combinado do primeiro trimestre (ecografia e rastreio bioquímico) é, atualmente, aceite como um método eficaz para o rastreio das aneuploidias mais comuns, nomeadamente as trissomias 13,18 e 21. No entanto, visto que se trata apenas de um rastreio, esta avaliação não permite afirmar que o feto tem (ou não) uma alteração cromossómica. Apenas permite avaliar a gravidez e classificá-la num de 2 grupos: gravidez de alto risco ou de baixo risco (Collins e Impey, 2012).

### **5.1.3. Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT)**

O teste pré-natal não-invasivo (NIPT) é um teste de rastreio molecular que utiliza o DNA fetal livre (cfDNA), presente no sangue da mãe, para detetar a presença (ou não) de aneuploidias mais comuns (nos cromossomas 13,18 e 21). Adicionalmente, fornece informações sobre os cromossomas sexuais (Carlson e Vora, 2017).

Esta técnica tem uma elevada sensibilidade e especificidade e é um procedimento simples. Contudo, é uma técnica de NGS, pelo que requer um equipamento e formação especializados.

Caso os testes não-invasivos considerem que a gravidez é de alto risco, deve-se prosseguir para testes de DPN invasivos. As técnicas invasivas mais utilizadas são: biópsia das vilosidades coriônicas, amniocentese e cordocentese. Estas técnicas são realizadas sob controlo ecográfico e estão associados a risco de perda fetal, embora este seja cada vez mais baixo face à prática dos médicos obstetras que as fazem (Gardner e Sutherland, 2004).

Apesar de diferentes entre si, as técnicas de DPN invasivo têm como objetivo comum obter uma amostra biológica do feto, fazer estudos biológicos através de técnicas de citogenética, genética molecular ou genómica e avaliar a possibilidade de o feto ter alguma alteração genética, obtendo um diagnóstico.

Antes de se executar qualquer exame invasivo, deverá ser realizada uma consulta de aconselhamento genético, onde é dada a informação da utilidade e limitações do exame a realizar e a avaliação dos riscos inerentes à técnica escolhida para detetar/excluir a presença de determinada anomalia fetal. A decisão de prosseguir, ou não, com o teste invasivo é do casal ou da gestante.

## **5.2. Testes invasivos**

### **5.2.1. Biópsia das Vilosidades Coriônicas (BVC)**

A biópsia das vilosidades coriônicas (BVC) é realizada entre as 10 e 14 semanas de gestação, quando existe um risco elevado para cromossomopatias/doenças genéticas, e está associada a um risco de perda fetal de 2 a 5% (Thompson e Thompson, 2015).

Envolve a colheita e análise de uma amostra de trofoblasto (vilosidades coriônicas), que é efetuada a partir da inserção intra-uterina de um cateter por via transabdominal ou transcervical, orientada ecograficamente (Figura 6), e a separação do material materno do material fetal é feita à lupa (Milunsky, 1998).

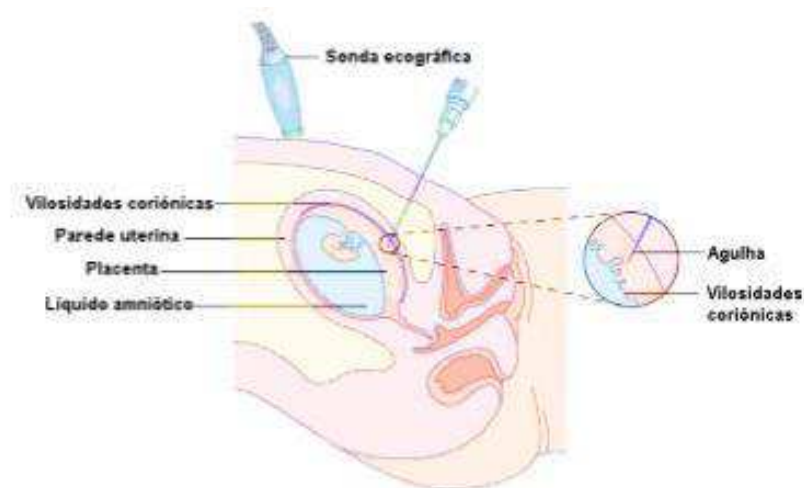
A grande vantagem da BVC é que esta é feita no 1º trimestre, o que permite obter resultados numa fase inicial da gravidez e reduzir a ansiedade do casal. Na eventualidade de se detetar alguma alteração, o casal poderá optar pela interrupção

médica da gravidez ainda no primeiro trimestre (que é um procedimento mais simples do que no segundo trimestre de gestação) (Gardner e Sutherland, 2004).

Uma das grandes limitações desta técnica é a presença de mosaicos, que dificultam a análise e levam a resultados ambíguos (Gardner e Sutherland, 2004).

A probabilidade de encontrar um mosaicismo confinado à placenta numa biópsia das vilosidades coriônicas é de 1-2% e esta situação pode não permitir o diagnóstico correto, visto que uma alteração encontrada numa amostra de trofoblasto pode não corresponder à constituição cromossômica do feto, mas sim da placenta (Gardner e Sutherland, 2004).

Quando os resultados são ambíguos, é necessário recorrer a uma amniocentese para avaliar se o feto tem alguma alteração cromossômica.



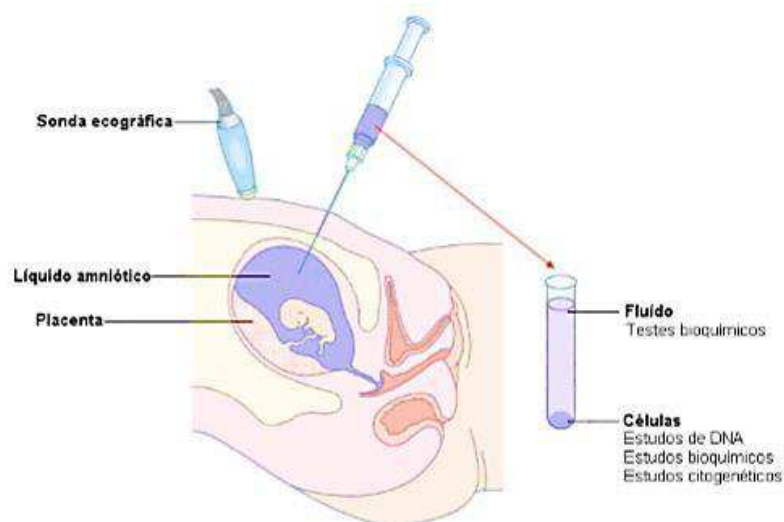
**Figura 6** – Representação de uma colheita de vilosidades coriônicas (BVC) transabdominal com o auxílio de uma sonda ecográfica e uma agulha. Adaptado de Binns e Hsu (2002).

### 5.2.2. Amniocentese

A amniocentese é o teste invasivo mais utilizado e deve ser realizada, preferencialmente, entre as 15 e 17 semanas de gestação, por ser um período em que existem células fetais em número razoável e em que os riscos de perda fetal e/ou morbidade associados à técnica são menores (Wieacker e Steinhard, 2010).

Esta técnica consiste na obtenção de uma amostra de líquido amniótico via transabdominal através da punção da cavidade amniótica, sob o controlo ecográfico, de forma a evitar o contacto da agulha com o feto, para posterior estudo dos cromossomas, quantificações enzimáticas ou análises de DNA (Figura 7). Visto que se trata de um método invasivo, existe um risco de perda fetal, embora este seja muito baixo (0,2%) (Gardner e Sutherland, 2004).

A grande vantagem da amniocentese é que a probabilidade de encontrar um mosaico é muito baixa (0,01%), o que simplifica tanto a análise como uma adequada relação genótipo-fenótipo.



**Figura 7** – Representação de uma amniocentese transabdominal com o auxílio de uma sonda ecográfica e uma agulha. Adaptado de Binns e Hsu (2002).

### 5.2.3. Cordocentese

A cordocentese é um tipo de teste realizado numa fase mais avançada da gravidez (a partir das 20 semanas de gestação) e baseia-se na obtenção de sangue fetal diretamente do cordão umbilical, com auxílio ecográfico minucioso para localizar a região de implantação do cordão na placenta (Wieacker e Steinhard, 2010; Collins *et al*, 2012) (Figura 8).

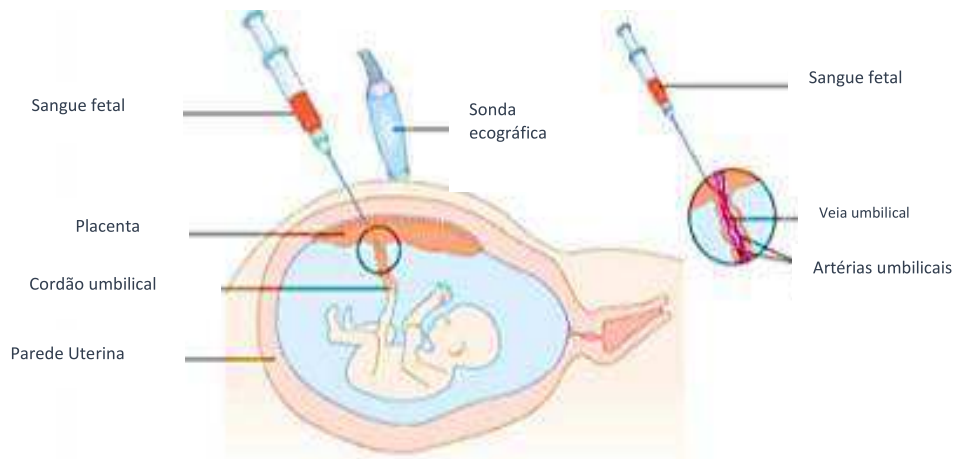
É considerada uma técnica com um risco mais elevado que a BVC ou a amniocentese, visto que o risco de aborto é maior do que as outras técnicas (de 1 a 5%) (Gardner e Sutherland, 2004).



Atualmente, apenas se realiza uma cordocentese quando: a amniocentese foi inconclusiva, há suspeita de mosaicismo no líquido amniótico ou quando se encontra um problema numa fase mais tardia da gravidez e é necessário um resultado rápido (3-4 dias) para estar dentro do prazo legal para a IMG.

Existem várias limitações desta técnica como, por exemplo, a pouca visibilidade da agulha no momento da colheita, visto que é feita no local que une o cordão umbilical e a placenta, tornando complicada a visualização ecográfica da agulha nesta região, o que pode levar a perdas de sangue caso não seja colhida corretamente. Para além disso, a posição da placenta poderá ter influência no acesso ao cordão, poderá haver uma rutura precoce das membranas devido à técnica, um hematoma ou trombose do cordão umbilical ou contaminação materna.

A cordocentese é, várias vezes, utilizada dado que serve para diagnosticar doenças infeto-contagiosas/hematológicas através da medição das variações de determinados fatores sanguíneos fetais (Binns e Hsu, 2002). É importante analisar a quantidade de hemoglobina fetal para dar ao laboratório uma maior segurança de que está a processar uma amostra de sangue fetal.



**Figura 8** – Representação de uma cordocentese com o auxílio de uma sonda ecográfica e uma agulha. Adaptado de Binns e Hsu (2002).

O Diagnóstico pré-natal não é acessível a todas as grávidas, contrariamente aos testes de rastreio, visto que têm risco de perda fetal. É necessário haver uma razão para se fazer DPN invasivo (Rooney, 2001; Nussbaum *et al.*, 2004; Valayatham *et al.*, 2013).

As indicações clínicas mais comuns para procedimentos invasivos em diagnóstico pré-natal estão descritas nas *guidelines* internacionais e incluem:

- Risco elevado para trissomias;
- Anomalias ecográficas ou sinais ecográficos de alerta;
- Teste de rastreio pré-natal (bioquímico e/ou ecográfico) positivo;
- Casal com filho/feto anterior com uma alteração cromossómica/doença genética;
- Progenitores portadores de uma alteração cromossómica estrutural, mosaïcismo ou aneuploidia dos cromossomas sexuais;
- História familiar de uma determinada doença genética;
- Infecção materna por agentes patogénicos.

## **Capítulo VI – Metodologias das técnicas citogenéticas e moleculares**

A prática laboratorial pode ser dividida em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica inclui a requisição, identificação, colheita, transporte, recepção e preparação da amostra no laboratório para o estudo a realizar. Já a fase analítica corresponde à análise da amostra, onde são feitos procedimentos laboratoriais. Por fim, a fase pós-analítica diz respeito à validação e interpretação dos resultados, elaboração de relatórios, emissão de resultados e armazenamento das amostras.

### **6.1. Fase Pré-Analítica**

A fase pré-analítica corresponde a um conjunto de procedimentos, nomeadamente o pedido do teste, colheita e transporte da amostra e a sua recepção e preparação para as etapas seguintes no laboratório. Esta é a fase mais sujeita à ocorrência de erros, sendo os mais comuns a requisição ou transporte inadequado, má colheita e identificação incorreta da amostra (Carraro e Plebani, 2007; Lippi *et al.*, 2015). De modo a minimizar os erros, é crucial monitorizar cada etapa e confirmar toda a informação recebida.

#### **6.1.1. Colheita e identificação das amostras**

A forma como uma amostra é colhida e manuseada pode influenciar drasticamente o sucesso do estudo cromossómico e/ou molecular. Visto que estudos cromossómicos são apenas realizados em células com divisão ativa, é essencial que o laboratório receba amostras com “células vivas” e com capacidade proliferativa. Se os parâmetros para a colheita e manuseamento da amostra não forem respeitados, o crescimento celular em cultura e a qualidade das metafases resultantes podem ser comprometidos (Clouston, 2001).

O LCG-FMUC recebe, essencialmente, amostras de líquido amniótico, vilosidades coriônicas, sangue fetal do cordão umbilical, sangue periférico e amostras de pele.

As amostras de sangue periférico são o tecido de eleição para realizar estudos citogenéticos pós-natais, visto serem muito fáceis de obter e manusear. A colheita das

amostras difere consoante o tipo de estudo. Para realização de estudos citogenéticos, as amostras devem ser colhidas em tubos contendo heparina de sódio ou lítio. As amostras com indicação para estudos moleculares devem ser colhidas em tubos com EDTA (Clouston, 2001).

Para as amostras de líquido amniótico, é colhido 1ml de amostra por semana de gestação, distribuída por duas caixas de cultura estéreis, e devem ser transportadas o mais rapidamente possível à temperatura ambiente para o laboratório (Griffin, 2001).

Em amostras de vilosidades coriônicas e de tecidos, é necessário serem corretamente colhidas em tubos de cultura estéreis e com meio próprio.

Adicionalmente, as amostras de vilosidades coriônicas e de sangue do cordão umbilical devem vir acompanhadas de sangue materno em EDTA para se fazer o despiste de contaminação materna em fetos do sexo feminino (Keagle e Gersen, 2013).

Todas as amostras devem obedecer a critérios muito rigorosos de assepsia para que a cultura não seja comprometida e devem ser preservadas à temperatura ambiente durante o transporte e armazenamento, até serem processadas. Os sangues, se não forem processados no dia da colheita, devem ser mantidos, no máximo até 4°C (Keagle e Gersen, 2013).

Após as amostras serem colhidas e recebidas no laboratório, é necessário fazer o registo independente de cada amostra, atribuir um código, ver a requisição e colocar toda a informação administrativa e clínica relevante no sistema informático do laboratório.

A identificação das amostras é muito importante e deve ser verificada para confirmar se está tudo correto de modo a evitar erros e troca de amostras. O LCG-FMUC estabeleceu uma série de requisitos de colheita e envio de amostras e, por ser um laboratório certificado, tem instruções de trabalho para o registo das mesmas, com o objetivo de minimizar os erros inerentes (anexo 1).

## **6.2. Fase Analítica**

### **A – Citogenética Convencional**

#### **A1 – Cultura Celular**

A cultura celular é uma técnica laboratorial crucial para a obtenção de resultados por citogenética convencional, bem como para obtenção de DNA para a realização de outros testes (como, por exemplo, array-CGH). O principal objetivo de se estabelecer cultura é fornecer condições para que as células cresçam e se multipliquem. Pode-se estabelecer cultura 1 a 3 dias após a colheita. No entanto, os melhores resultados são obtidos quando estabelecidas até 24h após a colheita.

A obtenção de uma boa cultura celular depende de vários fatores, nomeadamente a escolha do meio de cultura, o pH, a temperatura e humidade, confluência celular e ausência de contaminações.

A escolha do meio de cultura é um fator muito importante e tem de ser adequado ao tipo de células para que forneça os componentes necessários para o crescimento celular.

A base dos meios de cultura é uma solução salina equilibrada, constituída por aminoácidos, vitaminas, L-glutamina, soro bovino fetal, antibióticos/fungicidas e fatores de crescimento, essencial para controlar o pH, pressão osmótica e para promover o crescimento celular (Boyle e Griffin, 2001; Keagle e Gersen, 2013).

O soro bovino fetal (FBS) é o suplemento sérico mais utilizado nos laboratórios de citogenética e é essencial para um bom crescimento celular, visto que fornece fatores de crescimento e hormonas às células (Boyle e Griffin, 2001). A concentração final deve variar entre os 10-30% no meio de cultura e deve ser extremamente controlada, visto que concentrações muito baixas não vão ter qualquer efeito, enquanto concentrações muito elevadas vão ser prejudiciais ao crescimento celular (Keagle e Gersen, 2013).

A L-Glutamina é um aminoácido essencial para o crescimento celular. É extremamente instável e transforma-se em D-Glutamina (forma não usada pelas células) quando armazenada à temperatura ambiente. A degradação da L-glutamina é

dependente da temperatura e do pH. Assim, a L-Glutamina deve ser distribuída em alíquotas e congelada de modo a manter a sua estabilidade e é aconselhável o seu descongelamento momentos antes de a adicionar à cultura (Boyle e Griffin, 2001; Keagle e Gersen, 2013).

O facto de os meios de cultura serem enriquecidos com nutrientes e outros componentes essenciais ao crescimento celular faz com que, conseqüentemente, seja potenciado o crescimento de fungos e bactérias, que podem levar à inviabilidade da cultura devido ao facto de poderem ser nocivos e de competirem com as células pelos nutrientes presentes no meio para conseguirem proliferar (Boyle e Griffin, 2001). Por esta razão, embora seja raro haver contaminação microbiana devido aos cuidados de assepsia, são adicionados antibióticos e/ou fungicidas ao meio de cultura para atrasar/impedir o crescimento de microrganismos (Boyle e Griffin, 2001).

Para além disso, para minimizar o risco de contaminações ou perda de culturas devido a uma falha da incubadora, cada amostra deve ser cultivada, se possível, em, pelo menos, duas culturas distintas, com meios de cultura diferentes e, preferencialmente, manipuladas e monitorizadas por pessoas distintas e mantidas em estufas diferentes, se possível, para minimizar riscos caso haja alguma falha (Hastings *et al.*, 2007).

A escolha do tipo de cultura depende do tipo de amostra em causa e da preferência do laboratório. As amostras de sangue periférico consistem em células individualizadas em suspensão. Para este tipo de amostras são utilizados tubos de centrifugação estéreis e são realizadas culturas em suspensão. Para as amostras de tecidos e líquidos amnióticos são realizadas culturas em monocamada devido à necessidade de as células aderirem a uma superfície para crescer. Este tipo de amostras deve ser cultivado em caixas de cultura (Keagle e Gersen, 2013).

Depois de estabelecida a cultura, é imperativo que as amostras sejam colocadas numa estufa para manter condições ótimas de temperatura, humidade e pH e dar tempo para as células se dividirem. O tempo de cultura varia consoante o tipo celular (Keagle e Gersen, 2013).

As culturas de sangue periférico requerem pouca manutenção assim que as condições de cultura são estabelecidas. Já os líquidos amnióticos e as vilosidades coriônicas requerem períodos de cultura mais longos. A taxa de crescimento destas amostras não é regular sendo necessário monitorizar o crescimento periodicamente num microscópio invertido até que a cultura atinja a confluência necessária para iniciar a manipulação. Adicionalmente, este tipo de culturas requer a troca de meio de cultura assim que este fica desprovido de nutrientes e aditivos essenciais para o crescimento celular (Keagle e Gersen, 2013).

As culturas crescem melhor com uma temperatura entre os 36-37°C, 97% de humidade, 5% de CO<sub>2</sub> e um pH entre 7,2-7,4 e podem ser mantidas em sistema aberto ou fechado (Lawce e Brown, 2017).

Geralmente, as culturas de sangue periférico são mantidas em sistemas fechados (caracterizados pela ausência de trocas gasosas, não sendo necessário o uso de estufas de CO<sub>2</sub>) enquanto amostras de biópsias de vilosidades coriônicas e líquidos amnióticos são mantidas em sistemas abertos (em que há trocas gasosas entre o interior da caixa de cultura e o ambiente dentro da estufa, sendo necessário o uso de estufas de CO<sub>2</sub> de modo a manter um nível constante de 5% de CO<sub>2</sub> para equilibrar o pH do meio). Para facilitar as trocas gasosas, deixa-se uma pequena folga no aperto das tampas das caixas de cultura (Keagle e Gersen, 2013).

A principal vantagem dos sistemas fechados é o risco reduzido de contaminação microbiana. Uma desvantagem dos sistemas abertos é o facto de tornarem as culturas mais suscetíveis a contaminações, devido à humidade das superfícies da estufa. Contudo, têm a vantagem de permitir que a cultura liberte produtos do metabolismo que podem ser tóxicos para as células (Boyle e Griffin, 2001; Keagle e Gersen, 2013).

### **A1.1 – Cultura de Amniócitos**

As amostras de líquido amniótico são enviadas para o laboratório já separadas em 2 caixas com as células em suspensão, o que torna o processo mais simples. Após a chegada ao laboratório, é realizada uma avaliação macroscópica da amostra: cor e quantidade. Caso a requisição seja para testes citogenéticos, adiciona-se meio às caixas,

estabelece-se a cultura e colocam-se a incubar a 37°C numa estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e o crescimento celular é avaliado passados cerca de 7 dias usando um microscópio invertido. Caso a requisição indique que é necessário realizar testes moleculares, na altura do estabelecimento da cultura, é necessário retirar cerca de 2ml de amostra para um microtubo antes de se estabelecer a cultura.

Quando é necessário fazer cultura de células para extração de DNA (para estudos moleculares), é importante que a cultura apresente uma confluência celular elevada. Quando isto se verifica, descarta-se o meio das caixas, é adicionado PBS (*Phosphate-buffered saline*) para lavar e retirar o meio que ainda restou e, posteriormente, volta-se a adicionar PBS (2ml) e, com um raspador, faz-se com que as células aderentes à caixa fiquem em suspensão e, por fim, retira-se o conteúdo todo para um microtubo, previamente identificado, e coloca-se meio novo nas caixas, que são mantidas na estufa.

### **A1.2 – Cultura de Vilosidades Coriônicas**

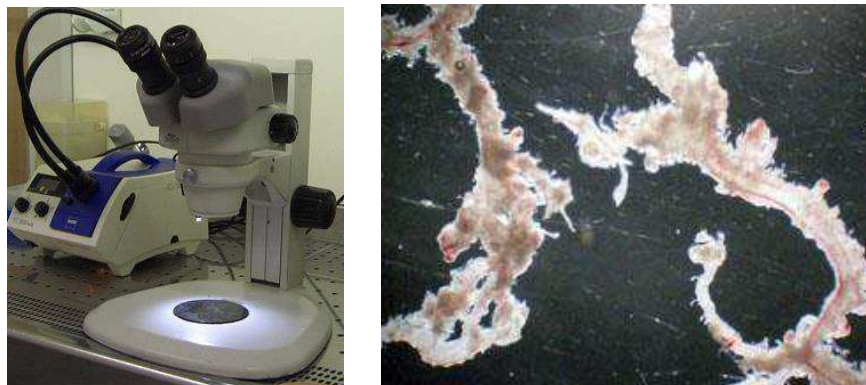
As amostras de vilosidades coriônicas chegam ao laboratório num tubo com meio adequado e necessitam ser processadas antes de se estabelecer a cultura celular. O procedimento é realizado à lupa, onde se faz a separação do material materno do material fetal usando duas pinças estéreis.

A amostra é colocada numa placa de *petri*, fazem-se lavagens com PBS e, de seguida, separa-se o material materno (com uma aparência mais avermelhada e opaca) do material fetal (com uma aparência mais rosada, translúcida e ramificada) (Figura 9). Esta etapa é particularmente importante visto que, uma correta separação, minimiza os riscos de contaminação da amostra com células maternas, que podem inviabilizar a obtenção de um resultado do feto. Ainda assim, no caso de amostras fetais do sexo feminino, é separado um microtubo com 2ml de suspensão celular para se fazer o despiste de contaminação materna, por técnicas de genética molecular, para garantir que a análise citogenética é apenas referente ao feto.

Após a separação à lupa, coloca-se o material fetal num tubo e faz-se a digestão enzimática, inicialmente com tripsina para quebrar as ligações e, posteriormente, com collagenase para desagregar as células, com o objetivo de se obter uma suspensão de



células (Keagle e Gersen, 2013). De seguida, divide-se a suspensão celular por 2 caixas de cultura (linha A e linha B) com meio adequado para se estabelecer a cultura e coloca-se a incubar a 37°C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e as caixas são avaliadas num microscópio invertido passados 3 a 4 dias para ver o crescimento celular e renovar o meio de cultura.



**Figura 9** – Separação à lupa do material fetal de uma amostra de vilosidades coriônicas.

### **A1.3. – Subcultura**

Quando as culturas atingem uma confluência elevada, podemos fazer uma subcultura para eliminar as células mortas e potenciar o crescimento celular. O primeiro passo é descartar o meio das caixas, utilizar uma solução salina de lavagem, retirar o sobrenadante e colocar tripsina para dissociar as células aderentes da caixa de cultura. A caixa é colocada cerca de 2 minutos na estufa a 37°C e, de seguida, a suspensão celular é avaliada ao microscópio. Simultaneamente, identifica-se uma nova caixa de cultura e coloca-se meio novo que contém soro fetal (que inibe a ação da tripsina). Depois, divide-se a suspensão de células entre as duas caixas e coloca-se meio novo na caixa inicial. Colocam-se as caixas na estufa ligeiramente abertas para contactarem com o CO<sub>2</sub> (Keagle e Gersen, 2013).

#### **A1.4. – Tripsinização *in situ***

A tripsinização *in situ* tem como objetivo desagregar as células que estão em *cluster* e distribuí-las uniformemente pela caixa para: se continuarem a dividir até se obter uma cultura com células suficientes para iniciar o estudo; se fazer subcultura; transferir as células para tubos de centrifugação (para iniciar o processo de manipulação).

O procedimento laboratorial tem por base descartar o meio de cultura das caixas, adicionar uma solução salina de lavagem para lavar e tirar o excesso de meio que ainda possa existir (pois contém soro fetal, que inibe a ação da tripsina), retirar o conteúdo, adicionar a tripsina, que degrada a ligação que existe entre as membranas celulares e a base da caixa fazendo com que as células se soltem e se distribuam na cultura para se estabelecerem outra vez, e colocar as caixas a incubar durante 2-4 minutos na estufa a 37°C. Posteriormente, as caixas são observadas ao microscópio invertido e, se estiverem desagregadas, é adicionado meio de cultura novo. Caso não estejam, aumenta-se o tempo de exposição à tripsina.

Após a tripsinização *in situ*, acompanha-se o crescimento celular e, quando as células estiverem uniformemente distribuídas pela caixa e a cultura confluenta, pode-se iniciar o processo de manipulação ou criopreservar as células em azoto líquido.

#### **A1.5. – Cultura de linfócitos**

As amostras de sangue periférico chegam ao laboratório em tubos com heparina de sódio. A partir de cada amostra de sangue para análise citogenética, devem-se estabelecer, pelo menos, duas culturas utilizando meio de cultura apropriado e adicionando PHA (fitohemaglutinina), para estimular a divisão celular dos linfócitos T. O procedimento consiste em preparar 2 tubos com meio apropriado e colocar 12 a 14 gotas da amostra em cada tubo. Os tubos devem estar devidamente identificados e devem ser homogeneizados e colocados na estufa a 37°C durante 48 a 72 horas.

Tendo em conta que os linfócitos são culturas em suspensão, não conseguimos acompanhar o seu desenvolvimento, como acontece nos amniócitos e vilosidades coriônicas. Para se obter um maior número de metafases na manipulação, faz-se uma

sincronização do ciclo celular de modo a que as células, em divisão aleatória, fiquem estabilizadas num certo ponto do ciclo celular e reiniciem o ciclo de modo sincronizado.

O procedimento laboratorial consiste em adicionar metotrexato (MTX) nas amostras para parar o ciclo celular na fase S. Este composto compete com a enzima dihidrofolato redutase, impedindo a sua conversão para tetrahydrofolato (essencial para a síntese de substratos importantes na síntese de DNA), e inibe a síntese da timidina, que é necessária para a replicação do DNA. Em seguida, troca-se o meio e coloca-se um novo (sem MTX) e adiciona-se timidina para retomar o ciclo celular e as células se começam a dividir a partir do mesmo ponto, de modo a ter um maior número de células na mesma etapa. Depois da timidina retomar o ciclo, pode-se iniciar a manipulação (Skubisz e Tong, 2012).

#### **A1.6. – Criopreservação de culturas de células**

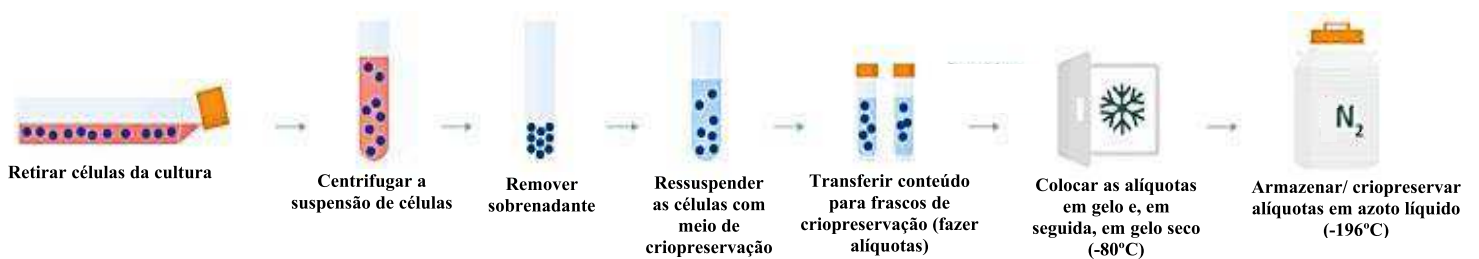
A criopreservação é um processo que consiste em preservar/armazenar células e tecidos a baixas temperaturas, de modo a garantir linhas celulares, reduzir o risco de contaminações e evitar o envelhecimento das células para poderem ser utilizadas em estudos futuros, caso seja necessário (Whaley *et al.*, 2021).

Uma grande parte da massa celular é constituída por água, pelo que congelar células a temperaturas muito baixas sem agentes criopreservadores (que mantêm a integridade celular) é letal, uma vez que, na sua ausência, ocorrem alterações bioquímicas e estruturais prejudiciais, a nível intra e extracelular, como por exemplo a formação de cristais. Uma forma de reduzir o risco de formação de cristais e danos celulares é adicionar um agente criopreservador (com capacidade de atravessar as membranas celulares e com baixa toxicidade) e fazer um congelamento lento e gradual (Whaley *et al.*, 2021).

Atualmente, existem vários agentes criopreservadores, nomeadamente o glicerol (que foi o primeiro agente a ser descoberto), o dimetilsulfóxido (DMSO), o etilenoglicol (EG) e o propanodiol (propilenoglicol). No entanto, o DMSO é o mais utilizado, devido à sua baixa toxicidade e preço reduzido, comparativamente a todos os outros (Whaley *et al.*, 2021).

Para que o processo de criopreservação seja bem-sucedido, é necessário que as células tenham um bom índice mitótico, escolher um bom agente criopreservador e seguir criteriosamente os protocolos adequados para cada tipo de célula, respeitando os tempos de criopreservação e descongelamento (Whaley *et al.*, 2021).

O procedimento laboratorial da criopreservação de cultura celulares compreende várias etapas, descritas na Figura 10.



**Figura 10** – Esquema exemplificativo do procedimento da criopreservação de culturas celulares. Adaptado de Cryopreservation Basics: Protocols and Best Practices for Freezing Cells (2022).

As alíquotas devem ser devidamente identificadas e, para rapidamente rastrear as amostras, deve ser feito um registo da sua localização no azoto líquido. As células podem ser criopreservadas/armazenadas por muito tempo.

Para o descongelamento das células, é recomendável que seja um procedimento rápido para ajudar a reduzir o tempo de exposição aos solutos presentes no meio de criopreservação, evitar a recristalização do gelo e diluir o agente criopreservador. Como tal, retiram-se as alíquotas do azoto líquido e colocam-se a uma temperatura de 37°C. De seguida, as células são lavadas numa solução de lavagem para se remover todo o agente criopreservador e, por fim, são transferidas para um novo meio de cultura (específico para o tipo de amostra) (Whaley *et al.*, 2021).

## **A2 – Manipulação**

Existem soluções comerciais, nomeadamente o CRA (*Chromosome Resolution Additive*), que podem ser adicionadas às culturas celulares, antes de se iniciar o processo de manipulação, e cujo objetivo é melhorar a resolução dos cromossomas e, conseqüentemente, facilitar a análise ao microscópio. Podem ser úteis em culturas que, tendencialmente, originam cromossomas com pouca qualidade (baixa resolução).

A manipulação celular inicia-se quando existem células suficientes em divisão e envolve 3 etapas: i) Adição da Colcemida, ii) Tratamento Hipotónico e iii) Fixações. Estas etapas apresentam algumas variações entre os vários tipos celulares.

### **A2.1. Adição da Colcemida**

A manipulação começa com a adição de um inibidor mitótico às culturas celulares. A colcemida é o inibidor mais utilizado nos laboratórios de citogenética e tem como função inibir a polimerização da  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, impedindo, portanto, a formação dos microtúbulos do fuso acromático e a separação dos cromatídeos-irmãos na anafase, com o objetivo de bloquear a mitose (em prometáfase ou metafase), de modo a obter cromossomas com uma boa resolução para ser feita a análise citogenética (Keagle e Gersen, 2013).

É importante haver um equilíbrio entre obter um bom índice mitótico e uma boa resolução dos cromossomas. O tempo de exposição à colcemida é crítico. Quanto mais tempo as células estiverem expostas a este inibidor, maior será o número de células em metafase, mas os cromossomas serão mais curtos, visto que estes condensam à medida que avançam na metafase. Por outro lado, pouco tempo de exposição à colcemida fará com que os cromossomas fiquem muito compridos e que haja uma maior probabilidade de sobreposições, que dificultam a análise microscópica (Keagle e Gersen, 2013).

Assim, é importante estabelecer o tempo adequado para se obter um bom índice mitótico, uma boa resolução e, conseqüentemente, bons resultados. No caso das amostras de líquidos amnióticos e vilosidades coriônicas, a colcemida é adicionada às caixas de cultura, que permanecem em incubação por 3 horas. Nas amostras de sangue,

como é feita a sincronização celular, o tempo de exposição à colcemida é de 15 minutos (Clouston, 2001; Keagle e Gersen, 2013).

Após o tempo de exposição à colcemida, transfere-se o conteúdo da caixa de cultura para um tubo devidamente identificado e adiciona-se meio novo ao restante das células na caixa de cultura, para que esta seja mantida até se garantir que existem células fixadas em quantidade e qualidade suficientes para a realização do estudo requerido e para o caso de ser necessário fazer-se extração de DNA, mais tarde. Após a adição do meio novo, as caixas vão a incubar e os tubos vão centrifugar para se iniciar o tratamento hipotónico.

## **A2.2. Tratamento Hipotónico**

Nesta etapa, a solução hipotónica mais utilizada é a de cloreto de potássio (KCl), visto ser a que provoca menos danos na estrutura cromossómica. Esta solução tem uma concentração salina inferior ao citoplasma celular, permitindo a entrada da água, via osmose, nas células. A entrada da água vai turgir as células e é essencial para o correto espalhamento dos cromossomas na lâmina, pois aumenta o volume e as estruturas celulares e promove a dispersão dos cromossomas na célula (Keagle e Gersen, 2013).

Tal como na adição da colcemida, o tempo de exposição ao KCl é crítico, visto que, se for muito tempo, irá provocar a lise das células, comprometendo a qualidade do espalhamento e, caso seja tempo insuficiente, resultará num espalhamento de baixa qualidade, uma vez que os cromossomas não se dispersam na célula, originando muitas sobreposições (Keagle e Gersen, 2013).

Nos líquidos amnióticos e nas vilosidades coriônicas, o procedimento laboratorial consiste em, após a centrifugação, remover o sobrenadante até ao *pellet*, agitar as células mecanicamente, adicionar 1ml de FBS (*Fetal bovine serum*) ou FCS (*fetal calf serum*) para inibir a ação da tripsina (presente devido à tripsinização *in situ*) e colocar a solução de KCl até perfazer 10ml. Os tubos são homogeneizados para que a solução tenha contacto com todas as células e, posteriormente, são colocados na estufa a 37°C.

Nos sangues periféricos, o procedimento é muito semelhante. Difere na adição de FBS/FCS, na concentração da solução hipotónica e no tempo de incubação. Como não se faz tripsinização *in situ* neste tipo de amostras, não é necessário adicionar FBS/FCS antes da solução hipotónica.

Após o período de incubação, os tubos vão centrifugar novamente para se fazerem as fixações.

### **A2.3. Fixações**

Finalizado o tratamento hipotónico, seguem-se as fixações com uma solução de metanol absoluto e ácido acético glacial. Esta solução é usada para parar a ação da solução hipotónica, fixar as células e provocar, no caso das amostras de sangue periférico, a lise de quaisquer hemácias presentes na amostra. O objetivo é remover a água e preservar/enrijecer tanto a estrutura como a morfologia dos cromossomas para que fiquem resistentes aos processos de coloração (bandagem) (Keagle e Gersen, 2013).

Nos amniócitos e vilosidades coriônicas, são feitas três fixações com diferentes proporções de metanol e ácido acético, nomeadamente 6ml de metanol para 1ml de ácido acético (6:1), 3:1 e 1:1. Já nos linfócitos, a proporção é sempre de 3:1 em todas as fixações. A primeira fixação é a mais importante sendo que vai fixar as estruturas. Nos sangues, é ainda mais importante, porque a adição repentina de fixador pode levar à formação de coágulos, inviabilizando a obtenção de cromossomas em metafase. A correta adição do primeiro fixador é essencial para a obtenção de preparações cromossómicas com qualidade. As outras duas fixações servem para limpar e reforçar a fixação (Keagle e Gersen, 2013).

Em termos práticos, nos amniócitos e vilosidades coriônicas, a primeira fixação consiste em descartar o sobrenadante até ao cone do tubo, aspirar o conteúdo que restou com uma pipeta e deixar dentro da pipeta enquanto se adiciona 4 ml de fixador (6:1).

Após se adicionar o fixador, pode-se colocar o conteúdo da pipeta no tubo lentamente, homogeneizar e colocar a centrifugar. Seguem-se a segunda (3:1) e terceira

(1:1) fixações que são bastante mais simples e consistem em retirar o sobrenadante e adicionar o respetivo fixador (com uma nova centrifugação entre elas).

Nos linfócitos, a primeira fixação é ligeiramente diferente. O fixador é adicionado gota a gota com agitação contínua das células no *vortex* para que não haja coagulação e para o fixador promover a lise dos eritrócitos. As outras duas fixações são iguais às outras amostras, sendo que o fixador é de 3:1 em ambas (Keagle e Gersen, 2013).

Após a etapa da fixação estar concluída, os tubos são colocados no frigorífico até serem espalhados. As células fixadas podem ser armazenadas durante longos períodos a 4°C.

### **A3 – Espalhamento**

O espalhamento é um passo importante para o estudo citogenético. O objetivo é obter lâminas com células individualizadas e cromossomas bem espalhados, de modo a permitir fazer uma boa análise cromossómica, com quantidade suficiente de metafases, pouca sobreposição cromossómica e desprovidas de citoplasma.

A qualidade do espalhamento é dependente de muitas variáveis, nomeadamente a temperatura e humidade relativas, o operador e o sucesso da manipulação (Keagle e Gersen, 2013).

Quando as células entram em contacto com a lâmina, o fixador começa a espalhar-se e a evaporar. Assim, o tempo de evaporação é crítico para um espalhamento de qualidade, visto que, quanto mais tempo durar a evaporação, mais dispersão existe. Por este motivo, o espalhamento deve ser realizado numa câmara de espalhamento específica ou num lugar onde a temperatura e humidade possam ser controladas para obter boas lâminas (Keagle e Gersen, 2013, Lawce e Brown, 2017).

Na prática, para se fazer um espalhamento, é necessário centrifugar as amostras, descartar o sobrenadante para as concentrar e colocar as gotas da suspensão celular em cada lâmina devidamente identificada com o tipo de amostra que é, o número da amostra e os dias em que foi feita a manipulação e espalhamento. Deixa-se secar e avalia-se a qualidade do espalhamento ao microscópio de contraste de fase.



Pode ser necessário ajustar a concentração da suspensão celular. Se estiver muito concentrada, deve-se adicionar fixador 1:3 para diluir. Se estiver pouco concentrada, deve-se centrifugar novamente a amostra e concentrá-la.

Quando terminado o espalhamento, as lâminas são colocadas na estufa para envelhecimento (desnaturação/desidratação) a 60°C, durante a noite, com o intuito de desidratar e conferir rigidez aos cromossomas e favorecer a bandagem cromossômica (Keagle e Gersen, 2013, Lawce e Brown, 2017).

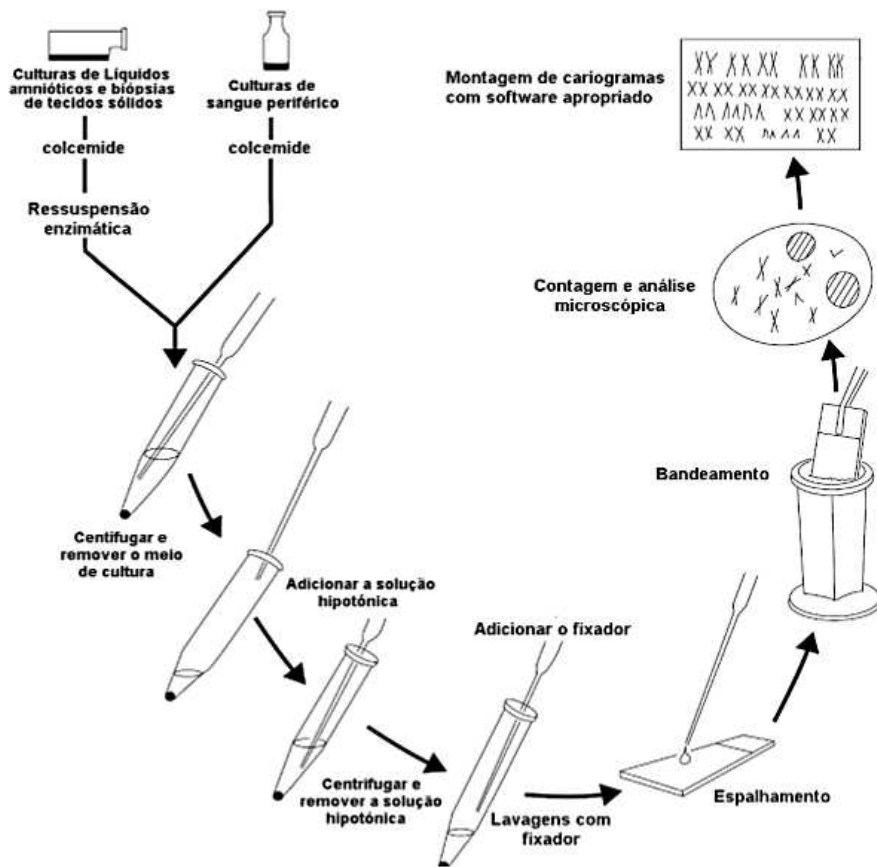


Figura 11 – Representação esquemática das várias etapas do estudo citogenético. Adaptado de Lawce e Brown (2017).

#### A4 – Bandagem

A bandagem é a etapa que permite obter um padrão de bandas específico de cada cromossoma e identificar cada um deles para se fazer o estudo citogenético.

Para se conseguir uma bandagem com boa resolução, é necessário fazer um bom espalhamento, com poucas sobreposições e com cromossomas distendidos. Adicionalmente, a resolução e o número de bandas observadas dependem do estado de

condensação dos cromossomas, podendo este número variar entre as 400-550 bandas em cromossomas metafásicos, e as 800-850 bandas nos cromossomas prometáfásicos.

Atualmente, existem vários métodos de coloração/bandagem. Estes podem ser divididos em 2 grupos: métodos de rotina (que resultam na coloração de todo o cromossoma) e métodos diferenciais (que marcam estruturas cromossômicas específicas). Do primeiro grupo, fazem parte a bandagem QFQ, GTG/GTL e RHG e o segundo grupo inclui as bandagens CBG e AgNOR.

O método de rotina comumente utilizado é o GTL, sendo que as bandagens CBG e AgNOR são igualmente utilizadas em casos específicos, como complemento à bandagem GTL.

#### **A4.1. Bandagem QFQ (bandas Q, por fluorescência e coloração Quinacrina)**

A bandagem QFQ foi a primeira técnica a ser utilizada nos laboratórios de citogenética e baseia-se na coloração dos cromossomas com mostarda de quinacrina e observação da fluorescência emitida, usando luz ultravioleta. Os cromossomas são corados sem qualquer tipo de pré-tratamento, preservando, assim, a sua morfologia. Apresentam um padrão específico de bandas brilhantes ou turvas, específico para cada cromossoma (Keagle e Gersen, 2013).

Esta técnica foi substituída por técnicas de bandagem não fluorescentes, visto que a fluorescência se desvanece rapidamente. Ainda assim, pode ser útil na detecção de heteromorfismos, para esclarecimento de situações relacionadas com o braço longo do cromossoma Y (visto que a região polimórfica distal do braço longo do cromossoma Y é extremamente fluorescente) e em situações de existência de cromossomas marcadores, que possam ser derivados do cromossoma 15q proximal (Keagle e Gersen, 2013).

#### **A4.2. Bandagem GTL (usando Tripsina e corante Leishman)**

Este tipo de bandagem permite identificar cada um dos cromossomas, visto que cada cromossoma apresenta uma coloração permanente e característica devido à ação da tripsina, seguida de coloração com o corante Leishman (GTL) (Ribeiro *et al.*, 2018).

Este tratamento vai permitir a obtenção de um padrão de bandas claras e escuras, distinto para cada cromossoma. As bandas escuras (heterocromatina) são regiões não codificantes. Já as bandas claras (eucromatina) são regiões codificantes.

Este tipo de bandagem permite detetar alterações cromossómicas numéricas e estruturais na análise citogenética.

Em termos laboratoriais, a técnica de coloração de rotina de bandagem GTL consiste na introdução de lâminas espalhadas, previamente envelhecidas, num *coplin* com tripsina durante breves segundos, passando, em seguida, para a sequência de *coplins* descrita na Figura 12. A solução de tripsina permite a diferenciação das bandas claras e das bandas escuras. Já as soluções tampão NaCl e *Gurr* são soluções de lavagem. Por fim, a solução de coloração Leishman permite corar os cromossomas havendo umas regiões ricas em G e C que incorporam menos Leishman, ficando com uma tonalidade mais clara, correspondendo às bandas claras e regiões ricas em genes. Outras regiões ficam mais coradas porque incorporam mais Leishman por serem ricas em A e T, correspondendo às bandas escuras.

Após este procedimento, deixam-se secar as lâminas e faz-se uma avaliação da qualidade da bandagem num microscópio ótico de campo claro. Pode ser necessário fazer ajustes de tempos de exposição à tripsina ou da coloração com Leishman. Quando se verificar que as lâminas estão com uma boa qualidade, podem prosseguir para a análise citogenética.



**Legenda:**

- 1- Solução de Tripsina;
- 2- Solução de NaCl;
- 3- Tampão Gurr;
- 4- Solução de Leishman;
- 5- Tampão Gurr;
- 6- H<sub>2</sub>O.

**Figura 12** – Procedimento da bandagem GTL.

#### A4.3. Bandagem RHG (Bandas R usando calor e corante Giemsa)

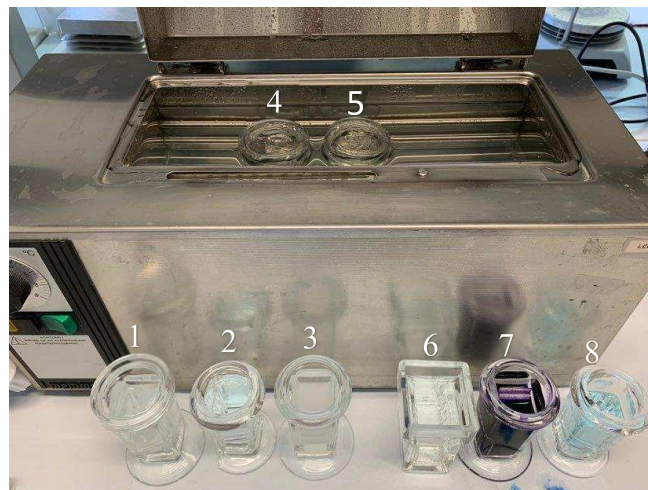
A bandagem RHG (reversa) é uma técnica que produz uma coloração reversa à bandagem G, aparecendo as regiões ricas em C e G como bandas escuras e as regiões ricas em A e T como bandas claras. O padrão de bandas é obtido por desnaturação dos cromossomas a temperaturas elevadas, em tampão fosfato, seguida de coloração com Giemsa (Keagle e Gersen, 2013).

#### A4.4. Bandagem CBG (bandas C usando hidróxido de bário e corante Giemsa)

A bandagem CBG marca seletivamente regiões dos cromossomas com DNA altamente repetitivo, como a heterocromatina constitutiva presente nos centrómeros e as regiões polimórficas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y (Wang, 2002; Ribeiro *et al.*, 2018).

Este tipo de bandagem é útil para determinar a presença de cromossomas dicêntricos e pseudodicêntricos e para o estudo de cromossomas marcadores (Keagle e Gersen, 2013).

O procedimento laboratorial consiste em degradar o DNA com ácido clorídrico (HCl) e, em seguida, desnaturá-lo com uma solução alcalina de hidróxido de bário [Ba(OH)<sub>2</sub>]. Por fim, utiliza-se uma solução salina de citrato de sódio (2×SSC) a 60°C para remover toda a eucromatina, ficando apenas as regiões de DNA altamente repetitivo para serem coradas com Giemsa (Rooney, 2001) (Figura 13).



**Legenda:**

- 1- Solução de HCl;
- 2- H<sub>2</sub>O;
- 3- Solução de [Ba(OH)<sub>2</sub>] a 1%;
- 4- H<sub>2</sub>O (60°C);
- 5- Solução de 2×SSC (60°C);
- 6- H<sub>2</sub>O;
- 7- Solução de Giemsa;
- 8- Tampão Gurr.

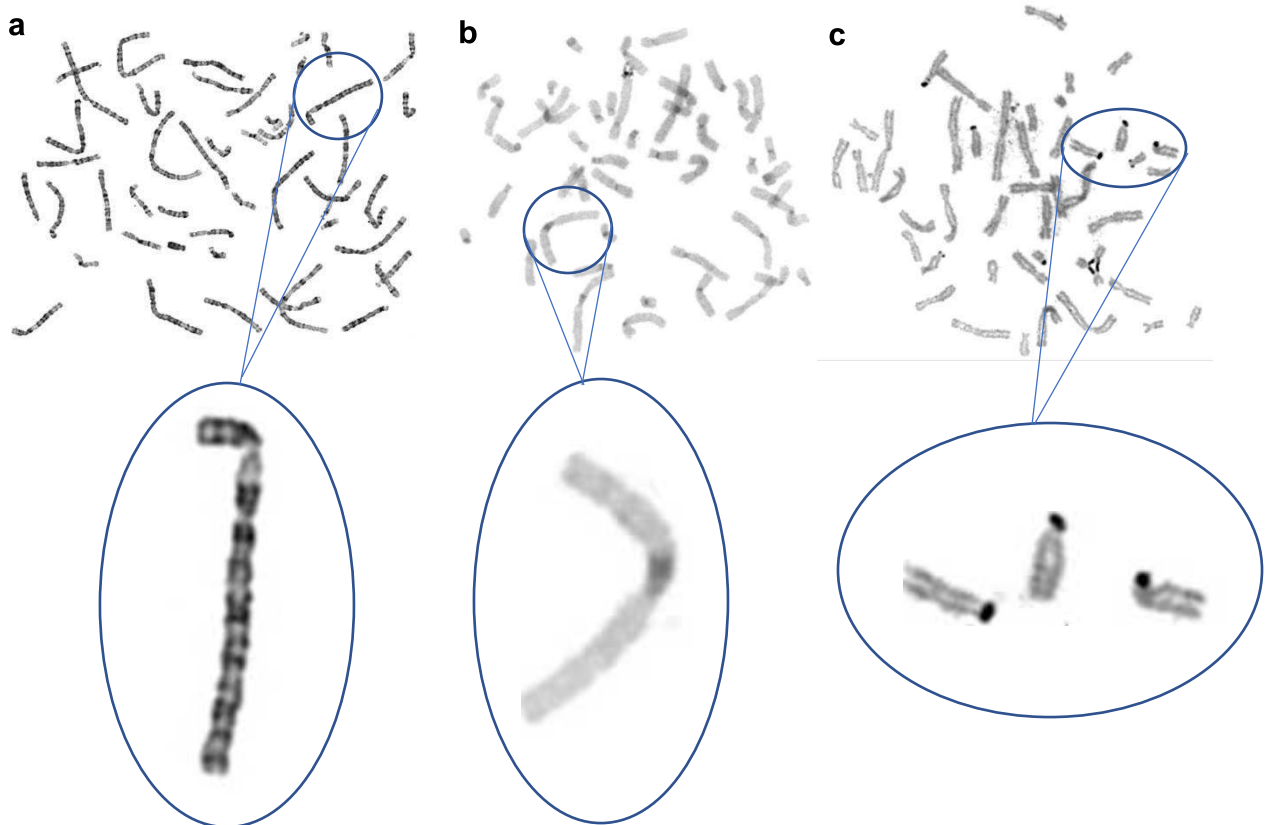
**Figura 13** – Procedimento da bandagem CBG.

#### A4.5. Bandagem AgNOR (Coloração com nitrato de prata das regiões organizadoras dos nucléolos)

A bandagem AgNOR (*Nucleolar Organizing Region*) é uma técnica que usa nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) para marcar as regiões organizadoras dos nucléolos, localizadas nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22, sendo útil para a identificação de alterações cromossômicas envolvendo estes cromossomas (Ribeiro *et al.*, 2018).

As regiões NOR contêm genes que codificam para RNA ribossômico (rRNA) e só podem ser marcadas quando a síntese do rRNA está ativa (Gardner e Sutherland, 2004).

Em termos práticos, as lâminas são espalhadas e colocadas numa câmara escura e húmida e, a cada lâmina, são adicionadas 2 gotas de nitrato de prata e uma lamela. Após a adição do nitrato de prata, as lâminas permanecem na câmara escura 18-24 horas a 37°C e, no dia seguinte, são colocadas em água corrente para se retirar o excesso de nitrato de prata e as lamelas. Para finalizar a bandagem, colocam-se as lâminas numa solução de Giemsa alguns segundos e passa-se por tampão Gurr.



**Figura 14** – Exemplos de metafases com algumas técnicas de bandagem utilizadas em citogenética convencional. (a) Bandagem GTL, (b) Bandagem CBG, (c) Bandagem AgNOR. Imagens cedidas pelo LCG-FMUC.

## A5 – Análise microscópica

Depois do espalhamento e bandagem, os cromossomas são analisados ao microscópio ótico de campo claro para se fazer o estudo citogenético e detetar (ou não) alterações numéricas e/ou estruturais.

A visualização das lâminas ao microscópio ótico deve começar na objetiva de 10x, de modo a encontrar células em metafase individualizadas com uma boa resolução (idealmente, com uma resolução de 550 bandas), com cromossomas espalhados, sem sobreposições e distendidos (Figura 15). Quando se encontra uma metafase com estas características, muda-se para a objetiva de imersão, com uma ampliação de 100x, e determina-se se a metafase tem qualidade suficiente para ser contada e analisada. Caso seja uma boa metafase para o estudo citogenético, é importante registar, na respetiva folha de análise do caso *index*, a lâmina analisada, as coordenadas do microscópio e referir se será usada para análise, contagem ou fotografia.

Quando a metafase é usada para análise, faz-se uma representação esquemática da metafase na folha do caso, identificando-se cada um dos cromossomas. Nas metafases em que os cromossomas são pequenos ou a resolução não é suficientemente boa, pode-se fazer contagem dos cromossomas, indicando o complemento cromossómico (por exemplo, 46,XX/46,XY).

As metafases com boa resolução são fotografadas/capturadas em maior ampliação, usando o *software Cytovision*<sup>®</sup>, que permite separar e organizar os cromossomas em kariogramas.

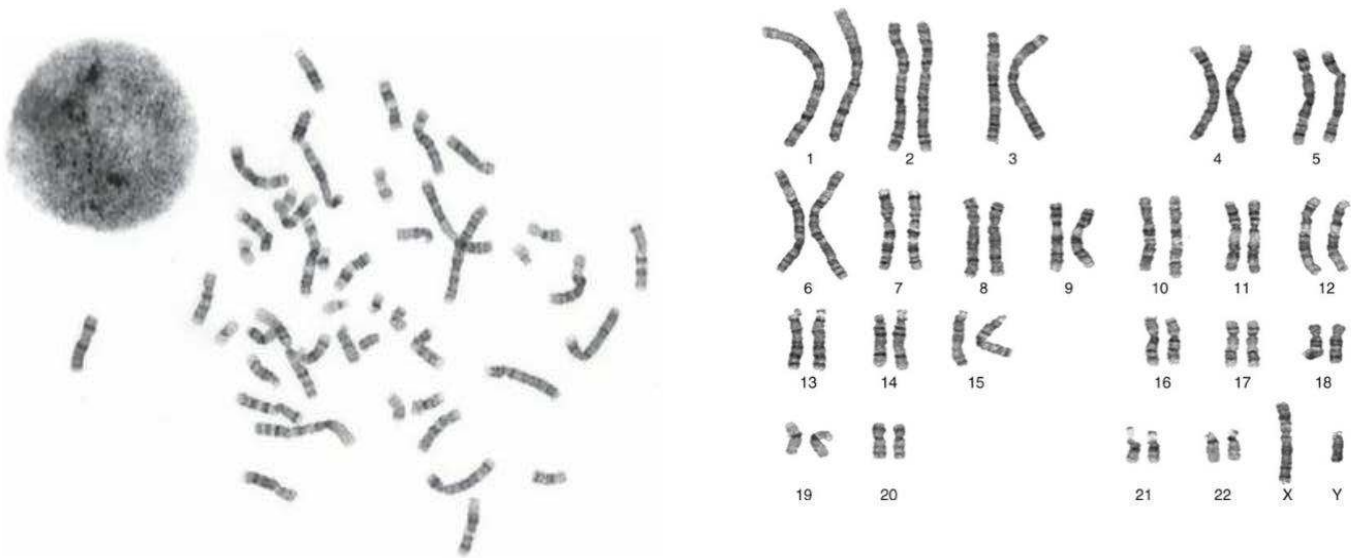
O objetivo dos kariogramas é analisar todos os cromossomas e as respetivas bandas para poderem ser comparadas com os ideogramas do ISCN 2020 e averiguar se existe alguma alteração cromossómica. Todos os cromossomas devem ser visíveis de p a q em, pelo menos, duas metafases, de modo a se poder confiar no resultado (Figura 15).

O número de metafases analisadas irá depender da indicação clínica e das alterações encontradas, seguindo-se as normas internacionais para o estudo citogenético. Normalmente, estudam-se 12 a 15 metafases nas duas linhas celulares. No entanto, se for encontrada alguma célula com alteração cromossómica, o número de metafases será

diferente, pelo que devem ser consultadas as *guidelines* específicas para cada situação. Por exemplo, em casos de suspeita de mosaïcismo, é essencial fazer-se o estudo de metafases adicionais na outra linha celular para confirmar/excluir esta situação, podendo ser estudadas 30 metafases (estudo moderado) ou 50 metafases (estudo exaustivo), consoante o cromossoma e a alteração encontrada.

Após a conclusão do estudo citogenético pelo técnico que estuda o caso ao microscópio, deverá ser feita a sua análise e revisão por um segundo técnico.

Por fim, elabora-se um relatório com o resultado encontrado, de acordo com o ISCN em vigor, que deve ser escrito segundo as *guidelines* estabelecidas.



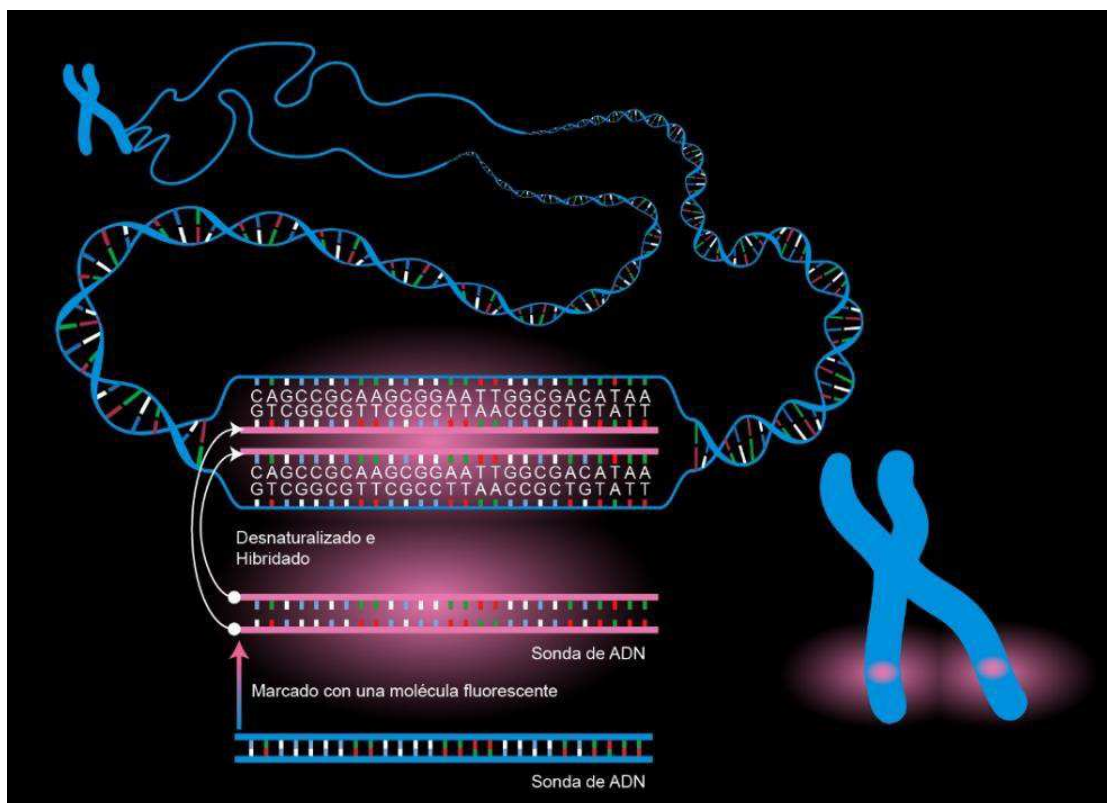
**Figura 15** – Visualização de uma metafase ao microscópio (esquerda) e exemplo de um cariograma obtido de uma metafase com bandagem GTL. Adaptado de Thompson e Thompson (2015).



## B – Citogenética Molecular: *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH)

A *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH) é uma técnica rápida e direcionada de citogenética molecular que utiliza sondas de DNA/RNA marcadas com fluorescência para detetar anomalias cromossômicas equilibradas e desequilibradas e rearranjos complexos que estão para além do poder de resolução da citogenética convencional clássica. Pode ser aplicada numa grande variedade de amostras, dependendo do estudo a realizar, e é uma mais valia em situações de mosaicismo e na caracterização de cromossomas marcadores. Contudo, analisa apenas regiões-alvo para as quais a sonda utilizada é específica (Bishop, 2010; Machado *et al.*, 2012).

O princípio da FISH baseia-se na hibridização *in situ* de uma sonda de DNA marcada com um fluorocromo, que é complementar a uma sequência de DNA específica no cromossoma-alvo, e na emissão de fluorescência, que pode ser detetada por um microscópio de fluorescência, utilizando filtros adequados (Figura 16).



**Figura 16** – Representação esquemática do princípio da técnica de FISH. Fonte: Hibridación fluorescente in situ (FISH) | NHGRI (2022).



As sondas de FISH podem ser utilizadas na marcação de células em interfase e células em metafase e são classificadas em 4 tipos, de acordo com as sequências que detetam: centroméricas, de sequência única (ou locus-específicas), teloméricas/sub-teloméricas e de pintura cromossômica.

As sondas centroméricas são direcionadas para as sequências repetitivas de DNA  $\alpha$ -satélite encontradas nos centrômeros (Figura 17B). São especialmente úteis para a detecção de aneuploidias, para caracterizar e identificar cromossomas marcadores e, ainda, para despistes de mosaicismo (Das e Tan, 2013).

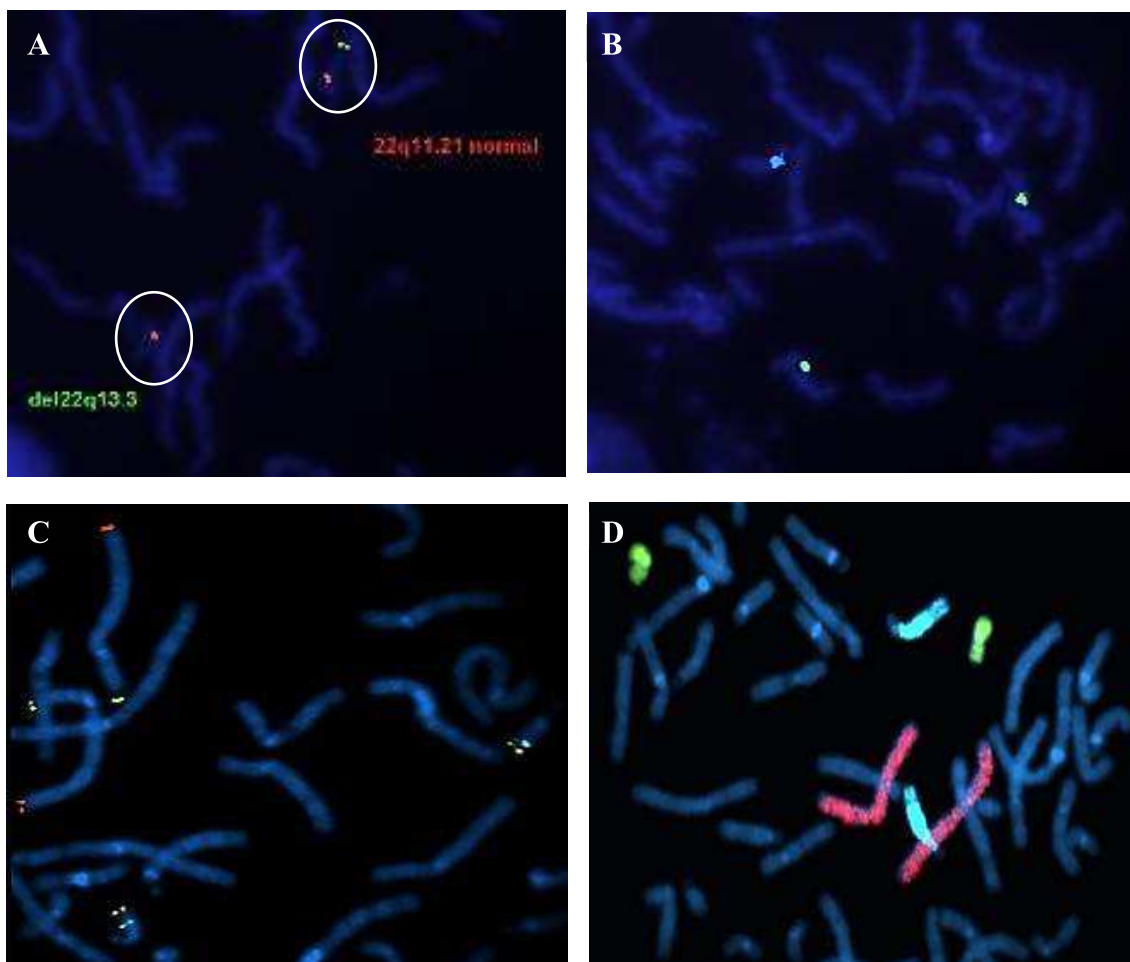
As sondas de sequência única (ou locus-específicas) são dirigidas para uma sequência de DNA única e específica e podem ser utilizadas, por exemplo, para detetar síndromes de microdeleções/microduplicações que envolvam essa sequência específica (Das e Tan, 2013) (Figura 17A).

As sondas teloméricas são direcionadas para as sequências repetitivas de DNA  $\beta$ -satélite e das regiões satélite clássicas e são úteis no esclarecimento das regiões de heterocromatina com alterações dúbias, com um possível significado clínico associado. (Matoso, 2014).

As sondas subteloméricas são um grupo particular do tipo locus-específicas e aplicam-se na pesquisa de rearranjos cromossômicos crípticos nas regiões terminais dos cromossomas (Matoso, 2014) (Figura 17C).

As sondas de “pintura” cromossômica (WCP) marcam um cromossoma inteiro ou braços cromossômicos, permitindo caracterizar e identificar cromossomas ou segmentos cromossômicos de origem desconhecida (Bishop, 2010) (Figura 17D).

As sondas podem ser marcadas de forma direta (pela incorporação de nucleótidos fluorescentes) ou indireta (pela incorporação de moléculas que são, posteriormente, detetadas por anticorpos fluorescentes). O método de marcação direta é o mais utilizado pelo facto de ser mais rápido e simples (Volpi e Bridger, 2008, Jensen, 2014).



**Figura 17** – Técnica de FISH com diferentes tipos de sondas de DNA (marcação direta) para análise de alterações cromossômicas. **(A)** Sonda de sequência única D22S72 para o cromossoma 22 (*Cytocell*); **(B)** Sondas centroméricas para os cromossomas X e 18 (sistema *Aneuvysion* da *Vysis*); **(C)** Sondas subteloméricas para regiões subteloméricas dos cromossomas 4 e 21 (sistema *Totelvysion* da *Vysis*); **(D)** Sondas de pintura cromossômica WCP para os cromossomas 2 (WCP2 a vermelho), cromossoma 13 (WCP13 a azul) e cromossoma 20 (WCP20 a verde) (sistema *Octochrome Painting* da *Cytocell*). Imagens cedidas pelo LCG-FMUC.

O procedimento laboratorial da FISH consiste no pré-tratamento (realizado em banho-maria a 37°C), seguido de desidratação alcoólica à temperatura ambiente. O pré-tratamento tem como objetivo limpar a preparação, hidratar o material e torná-lo mais acessível à sonda. Para isso, as lâminas são colocadas num *coplin* com uma solução salina de 2xSSC (a 37°C) durante uns minutos.

Segue-se a desidratação à temperatura ambiente, em que se colocam as lâminas num gradiente de solução alcoólica (etanol a 70%, 85% e 100%) de forma sequencial e deixam-se a secar.

Excepcionalmente, nos casos mais antigos em que exista citoplasma, poderá realizar-se uma digestão enzimática com pepsina para se remover o citoplasma presente e tornar mais fácil a hibridização da sonda. Deste modo, retiram-se as lâminas da solução 2xSSC, passam-se por uma solução de PBS e, depois, colocam-se as lâminas num *coplin* com uma solução de pepsina+HCl+H<sub>2</sub>O a 37°C, entre 6 e 10 minutos (consoante a quantidade de citoplasma). Em seguida, as lâminas são lavadas em PBS e, no final, desidratadas no gradiente de solução alcoólica, referido anteriormente.

Após a secagem, é necessário avaliar as lâminas novamente ao microscópio, delimitando a melhor área selecionada para a aplicação da sonda. Em seguida, procede-se à desnaturação da lâmina, com a sonda aplicada, numa placa de aquecimento (co-desnaturação do material-alvo e da sonda a hibridizar). Por fim, a lâmina é colocada numa câmara húmida e escura e armazenada na estufa, a 37°C, durante a noite, para promover a hibridização do material-alvo com a sonda.

No dia seguinte, fazem-se as lavagens pós-hibridização, que têm como objetivo remover o excesso de sonda que não se ligou. Primeiramente, as lâminas são colocadas numa solução 2xSSC com *Tween*, à temperatura ambiente, para tirar as lamelas. De seguida, vão para uma solução de SSC, em banho-maria, e voltam a passar por uma solução 2xSSC com *Tween*, à temperatura ambiente, para se remover todos os vestígios de sonda existentes.

Para finalizar, aplica-se DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol – marcador fluorescente que se liga fortemente a regiões de DNA ricas em adenina-timina) em cima da área delimitada e coloca-se uma lamela por cima. As lâminas permanecem no frigorífico até à análise ao microscópio de fluorescência. No final, faz-se a interpretação dos resultados e elabora-se um relatório, seguindo as normas internacionais recomendadas para o estudo de citogenética molecular.

As etapas da FISH podem ser visualizadas no seguinte esquema (Figura 18).

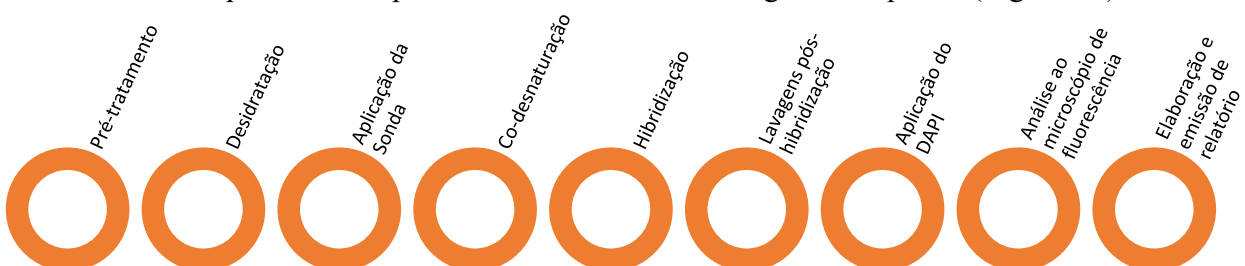


Figura 18: *Workflow* do procedimento laboratorial da FISH.

## C – Biologia Molecular e Genómica

### C1 – Extração, quantificação e purificação de DNA

A extração de DNA é um procedimento essencial em biologia molecular visto que o DNA genómico é a base para se realizarem diversas técnicas de análise genómica (Tan e Yiap, 2009).

Existem vários métodos de extração de DNA e a escolha do método a aplicar irá depender do tipo de amostra e do tipo de análise (Tan e Yiap, 2009; Lee *et al.*, 2010).

O principal objetivo da extração de DNA é obter material com quantidade suficiente e com boa qualidade, isto é, com um elevado grau de pureza (sem RNA, proteínas e outros contaminantes) (Lee *et al.*, 2010).

O DNA pode ser extraído a partir de diversas amostras biológicas. No LCG-FMUC, a extração pode ser feita a partir de amostras de líquidos amnióticos e vilosidades coriônicas (em DPN); e biópsias de pele e sangue periférico (em diagnóstico pós-natal).

Existem *kits* comerciais para extrair o DNA de forma mais rápida e com uma boa qualidade. Atualmente, o LCG-FMUC utiliza 2 métodos de extração de DNA:

1. Extração de DNA utilizando colunas de sílica, segundo o “*High Pure PCR Template Preparation Kit*” (Protocolo da Roche®).
2. Extração de DNA por *salting-out* segundo o “*DNA Extraction Kit*” (Protocolo da Agilent®).

O primeiro método é utilizado para amostras de líquidos amnióticos, vilosidades coriônicas, biópsias de pele e sangue periférico materno (para despiste de contaminação materna). Este procedimento consiste na digestão celular da amostra, através de um tampão de lise e da ação da proteinase K (que digere proteínas e remove contaminantes) e, em seguida, na precipitação do DNA com a adição de isopropanol. Posteriormente, é utilizado um sistema de colunas de sílica para remover os inibidores do DNA, com sucessivas lavagens e centrifugações. As colunas de sílica têm carga positiva, pelo que têm muita afinidade com as moléculas de DNA (que têm carga negativa). Finalmente, o

DNA é eluído da coluna de sílica com recurso a um tampão de eluição (com baixa concentração salina) (Tan e Yiap, 2009; Carpi *et al.*, 2011; Chacon-Cortes e Griffiths, 2014).

O segundo método é utilizado para amostras de sangues periféricos. O isolamento do DNA é feito com base na adição de uma solução com elevadas concentrações de sais, com o objetivo de precipitar as proteínas, e, posteriormente, na adição de etanol absoluto para precipitar o DNA, visto que este não se dissolve e se vai ligar ao Na<sup>+</sup> por *salting-out*. Por fim, o DNA é eluído de acordo com a quantidade de DNA precipitado (Chacon-Cortes e Griffiths, 2014).

Comparando os 2 métodos, o método de extração com colunas de sílica permite extrair o DNA mais rapidamente e de uma forma simples, obtendo um grau de pureza elevado. Contudo, a concentração final de DNA pode ser inferior à obtida através do método de extração por *salting-out*, tornando este último um método mais vantajoso, pois permite extrair DNA com boa qualidade e pureza e, ainda, uma concentração final superior, de uma forma simples (Chacon-Cortes e Griffiths, 2014).

Após a extração do DNA, é feita a quantificação, por espectrofotometria, para avaliar a quantidade e qualidade da amostra. A espectrofotometria permite determinar a pureza e a concentração das amostras através da leitura da absorvância do DNA, com diferentes comprimentos de onda (230nm, 240nm, 260nm e 280nm). A concentração é calculada a partir da leitura de absorvância a 260nm ( $A_{260}$ ), através da lei de *Lambert-Beer*. Já a pureza é avaliada através da razão entre a absorvância a 260nm ( $A_{260}$ ) e 280nm ( $A_{280}$ ) e os valores desejados devem estar entre 1,8 e 2,0, sendo que valores inferiores podem significar presença de proteínas ou outros contaminantes. A razão  $A_{260}/A_{230}$  pode ser utilizada como um segundo indicador do grau de pureza da amostra e os valores devem constar entre 2,0 e 2,2 (Clark *et al.*, 2001).

Por vezes, é necessário purificar e concentrar o DNA obtido na extração. O LCG-FMUC utiliza o kit “*DNA Clean Concentrator*” (Protocolo da Zymo<sup>®</sup>) para concentrar e purificar o DNA. Este procedimento consiste em lavagens sucessivas (com tampões de lavagem) para remover os contaminantes presentes na amostra, com o objetivo de obter um grau de pureza mais elevado e uma maior concentração de DNA.

## **C2 – Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR)**

A técnica *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR) é um método de biologia molecular confiável e eficiente, aplicado em DPN, para a detecção rápida de aneuploidias nos cromossomas 13, 18, 21, X e Y (Badenas *et al.*, 2010).

A QF-PCR baseia-se na amplificação, detecção e análise de marcadores genéticos, conhecidos como *Short Tandem Repeats (STRs)*, que são marcadores altamente polimórficos, com número e comprimento variáveis entre os indivíduos. O princípio desta técnica visa analisar os *STRs* em *loci* polimórficos dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y e, ainda, em *loci* não polimórficos dos cromossomas sexuais, com o objetivo de determinar o número de cópias presentes por célula (Cirigliano, 2009).

Esta técnica não necessita de cultura celular. Para se fazer a análise, é necessária apenas uma pequena quantidade de DNA extraído de amostras de vilosidades coriônicas, líquido amniótico ou sangue fetal (Hultén *et al.*, 2003).

A metodologia consiste, primeiramente, na extração de DNA genómico da amostra e na sua diluição (se necessário) para obter a concentração desejada. De seguida, o DNA é colocado em duas misturas de reação que contêm *primers* para as regiões-alvo, necessários para a reação de PCR. A reação de PCR é realizada num termociclador *Veriti (Applied Biosystems, USA)*. Os *STRs* são amplificados, num ensaio *multiplex*, usando um conjunto de *primers* marcados com fluorescência e, posteriormente, são separados por tamanho através de eletroforese em gel capilar para que os produtos possam ser visualizados e quantificados através de um sequenciador automático (*Genetic Analyzer 3500 – Applied Biosystems, USA*) e um software apropriado (Cirigliano *et al.*, 2009; Badenas *et al.*, 2010).

A análise e interpretação dos resultados é feita através do programa *Devyser*, recorrendo ao *software GeneMapper*, e baseia-se no número de picos de fluorescência registados num eletroferograma e no cálculo da proporção entre a área e altura dos picos de cada marcador, com o intuito de se determinar o número de cópias de cada cromossoma analisado, sendo também possível determinar o sexo da amostra.

Um padrão alélico de dois picos iguais na mesma região cromossômica é indicativo de duas cópias da região-alvo (dissomia – razão de 1:1) (Figura 19a), enquanto três picos dentro da mesma região cromossômica (1:1:1) (Figura 19b) ou dois picos com uma razão de 1:2/2:1 (Figura 19c) são indicativos de trissomia para essa região-alvo (Adinolfi *et al.*, 1997).

Nos casos em que apenas aparece um pico numa determinada região-alvo, não se pode considerar esse marcador, uma vez que não é informativo quanto ao número de alelos dessa região, visto que pode tratar-se de uma situação de monossomia ou homozigotia (Figura 19d).

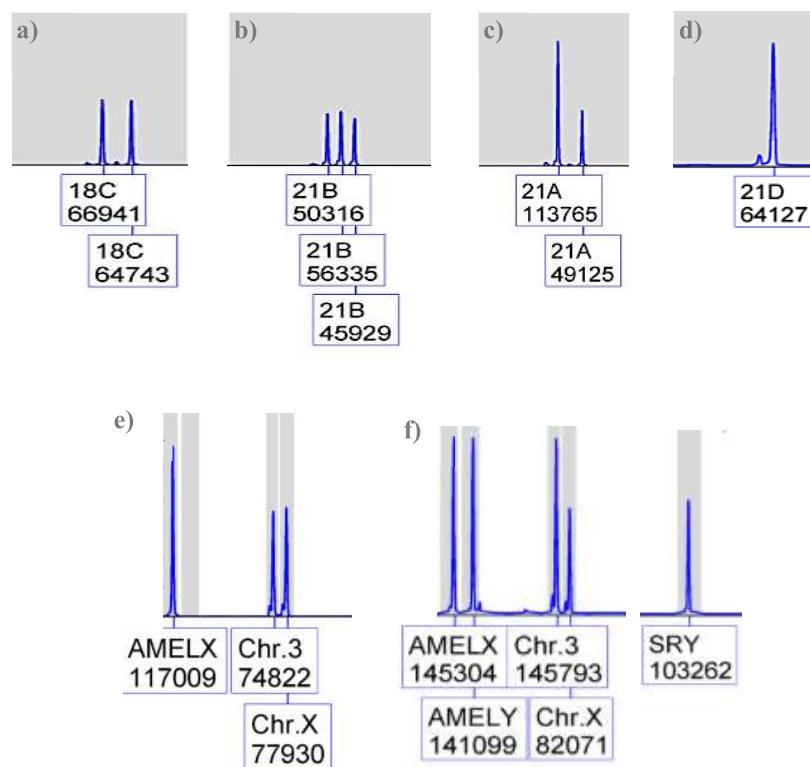
Atualmente, o kit utilizado para a QF-PCR inclui vários marcadores para os cromossomas 13, 18, 21, X e Y na reação *multiplex* e, para além disso, inclui indicadores não polimórficos T1 e T3 para a quantificação relativa do cromossoma X, de modo a distinguir entre uma situação de monossomia e homozigotia, que não são distinguíveis por marcadores polimórficos. Estes indicadores são sequências presentes no cromossoma X e nos autossomas 3 e 7 e amplificam com *primers* idênticos. Numa mulher XX, é expectável apresentar dois picos com uma razão de 1:1, visto que existem dois cromossomas 3/7 para dois cromossomas X (Figura 19e). Em situações de monossomia do X (em mulheres e homens), o esperado é obter uma razão de 2:1, tendo em conta que existirão dois cromossomas 3/7 para apenas um cromossoma X (*X-chromosome counting markers* | Devyser, 2022) (Figura 19f).

Assim sendo, no total, uma análise de QF-PCR inclui:

- marcadores STR para cada um dos cromossomas 13, 18 e 21;
- marcadores polimórficos pseudoautossómicos XY2 e XY3, presentes nos cromossomas X e Y;
- marcadores não polimórficos AMELXY e SRY, que amplificam sequências não polimórficas nos cromossomas X (AMELX) e Y (AMELY e SRY), podendo ser usados para determinar o número relativo dos cromossomas X e Y e a presença/ausência de um cromossoma Y;

- marcador não polimórfico ZFYX, presente nos cromossomas X e Y, utilizado para avaliar o número total de cromossomas sexuais, embora não seja possível distinguir o alelo do cromossoma X e do cromossoma Y;
- marcador STR 18D, presente na *mix* 1 (18D-1) e na *mix* 2 (18D-2), que permite a identificação da mistura cruzada na amostra analisada. Os comprimentos do alelo 18D devem ser idênticos em ambas as *mix*'s. Caso contrário, significa que há uma mistura de amostra.

Para validar um resultado, é necessário ter, pelo menos, dois marcadores informativos de cada cromossoma.



**Figura 19** – Análise e interpretação dos resultados QF-PCR. **(a)** Marcador indicativo de uma dissomia (razão 1:1) para o cromossoma 18; **(b)** Marcador indicativo de uma trissomia do cromossoma 21 (razão 1:1:1); **(c)** Marcador indicativo de uma trissomia do cromossoma 21 (razão 2:1); **(d)** Marcador não-informativo do cromossoma 21; **(e)** Amostra do sexo feminino: amplificação do marcador da amelogenina e proporção de 1:1 dos cromossomas 3 e X (presença de dois cromossomas 3 e dois cromossomas X); **(f)** Amostra do sexo masculino: amplificação do marcador da amelogenina (X e Y), proporção de 2:1 dos cromossomas 3 e X (presença de dois cromossomas 3 e um cromossoma X) e amplificação do marcador SRY. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Após a análise e interpretação dos resultados, é feito um relatório de acordo com o que está descrito nas *guidelines* internacionais e segundo o ISCN em vigor.



### **C3 – Despiste de contaminação materna através da análise de STRs**

A técnica QF-PCR, para além de ser aplicada no diagnóstico rápido de aneuploidias, também pode ser usada para despiste de contaminação de células maternas.

O despiste de contaminação materna é realizado sempre que seja necessário averiguar que não existe contaminação materna na amostra, de modo a garantir que se está a estudar apenas o material genético do feto e se dá um resultado correto. Para os estudos moleculares em DPN, é feito sempre em amostras do sexo feminino (Schrijver et al., 2007).

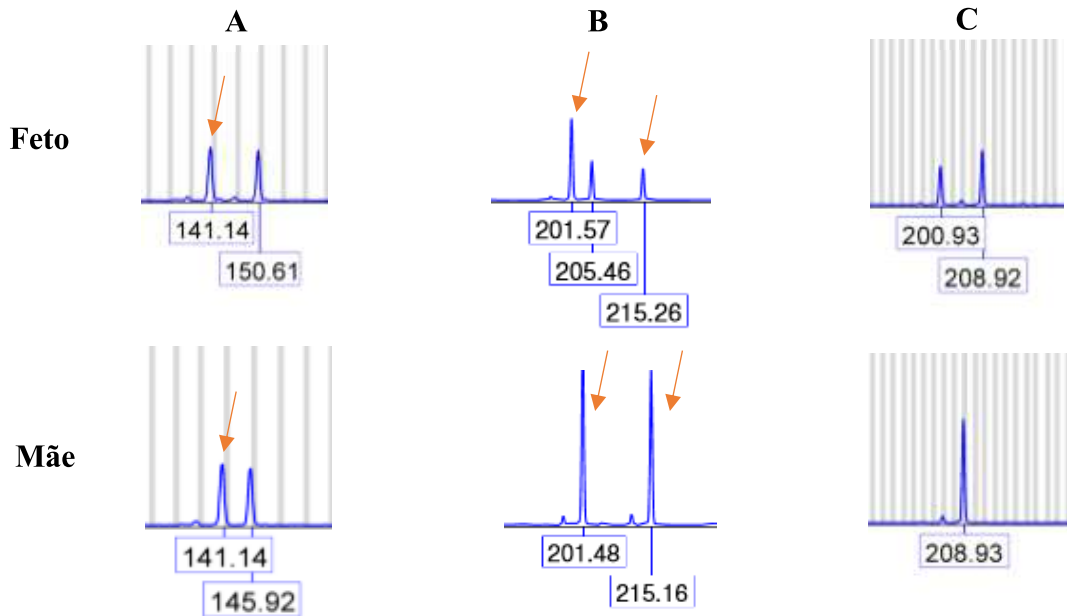
No LCG-FMUC, a análise de STRs para despiste de contaminação materna é feita através do *kit Identifiler*, baseado em STRs que amplificam *loci* polimórficos de diversos cromossomas e o marcador da Amelogenina (AMEL) numa única reação de PCR.

Para este tipo de análise, é necessário ter uma amostra do feto e sangue materno para se compararem as amostras e extrair/quantificar o DNA. Em seguida, é feita uma mistura de reação com os vários componentes necessários para a amplificação das regiões-alvo, recorrendo à técnica de PCR, e faz-se a separação dos fragmentos por eletroforese capilar.

A análise no sequenciador automático e interpretação dos resultados resulta da comparação do perfil da amostra fetal com o da amostra materna. Quando se observa a presença de dois alelos no perfil da amostra fetal (um de origem materna e outro de origem paterna), não existe contaminação (Figura 20A). No entanto, quando se verifica a presença de três picos no eletroferograma, significa que existe contaminação materna (sendo que os picos correspondem aos dois alelos maternos e a um alelo paterno) (Figura 20B).

Pode-se afirmar que os resultados são conclusivos quando os perfis da mãe e do feto apresentam 2 picos, sendo que um deles é coincidente. Contudo, os resultados podem ser inconclusivos em diversas situações, nomeadamente: quando a mãe é homocigótica para determinada região (Figura 20C); quando o feto e a mãe têm os

mesmos alelos; ou se existir um pico que suscite dúvidas quanto a ser um *stutter* (artefacto da amplificação) ou um pico da amostra. Pode-se afirmar que não existe contaminação materna quando são encontrados, pelo menos, 2 marcadores conclusivos.



**Figura 20** – Análise e interpretação dos resultados. A) Sem contaminação materna: presença de dois alelos na amostra fetal e na amostra materna, com um pico coincidente (indicado com seta); B) Com contaminação materna: presença de três alelos na amostra fetal correspondentes a dois alelos de origem materna (indicado com seta) e um alelo paterno; C) Resultado inconclusivo: mãe apresenta apenas um pico, sendo homocigótica para esta região. Imagem cedida pelo LCG-FMUC

## **C4 – Diagnóstico da Síndrome de X-frágil por PCR**

A Síndrome do X-frágil (SXF) é uma doença genética ligada ao cromossoma X dominante e é considerada a causa hereditária mais comum de atraso de desenvolvimento psicomotor (ADPM) e perturbação do desenvolvimento intelectual (PDI). É, ainda, a principal causa monogénica de perturbação do espectro autista (PEA) (Wang, 2012; Hunter, 2014).

Esta síndrome afeta 1 em cada 4000 homens e 1 em cada 8000 mulheres, sendo que os homens tendem a manifestar um fenótipo mais severo comparativamente às mulheres, devido ao processo de lionização (Wattendorf, 2005; Biancalana *et al.*, 2015).

A SXF é causada por uma mutação no gene *FMRI* (*Fragile X Messenger Ribonucleoprotein-1*) no cromossoma X (Xq27.3), associada a uma expansão de um trinucleótido CGG instável na região 5'UTR (*untranslated region*), que ultrapassa as 200 repetições. Esta mutação resulta no silenciamento transcricional do gene *FMRI*, devido à expansão e subsequente metilação de repetições CGG, impedindo a sua expressão. Consequentemente, a proteína FMRP também não será expressa, a qual é fundamental para o normal desenvolvimento das ligações entre neurónios e que, na sua ausência, dá origem ao défice cognitivo que se verifica na síndrome do X-frágil (Maddalena 2001; Pandey, 2004; Sherman, 2005; Tabolacci, 2008).

Consoante o número de repetições do trinucleótido CGG, o gene *FMRI* pode ocorrer sob quatro formas alélicas distintas: normal, intermédia, pré-mutação e mutação completa (Sherman, 2005).

Em situações normais, o número de repetições de CGG na região 5'UTR do gene *FMRI* varia entre 6 a 44, sendo que, em média, a população geral tem entre 29 a 30 repetições, não havendo risco de expansão nem fenótipo associado à doença (Hayes, 2009; Wang, 2012). Quando o número de repetições varia entre 45 e 54, considera-se um alelo intermédio, que é mais instável, mas, ainda assim, não tem implicações fenotípicas. Já quando o número de repetições oscila entre 55 e 200, denomina-se pré-mutação (PM). Esta expansão pode originar insuficiência ovárica precoce (FXPOI) nas mulheres ou síndrome de tremor/ataxia (FXTAS) em ambos os sexos (McCary, 2013). Por fim, os alelos com mais de 200 repetições de CGG estão associados a

hipermetilação e inibição da transcrição do gene e, conseqüentemente, à ausência da proteína FMRP, tratando-se de uma mutação completa (MC), responsável pelo fenótipo típico da SXF (Maddalena, 2001; Thompson e Thompson, 2015).

O fenótipo desta síndrome é variável e depende do grau de expansão e metilação do gene. Para além de défice cognitivo e dismorfismos físicos característicos, a SXF está associada a diversas comorbilidades médicas.

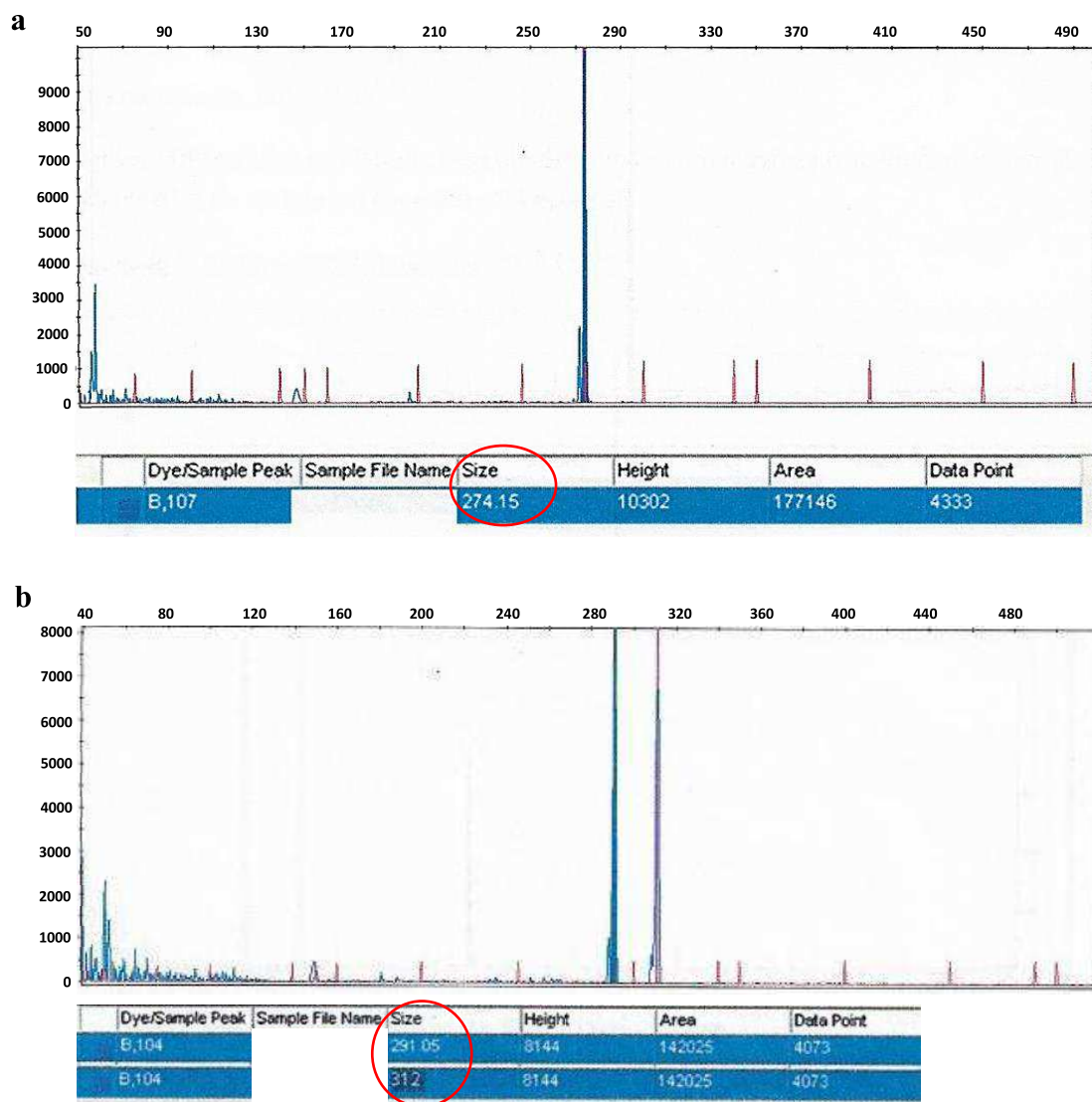
O diagnóstico da síndrome do X-frágil é feito tanto em pré como pós-natal, com recurso à técnica *PCR (polymerase chain reaction)*, cujo principal objetivo é determinar o número de repetições CGG, o grau de metilação do gene e a forma alélica correspondente (Pandey, 2004).

A PCR convencional é um método simples e rápido, que utiliza pequenas quantidades de DNA, e permite determinar corretamente o tamanho dos alelos normais, intermédios e pré-mutados, sem influência da inativação aleatória do cromossoma X (Pandey, 2004; Sherman, 2005).

A análise é feita utilizando um par de *primers* específicos que flanqueiam a região-alvo, permitindo a sua amplificação e determinando o número de repetições presentes em cada alelo do indivíduo em análise. As reações de PCR são realizadas num termociclador e as amostras são sequenciadas num sequenciador automático (*Genetic Analyzer 3500 – Applied Biosystems, USA*), recorrendo a uma eletroforese capilar e, em seguida, os resultados são interpretados recorrendo ao *software GeneMapper*, onde se visualiza o tamanho dos fragmentos e se faz o cálculo do número de tripletos CGG para se classificar a forma alélica presente (Sherman, 2005).

Na PCR convencional, para se calcular o número de tripletos, é necessário ver o valor do pico obtido pelo sequenciador e subtrair 221 (que é o tamanho do fragmento amplificado sem a sequência repetitiva) e, em seguida, divide-se esse valor por três e somam-se 6 (que é o fator de correção).

Os resultados obtidos na PCR convencional são conclusivos quando se obtém um pico numa amostra do sexo masculino (Figura 21a) e dois picos numa amostra do sexo feminino (Figura 21b).



**Figura 21** – Exemplos de resultados obtidos por PCR convencional. **(a)** Amostra do sexo masculino com alelo normal, contendo 24 CGG (cálculos:  $274-221=53/3=17,6+6\approx 24$ ); **(b)** Amostra do sexo feminino com alelos normais, contendo 29 e 36 CGG, respectivamente (cálculo do 1º alelo:  $291-221=70/3=23,3+6\approx 29$ ; cálculo do 2º alelo:  $312-221=91/3=30+6=36$ ). Imagens cedidas pelo LCG-FMUC.

Contudo, a PCR convencional não tem a capacidade de amplificar pré-mutações de grandes dimensões ou mutações completas, nem permite a detecção de mosaicos com alelos normais e pré-mutados, devido à amplificação diferencial, pelo que os indivíduos são incorretamente identificados como tendo alelos normais (Pandey, 2004). Para além disso, pode levar a resultados ambíguos.

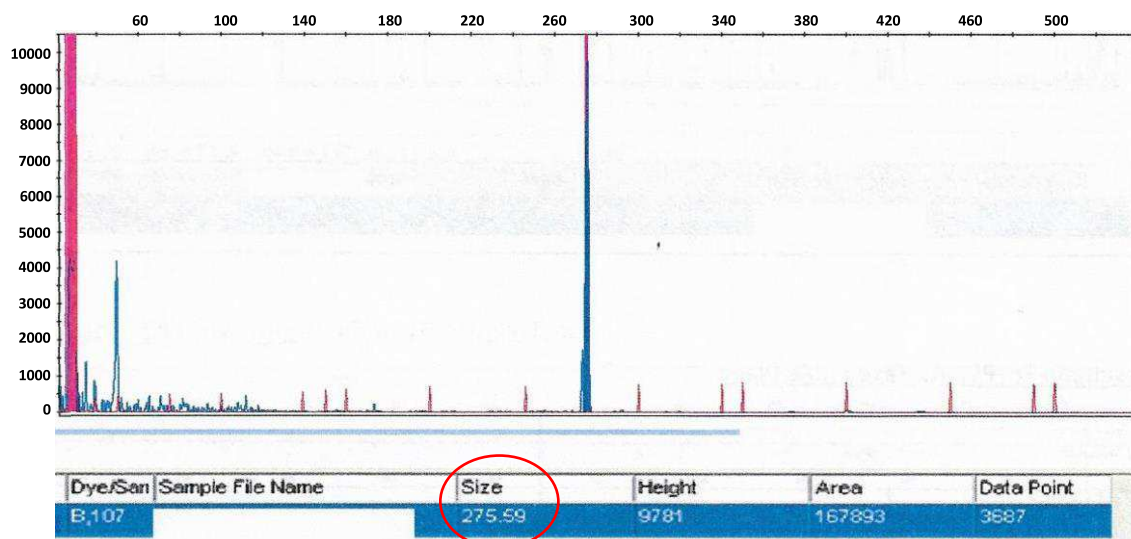
Quando os resultados da PCR convencional são inconclusivos, é necessário recorrer ao *Triplet Repeat Primed PCR (TP-PCR)*, nomeadamente em situações em que: a amostra é do sexo masculino e não se obtém nenhum pico; a amostra é feminina e

apenas tem um pico (homozigótica) ou tem um pico normal e outro indicativo de pré-mutação; existem dúvidas na análise; ou existe história familiar.

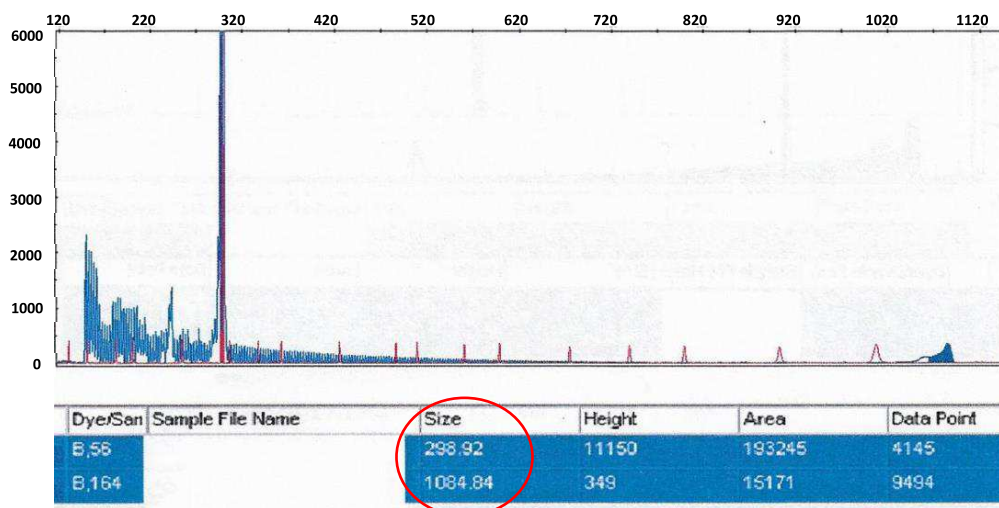
A *TP-PCR*, para além de ter um par de *primers* específicos, contém um terceiro conjunto de *primers* que apresentam complementaridade para os tripletos CGG, o que origina inúmeros fragmentos de diversos tamanhos, permitindo não só detetar pré-mutações de grande dimensão e mutações completas como também discriminar mulheres homozigóticas normais de mulheres com mutação completa (Figura 22). No entanto, esta técnica não deteta alterações que envolvem o gene *FMRI* nem mosaicismo de baixa expressão (Chen, 2010; Seneca, 2012).

Na *TP-PCR*, o cálculo do número de tripletos baseia-se no valor do pico obtido pelo sequenciador automático. De seguida subtraem-se 228 (que é o tamanho do fragmento amplificado sem a sequência repetitiva) e divide-se esse valor por três. Consoante o valor obtido, classifica-se em normal, intermédio, pré-mutação ou mutação completa.

**a – Resultado PCR convencional**



**b – Resultado TP-PCR Assuragen**



**Figura 22** – Exemplo de um resultado inconclusivo obtidos por *PCR* convencional e confirmação por *TP-PCR*. **(a)** Resultado inconclusivo de uma amostra do sexo feminino com apenas um pico, por *PCR* convencional; **(b)** Resultado de uma amostra do sexo feminino com um alelo normal (24 CGG) e outro com uma mutação completa (286 CGG), por *TP-PCR* (cálculo do 1º alelo:  $299-228=71/3\approx 24$ ; cálculo do 2ºalelo:  $1085-228=857/3\approx 286$ ). Imagens cedidas pelo LCG-FMUC.

## **C5 - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)**

O *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) é um método semi-quantitativo e não automatizado capaz de detetar variações no número de cópias (CNVs) de sequências de DNA genómico, numa única reação de PCR *multiplex* (Schouten *et al.*, 2002).

Esta técnica baseia-se na amplificação, por PCR, de até 60 sondas (em que cada uma deteta uma sequência específica de DNA) e na sua separação por eletroforese capilar (Schouten *et al.*, 2002).

O MLPA é útil para a deteção de CNVs, incluindo microdeleções e microduplicações (Boormans *et al.*, 2011). No entanto, não deteta alterações de ploidia, mosaicismos de baixa expressão, alterações estruturais equilibradas nem CNVs que se situem fora da sequência-alvo das sondas (Veghel-Plandsoen *et al.*, 2011).

As principais aplicações do MLPA são no estudo de CNVs em regiões subteloméricas de indivíduos com défice cognitivo e é particularmente importante no diagnóstico de síndromes de microdeleções/microduplicações específicas, tais como a Síndrome de Williams ou Síndrome de DiGeorge; ou associadas a alterações do espectro do autismo (Cai *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010).

Em termos laboratoriais, esta técnica pode dividir-se em 5 etapas:

1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas;
2. Ligação das sondas hibridizadas;
3. Amplificação por PCR;
4. Separação de produtos de amplificação por eletroforese capilar;
5. Análise de resultados.

Primeiramente, as amostras de DNA são colocadas no termociclador para desnaturar e separar as cadeias de DNA. Posteriormente, é adicionada uma *mix* de hibridização (que contém uma mistura de sondas MLPA) e um tampão (MRC-Holland, 2019) (Figura 23A).

Cada sonda de MLPA consiste em duas hemi-sondas de oligonucleótidos, uma sintética e uma derivada do bacteriófago M13. Os dois oligonucleótidos hibridizam em



locais específicos adjacentes da sequência-alvo, tendo cada hemi-sonda uma sequência de *primers* universal numa extremidade, que permite a amplificação simultânea, por PCR *multiplex*, de todas as sondas e, para além disso, uma das hemi-sondas inclui uma sequência *stuffer*, de tamanho diferente para cada sonda, o que permitirá a obtenção de produtos de PCR com tamanhos distintos para cada uma das sondas (Schouten *et al.*, 2002; MRC-Holland, 2019).

As sondas de MLPA ficam a incubar durante 15 a 20 horas para hibridizar com as sequências-alvo diretamente adjacentes, de modo a serem ligadas numa única sonda, na fase da ligação.

Após a hibridização, é adicionada uma mistura que contém o tampão da ligase A, o tampão da ligase B e a enzima Ligase-65. As sondas que hibridizaram são ligadas pela Ligase-65 com as sequências-alvo imediatamente adjacentes para poderem ser amplificadas por PCR (Schouten *et al.*, 2002; MRC-Holland, 2019) (Figura 23B).

De notar que a enzima Ligase-65 é muito específica. Se não ocorrer a hibridização imediatamente adjacente das 2 hemi-sondas com as sequências-alvo, a enzima não será capaz de fazer a sua ligação e formar um único fragmento passível de ser amplificado (Schouten *et al.*, 2002).

A etapa da ligação termina inativando-se a enzima Ligase-65, de modo a separar as sondas da cadeia de DNA complementar, antes da fase seguinte – amplificação.

Para a amplificação das sondas, é adicionada uma *mix* que contém a enzima polimerase e uma *mix* de *primers* (constituída por dNTPs e os *primers sense* e *anti-sense* para PCR). O *primer sense (forward)* para a PCR é marcado com um fluorocromo (geralmente, FAM) para que os produtos da amplificação sejam visualizados durante a separação dos fragmentos, na eletroforese capilar (Schouten *et al.*, 2002; MRC-Holland, 2019).

Uma vez ligadas, todas as sondas de MLPA são, então, amplificadas numa única reação de PCR, utilizando apenas um par de *primers* (Figura 23C).

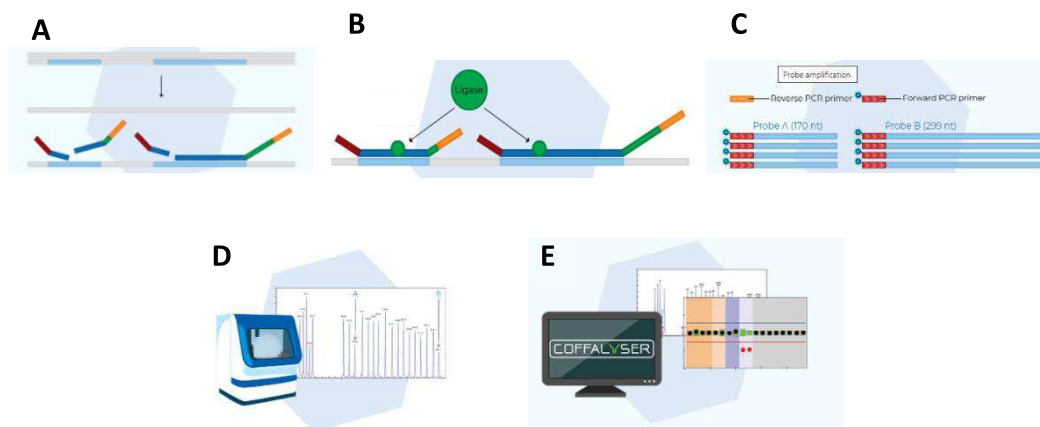
Os produtos de PCR de tamanho individual são, posteriormente, separados e quantificados por eletroforese capilar. A separação dos fragmentos por eletroforese

capilar é feita consoante a sequência *stuffer* de cada uma das sondas. Para se determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, é utilizado um marcador de peso molecular em que os fragmentos possuem tamanhos previamente conhecidos (geralmente, ROX500 ou LIZ500). Tanto os fragmentos amplificados da amostra em estudo como os do marcador de peso molecular são marcados com fluoróforos diferentes. A intensidade dos fluoróforos é visualizada num padrão de picos, designado de eletroferograma (Figura 23D).

Comparando os picos, é possível determinar o tamanho de cada fragmento de MLPA amplificado. Uma vez determinados os tamanhos, cada pico representativo de um fragmento de MLPA amplificado pode ser associado a uma sonda do painel selecionado e estas poderão ser quantificadas durante a etapa de análise (Schouten *et al.*, 2002).

Por fim, a análise de resultados é feita através do *software Coffalyser* (V140721.1958). Este *software* permite ver os resultados e os respetivos rácios obtidos através de uma comparação entre as sondas de referência e as sondas-alvo, com o intuito de identificar possíveis CNVs (MRC-Holland, 2019) (Figura 23E).

O número de cópias é obtido pela razão entre a área do pico da sonda-alvo (amostra) e a média das áreas dos picos das sondas de referência. Um rácio com um valor entre 0,8 e 1,2 é considerado um resultado MLPA normal (sem alteração). Já um rácio inferior a 0,7 é indicativo de uma deleção e um rácio superior a 1,3 é indicativo de uma duplicação (Schouten *et al.*, 2002; Willis *et al.*, 2012).



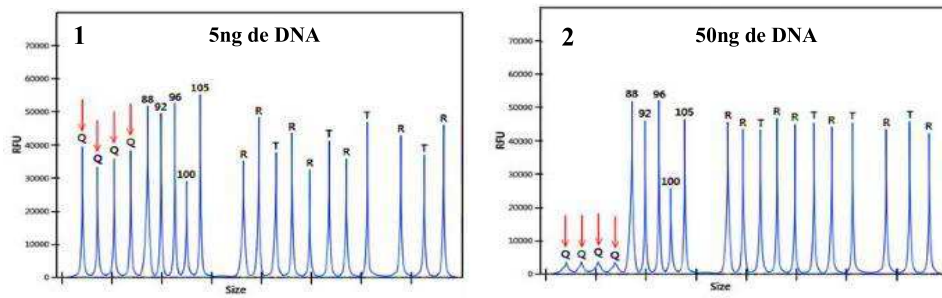
**Figura 23** – Representação esquemática das etapas do procedimento de MLPA. (A) Desnaturação do DNA e hibridização das sondas; (B) Ligação das sondas hibridizadas; (C) Amplificação por PCR; (D) Separação de produtos de amplificação por eletroforese capilar; (E) Análise dos dados através do *software Coffalyser*. Adaptado de MRC-Holland.

Para obter bons resultados, é importante ter boas amostras e bons controles. Cada experiência de MLPA deverá incluir: amostras a analisar, 3 controles normais ou referências, 1 controle positivo e 1 controle negativo. Os 3 controles normais servem para comparar com a amostra a analisar e devem estar distribuídos pelo termociclador. Já o controle negativo serve para ver se não há contaminações e o positivo para fazer o controle da reação (MRC-Holland, 2019).

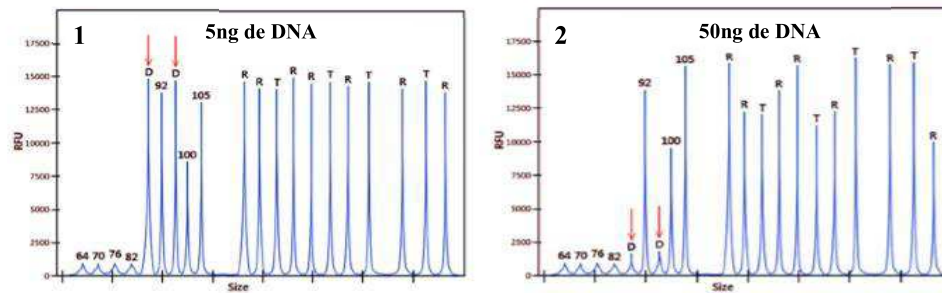
A qualidade da reação MLPA é avaliada pela presença de picos de controle de qualidade (CQ) que fornecem informações sobre a eficiência da amplificação e a quantidade correta de DNA utilizada. Para o controle interno de qualidade, é necessário ter: uma sonda padrão, fragmentos Q, fragmentos D, um branco e fragmentos X e Y (MRC-Holland, 2019).

A sonda padrão é uma sonda normal que serve de elemento-padrão para comparar com os fragmentos Q e D. Os fragmentos Q (64, 70, 76 e 82 nt) funcionam como um controle para se saber se foi adicionada quantidade de DNA suficiente e se a ligação foi bem-sucedida. Estes fragmentos não precisam de hibridizar com o DNA ou de serem ligados para amplificarem durante a reação de PCR. Quando a quantidade de DNA é reduzida ou de má qualidade, os fragmentos Q apresentam valores elevados, enquanto que, quando a quantidade de DNA é adequada, apresentam valores baixos. De notar que, no controle negativo, é esperado encontrar valores elevados, visto que não há amostra, logo não há DNA (MRC-Holland, 2019) (Figura 24A). Relativamente aos fragmentos D (88 e 96 nt), estes detetam sequências em ilhas CpG excepcionalmente densas. As ilhas CpG apresentam um elevado teor de GC e são difíceis de desnaturar. Quando os fragmentos D apresentam valores baixos, indica que a amostra de DNA não foi suficientemente desnaturada. A desnaturação incompleta de uma amostra de DNA pode originar falsos resultados e, por isso, não podemos confiar neles, porque não houve uma correta hibridização. Portanto, idealmente os valores dever ser elevados para se concluir que houve uma desnaturação completa (Figura 24B). Por último, o controle sem DNA (branco) deve apresentar somente os 4 fragmentos Q e os fragmentos X e Y são controles para a identificação do sexo da amostra (MRC-Holland, 2019).

### A – Fragmentos Q (quantidade de DNA)



### B – Fragmentos D (qualidade do DNA)



**Figura 24** – Controlo interno de qualidade da reação MLPA através da análise dos fragmentos Q e D. **(A1)** Valores dos fragmentos Q elevados, devido à pequena quantidade de DNA (5ng); **(A2)** Valores dos fragmentos Q baixos, devido à quantidade de DNA suficiente na amostra (50ng); **(B1)** Valores elevados dos fragmentos D, indicativos de uma desnaturação completa; **(B2)** Valores baixos dos fragmentos D, indicativos de uma desnaturação incompleta. Adaptado de *MRC-Holland*.

## **C6 – Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA)**

O *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MS-MLPA) é uma técnica semi-quantitativa e não automatizada usada para determinar a variação do número de cópias (CNVs) e avaliar a metilação de sequências de DNA, numa única reação de PCR *multiplex* (MRC-Holland, 2020).

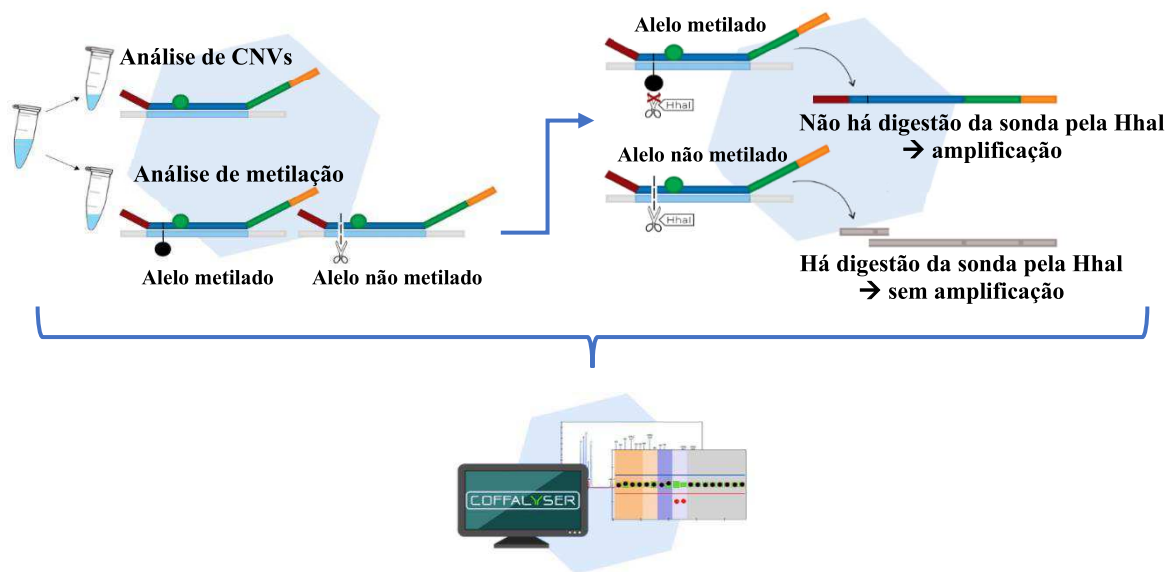
O princípio do MS-MLPA baseia-se na amplificação de até 60 sondas (em que, cada uma, deteta uma sequência de DNA específica) e no uso de uma endonuclease (a *HhaI*), que é sensível ao DNA metilado (MRC-Holland, 2020).

O procedimento desta técnica é muito semelhante ao descrito para o MLPA. A diferença é que, na fase da ligação, a reação MS-MLPA é dividida em 2 partes: uma parte da reação é processada como uma reação MLPA normal, dando informações sobre o número de cópias do DNA alvo, enquanto a outra parte é processada com a adição (à reação) de uma enzima de restrição sensível à metilação (*HhaI*), que fornece informações sobre o perfil de metilação do DNA alvo. Esta enzima é adicionada ao mesmo tempo que a enzima Ligase-65 (MRC-Holland, 2020).

As sondas específicas de metilação têm sequências de DNA que contêm um sítio de restrição para a enzima *HhaI*. Esta enzima é capaz de reconhecer a sequência GCGC não metilada e, como tal, é usada para digerir as amostras de DNA não metiladas. Estas sondas, ao hibridizarem com um alvo de DNA não metilado, serão ligadas e, simultaneamente, digeridas pela *HhaI* (MRC-Holland, 2020).

Uma sonda MS-MLPA digerida não irá gerar um sinal, porque não pode ser amplificada na reação de PCR. Em contraste, quando a sequência-alvo da sonda MS-MLPA é metilada, o grupo metil impedirá a sua digestão com a *HhaI* e, por não ser digerida pela enzima, será amplificada na reação de PCR, resultando num sinal normal (MRC-Holland, 2020) (Figura 25).

Os resultados obtidos são analisados utilizando o *software Coffalyser* (V140721.1958) e a interpretação das CNVs é feita da mesma forma para o MLPA. Já a interpretação do estado de metilação das amostras em estudo é feita intra-amostra, comparando as sondas-alvo digeridas com as não-digeridas (MRC-Holland, 2020).



**Figura 25** – Representação esquemática do procedimento de MS-MLPA. Adaptado de *MRC-Holland*

Atualmente, o MS-MLPA é essencial para o diagnóstico molecular de várias doenças causadas pela metilação anormal do DNA. Uma das aplicações mais utilizadas está relacionada com o diagnóstico molecular da Síndrome de *Prader-Willi* (PWS) e da Síndrome de *Angelman*, que são as doenças genéticas mais comuns associadas a *imprinting* genômico, bem como no diagnóstico molecular da Síndrome de *Beckwith-Wiedemann* e a Síndrome de *Silver-Russel* (MRC-Holland, 2020).

## C7 – Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)

O *Array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH) é uma técnica de *microarray* que permite estudar todo o genoma em simultâneo, com uma resolução superior à citogenética. O princípio desta técnica baseia-se na comparação entre o genoma da amostra em estudo com um genoma de referência, de modo a identificar possíveis desequilíbrios cromossómicos (CNVs), incluindo alterações submicroscópicas, na amostra em estudo (Allemeersch, *et al.*, 2009; Shaffer *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2013). Contudo, o aCGH não deteta alterações equilibradas, poliploidias, mosaïcismo de baixa expressão, dissomia uniparental nem mutações pontuais (Park *et al.*, 2010; Novelli *et al.*, 2012).

Esta técnica pode ser realizada utilizando 2 tipos de sondas diferentes: *bacterial artificial chromosomes* (BACs), com um tamanho variável entre 80 e 200 pb, ou oligonucleótidos, que têm um tamanho entre 25 e 85 pb (Shaffer e Bui, 2007). As sondas de oligonucleótidos são as mais utilizadas (incluindo no LCG-FMUC) visto que existem muitas sondas disponíveis comercialmente e estas têm uma melhor resolução, com uma capacidade para detetar alterações mais pequenas, comparativamente às sondas de BACs (Bi *et al.*, 2008).

O procedimento laboratorial divide-se, essencialmente, em três etapas:

- Marcação do DNA genómico com fluorescência (ou *labeling*);
- Co-hibridização;
- *Scanning* das lâminas que contêm as amostras de DNA.

Primeiramente, procede-se à extração e quantificação do DNA das amostras em estudo. Em seguida, faz-se a marcação do genoma em análise e do genoma de referência com fluorocromos de diferentes cores (Cianina 5 (Cy5), que marca as amostras em estudo a vermelho, e a Cianina 3 (Cy3), que marca as referências a verde). Após a marcação dos genomas, quantificam-se as amostras e faz-se a co-hibridização num *microarray* (lâminas de vidro), que contêm oligonucleótidos (sondas de DNA) para as diversas regiões genómicas, sendo que as amostras em estudo e as de referência vão hibridizar juntamente com uma mistura de hibridização, constituída por *Cot-1 DNA*, para minimizar a hibridização inespecífica (Zuffardi *et al.*, 2011).

Terminada a hibridização competitiva entre ambas as amostras de DNA com as sondas, fazem-se lavagens e coloca-se o *microarray* num *scanner*, para medir a intensidade de fluorescência das amostras. Por fim, as imagens obtidas pelo *scanner* são processadas, com *softwares* específicos, e sujeitas a uma avaliação, com diversos parâmetros de qualidade, de modo a verificar se podem prosseguir para análise e interpretação dos resultados (Allemeersch *et al.*, 2009; Brady e Vermeesch, 2012).

A análise e interpretação dos resultados é feita através da avaliação e quantificação da fluorescência utilizando o *software CytoGenomics* da *Agilent Technologies*<sup>®</sup>, que fornece um rácio, em forma de logaritmo (log), das intensidades de fluorescência emitidas pelas amostras em estudo e referências (Kallioniemi *et al.*, 1992; Zuffardi *et al.*, 2010; Brady e Vermeesch, 2012).

A diferença entre a intensidade de fluorescência emitida pelo DNA em estudo e pelo DNA de referência é proporcional à diferença no número de cópias entre ambas as amostras, ou seja, se for emitida uma cor amarela, significa que a intensidade de fluorescência de Cy5 (vermelho) e Cy3 (verde) é igual para um determinado locus, tendo um valor de 0 ( $\log_2 2/2 = 0$ ), o que indica que há um equilíbrio no número de cópias nessa região genómica. Por outro lado, se for emitida cor vermelha, significa que a amostra em estudo (Cy5) apresenta maior fluorescência comparativamente à amostra de referência (Cy3), o que indica que tem um ganho de material genómico nessa região ( $\log_2 3/2 = 0,58$ ). Caso seja emitida uma cor verde, significa que a amostra em estudo apresenta uma perda de material genómico, numa determinada região ( $\log_2 1/2 = -1$ ) (Allemeersch *et al.*, 2009).

O *software CytoGenomics* permite, ainda, comparar as amostras em estudo com as amostras de referência e, assim, determinar o número de cópias presentes (Kallioniemi *et al.*, 1992; Zuffardi *et al.*, 2010; Brady e Vermeesch, 2012).

Para a análise das variações no número de cópias (CNVs) encontradas na amostra em estudo, primeiramente, é necessário eliminar as CNVs da referência e, em seguida, classificar as CNVs de interesse, de acordo com a sua patogenicidade, em: Benigna; Provavelmente benigna; De significado clínico incerto (VOUS); Provavelmente patogénica; Patogénica.



As CNVs são consideradas benignas quando a alteração não está associada a um fenótipo patogénico, contrariamente às CNVs patogénicas. As CNVs são classificadas como sendo de significado clínico incerto quando não se consegue dizer o impacto da alteração no fenótipo (Lee *et al.*, 2007; Clancy, 2008).

A classificação é feita com recurso a bases de dados internacionais para comparar a CNV encontrada com alterações genéticas já identificadas. O *software* utilizado dá acesso direto à base de dados *UCSC Genome Browser* para cada uma das alterações encontradas, o que permite obter informações sobre: os genes envolvidos; alterações semelhantes já descritas (se são patogénicas, VOUS ou benignas); possíveis CNVs reportadas em indivíduos saudáveis na DGV (*Database of Genomic Variants*); possíveis síndromes relacionadas com a região da alteração encontrada, através da base de dados *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)*; e casos descritos com alterações semelhantes à encontrada e o respetivo fenótipo, através da base de dados *DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources)* (Hastings *et al.*, 2012).

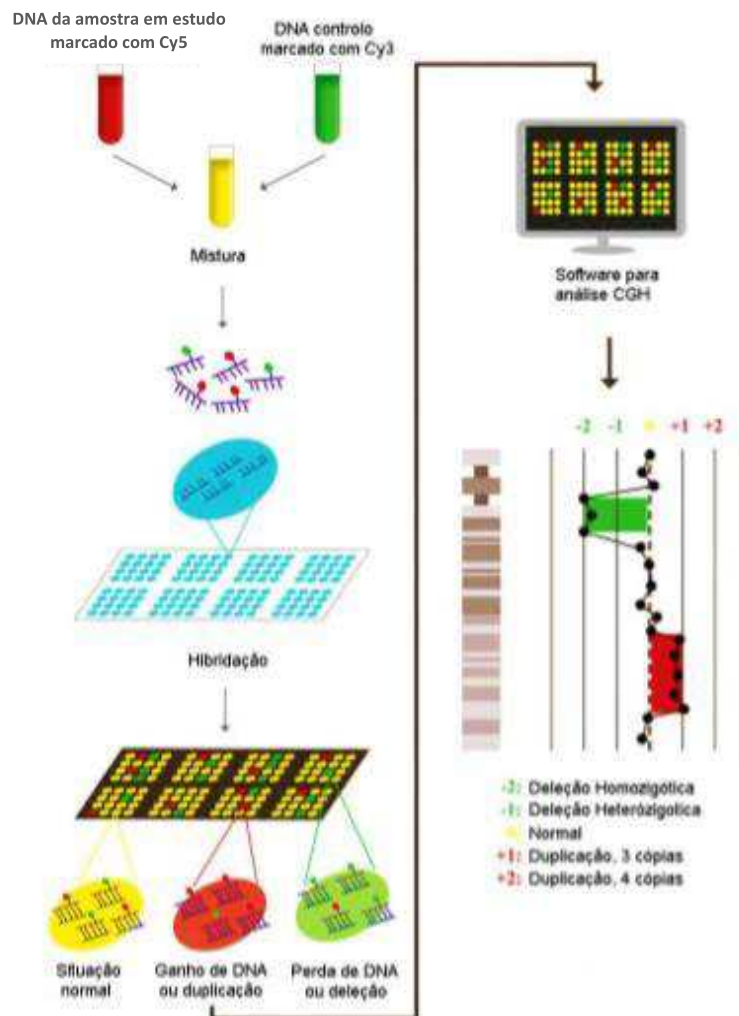
A interpretação das CNVs é feita com base na análise, nas indicações clínicas e no estudo dos progenitores. No caso do DPN, as informações da ecografia são fundamentais para a análise do aCGH, caso apresentem anomalias fetais ou sinais ecográficos de alerta (Vermeesch *et al.*, 2012; Hillman *et al.*, 2012).

Os resultados que apresentam maior complexidade ao nível da interpretação são os de significado clínico incerto, visto que, através da análise do genótipo, não se consegue definir a sua patogenicidade (Clancy, 2008; Vermeesch *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2013).

Para as CNVs classificadas como sendo patogénicas, deve ser feita uma pesquisa na literatura para tentar encontrar casos semelhantes reportados e entender as suas implicações.

Por fim, deve ser elaborado um relatório com o resultado obtido, de acordo com o ISCN em vigor e com as *guidelines* internacionais, e, no caso de haver CNVs patogénicas, é importante reportar o diagnóstico e colocar referências bibliográficas de casos semelhantes descritos na literatura (Silva *et al.*, 2019).

Atualmente, devido ao seu poder de resolução, o aCGH, na maioria das situações, é o teste de primeira linha e é amplamente utilizado em diagnóstico pós-natal, nomeadamente em casos de indivíduos com défice intelectual, dismorfismos, anomalias congénitas múltiplas e perturbação do espectro autista; e em diagnóstico pré-natal, nomeadamente em fetos com anomalias ecográficas e após um cariótipo com uma alteração estrutural desequilibrada *de novo*. Pode, também, ser utilizado em oncologia (Ahn *et al.*, 2010).



**Figura 26** – Representação esquemática da técnica de aCGH. O DNA das amostras em estudo e das referências é marcado com dois fluorocromos (Cy5 e Cy3, respetivamente). Em seguida, faz-se a co-hibridização competitiva num *microarray* (lâmina de vidro), que contém oligonucleótidos. Posteriormente, é feita a leitura das lâminas num *scanner* e, por fim, a análise de resultados no *software*. Adaptado de Colaianni *et al.* (2016).

## **C8 – Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT)**

O teste pré-natal não-invasivo (NIPT) é um teste de rastreio que se baseia na análise do DNA fetal livre em circulação materna, a partir de uma amostra de sangue periférico, e permite determinar o risco do feto para determinadas alterações cromossômicas, nomeadamente aneuploidias dos cromossomas 13, 18 e 21, e ainda, determinar o sexo fetal. Para além disso, consoante o método utilizado, o NIPT é capaz de dar informação sobre aneuploidias dos cromossomas sexuais (Lo *et al.*, 1997; Curnow *et al.*, 2018).

Esta técnica molecular utiliza a sequenciação de nova geração (NGS) sendo, por isso, uma abordagem com elevada especificidade e sensibilidade no rastreio de aneuploidias mais comuns (Curnow *et al.*, 2018).

Embora os métodos de rastreio baseados na quantificação de proteínas no sangue materno e na avaliação ecográfica tenham uma sensibilidade de cerca de 80-90% para a trissomia 21, apresentam uma taxa de falsos-positivos de cerca de 5%, o que faz com que tenham valores preditivos positivos baixos (~5%), levando à necessidade de submeter as grávidas a procedimentos invasivos mais frequentemente (Malone, 2005). No entanto, o NIPT pode aumentar significativamente a taxa de deteção de fetos com T21 e diminuir os resultados falsos-positivos, visto que tem valores preditivos positivos acima de 50%, reduzindo o número de procedimentos invasivos (Bianchi, 2014; Curnow *et al.*, 2018). Assim sendo, a sensibilidade/especificidade do NIPT para a trissomia 21 é superior a 99%. Já para as outras aneuploidias, apresenta uma sensibilidade/especificidade mais baixa (Goldwaser e Klungman, 2018).

O DNA livre em circulação materna (cfDNA) é uma mistura de DNA materno e DNA fetal, com origem na placenta, e corresponde a cerca de 3-13% do total do cfDNA. A precisão/sucesso do NIPT irá depender da tecnologia utilizada e da percentagem de DNA fetal livre no sangue materno (denominada fração fetal) (Breveglieri *et al.*, 2019).

A fração fetal (FF) é um parâmetro muito importante na análise do NIPT e o seu valor pode aumentar com a idade gestacional ou diminuir com as características maternas (por exemplo, obesidade) e feto-placentares (por exemplo, se tem aneuploidia

do 13 ou 18) (Breveglieri *et al.*, 2019). O valor mínimo de FF para obter resultados precisos é de 2-4% (Deng e Liu, 2022).

Como tal, é importante haver cfDNA fetal suficiente na corrente sanguínea da mãe para ser possível identificar alterações cromossômicas fetais, porque baixas frações fetais podem levar à impossibilidade de realizar o NIPT ou a um resultado falso-negativo (Goldwaser e Klungman, 2018).

O NIPT pode ser realizado a partir da 10<sup>a</sup> semana de gestação, visto que, nesta altura, a fração fetal já se encontra, geralmente, acima de 4%. Não deve ser realizado antes porque a FF é demasiado baixa para obter resultados confiáveis e não deve ultrapassar as 16 semanas para que seja possível realizar outros testes em tempo útil, caso seja necessário confirmar o resultado obtido (Breveglieri *et al.*, 2019).

Quando o resultado é positivo, é necessário fazer a sua confirmação recorrendo a métodos invasivos, porque o material genético utilizado na análise não é proveniente do feto diretamente e pode-se estar perante um mosaicismo confinado à placenta (Goldwaser e Klungman, 2018).

As plataformas utilizadas para o NIPT baseiam-se em métodos de contagem ou métodos de genotipagem utilizando *SNPs* (Goldwaser e Klungman, 2018), sendo este último o utilizado no LCG-FMUC.

O procedimento laboratorial consiste, primeiramente, em isolar o plasma do sangue materno para se fazer a extração e purificação do cfDNA. De seguida, preparam-se bibliotecas para amplificar o cfDNA por PCR *multiplex*. Após a amplificação, é feita uma purificação do produto de PCR *multiplex* através de “*beads*” magnéticas. Posteriormente, faz-se um PCR universal, onde são incluídas sequências específicas (*barcodes*) que irão permitir distinguir as sequências de cada grávida. Terminado o PCR universal, é realizado um controlo de qualidade de todos os produtos amplificados, através de um gel de agarose e, tal como no PCR *multiplex*, uma purificação com “*beads*” magnéticas. Por fim, as amostras são quantificadas num fluorímetro *Qubit* e é feito o *pooling* com o número de bibliotecas para a plataforma *Illumina* utilizada e são feitas diluições adequadas do *pool*.

Finalizada a sequenciação de nova geração (NGS), é gerado um ficheiro *FASTQ* e, a partir deste ficheiro, é feita a análise de vários parâmetros, nomeadamente a fração fetal (que não deve ser inferior a 3%, caso contrário o resultado é inconclusivo), a ploidia dos cromossomas 13, 18 e 21 e, opcionalmente, o sexo do feto.

A análise e interpretação dos resultados é feita através de uma *pipeline* informática de análise de dados (*Clarigo Reporter V2.0*).

De notar que o NIPT baseado em *SNPs* não pode ser aplicado em casos de gravidez múltipla nem gestações resultantes de procriação medicamente assistida (com recurso a doação de óvulos) (Kim, 2022).

### **6.3. Fase pós-analítica**

A fase pós-analítica é a etapa final do processo laboratorial e está dependente do sucesso das fases anteriores, por isso é importante garantir a qualidade de todos os procedimentos (Silva *et al.*,2019).

Esta fase inclui a interpretação/validação dos resultados, a emissão de um relatório e a sua comunicação ao médico requisitante, dando todas as informações relevantes sobre o resultado obtido. O tempo de resposta deve ser o mais breve possível, tendo em conta o motivo do estudo e o nível de urgência, e o relatório deve ser feito segundo as *guidelines* estabelecidas e de acordo com as normas estabelecidas pela *ISO15189*. Para além disso, é importante que o relatório seja informativo, claro e objetivo de forma a ser facilmente interpretado (Silva *et al.*,2019). Em anexo, encontra-se um exemplo de um relatório (anexo 2).

Por fim, toda a informação clínica e laboratorial do caso estudado deve ser devidamente armazenada/arquivada (Wolf e Wolf, 2017).

**Tabela 1** – Vantagens e desvantagens/limitações das técnicas de citogenética, genética molecular e genômica.

Área	Técnica	Vantagens	Desvantagens/Limitações
Citogenética	<b>Citogenética Convencional</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudo simultâneo de todos os cromossomas;</li> <li>• Permite detetar alterações cromossômicas numéricas/estruturais, incluindo rearranjos equilibrados e desequilibrados, e situações de mosaicismos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limite de resolução (5-10Mb);</li> <li>• Requer cultura celular e experiência por parte do técnico;</li> <li>• Tempo de resposta demorado.</li> </ul>
	<b>Citogenética Molecular (FISH)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior poder de resolução que a citogenética convencional, capaz de detetar alterações equilibradas com tamanho inferior a 3-5Mb;</li> <li>• Técnica simples, com elevada especificidade e sensibilidade;</li> <li>• Pode ser realizada em núcleos em interfase, cromossomas em metafase ou outras células (em vários tipos de tecidos);</li> <li>• Permite detetar alterações cromossômicas não detetáveis por citogenética convencional, identificar situações de mosaicismos e caracterizar cromossomas marcadores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica laboriosa, dispendiosa, dirigida e a análise é complexa;</li> <li>• Não permite detetar alguns rearranjos submicroscópicos, mosaicismos de baixa expressão, bem como alterações a nível génico (DNA);</li> <li>• Os resultados baseiam-se unicamente nas regiões abrangidas pela sonda.</li> </ul>
Genética Molecular e Genómica	<b>QF-PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É uma técnica simples, rápida e fácil de interpretar, com alta sensibilidade e especificidade na deteção de alterações cromossômicas;</li> <li>• Não é necessário: cultura celular, pessoal especialmente treinado ou equipamento especializado nem muita quantidade de DNA genómico;</li> <li>• Pode detetar triploidias, mosaicismos e contaminação de células maternas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O custo-benefício depende do rendimento da amostra;</li> <li>• Não deteta rearranjos equilibrados nem desequilíbrios cromossômicos envolvendo regiões fora das localizações dos STRs utilizados;</li> <li>• Não deteta mosaicismos de baixa expressão.</li> </ul>
	<b>MLPA /MS-MLPA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É uma técnica com custo acessível, reproduzível, fácil de executar e interpretar;</li> <li>• É sensível para a deteção de aneuploidias mais comuns;</li> <li>• Não necessita de cultura celular, equipamento específico nem muita quantidade/qualidade de DNA;</li> <li>• Permite a análise e o processamento de um grande número de amostras em simultâneo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não deteta: alterações de ploidia, mosaicismos de baixa expressão, rearranjos equilibrados, contaminação materna, deleções/duplicações que se situem fora da sequência alvo das sondas;</li> <li>• Alterações (como SNPs, mutações pontuais, <i>indels</i> de pequena dimensão) na sequência alvo (ou perto) detetadas por uma sonda podem causar falsos resultados positivos.</li> </ul>
	<b>aCGH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não necessita de células vivas;</li> <li>• Permite identificar genes envolvidos nas alterações cromossômicas;</li> <li>• Baixo limite de resolução (submicroscópico).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não deteta rearranjos equilibrados, mosaicismos de baixa expressão nem dissomia uniparental;</li> <li>• É uma técnica dispendiosa e a sua interpretação pode ser difícil.</li> </ul>
	<b>NIPT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É uma técnica com elevada sensibilidade, especificidade, com taxas de deteção &gt;99% para T21 e falsos-positivos &lt;0,5%.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É uma técnica dispendiosa;</li> <li>• O excesso de peso da grávida é um fator limitante.</li> </ul>

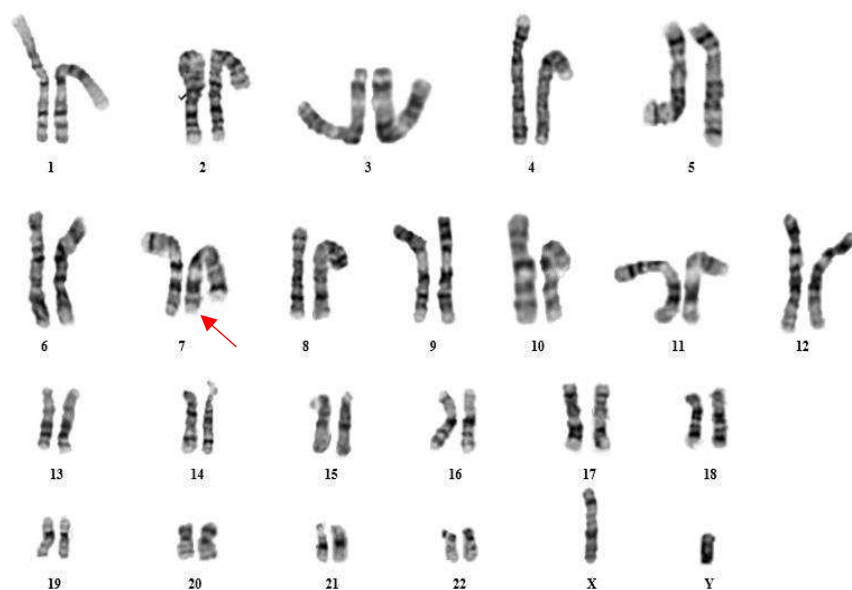
## Capítulo VI – Análise e interpretação de casos clínicos

No decorrer do estágio, foi possível acompanhar casos clínicos, com o intuito de adquirir conhecimento a nível do procedimento laboratorial utilizado bem como a nível da análise e interpretação dos resultados obtidos e elaboração de relatórios, de acordo com as *guidelines* estabelecidas. Alguns desses casos clínicos irão ser discutidos em seguida e abrangem a área da citogenética e a área da genética molecular e genómica.

### 7.1. Caso clínico I

Feto com anomalias ecográficas às 17 semanas, nomeadamente holoprosencefalia, fenda palatina, osso nasal ausente e intestino ecogénico. Progenitor paterno portador de um rearranjo cromossómico –  $t(7;12)(q34;q24)$ . Foi solicitado o estudo do cariótipo.

O estudo citogenético baseou-se na análise cromossómica de metafases com bandagem G, obtidas a partir de células do líquido amniótico. O resultado revelou um cariótipo desequilibrado, de constituição cromossómica masculina, com um derivativo do cromossoma 7 resultante de uma translocação envolvendo os cromossomas 7 e 12, com pontos de quebra em 7q34 e 12q24, de origem paterna:  $46,XY,der(7)t(7;12)(q34;q24)dpat$  (Figura 27).



**Figura 27** – Cariograma representativo do caso clínico I. É possível observar a presença de um derivativo do cromossoma 7 (seta vermelha) resultante de uma translocação envolvendo os cromossomas 7 e 12. Resultado (ISCN-2020):  $46,XY,der(7)t(7;12)(q34;q24)dpat$ .

Deste modo, a análise citogenética revelou que o feto é portador de uma alteração desequilibrada, caracterizada por uma monossomia parcial do cromossoma 7 e uma trissomia parcial do cromossoma 12, resultantes de uma segregação adjacente-1 da translocação recíproca de origem paterna.

Na literatura, está descrito um caso com uma alteração cromossômica semelhante à identificada neste feto, com um quadro ecográfico idêntico, nomeadamente com holoprosencefalia, intestino ecogénico e múltiplas anomalias faciais (como osso nasal ausente e fenda palatina). O aborto espontâneo, morte neonatal ou atraso no desenvolvimento e dificuldades de aprendizagem são também descritas na literatura como consequências prováveis associadas à alteração cromossômica descrita (Tezcan e Bredaki, 2015).

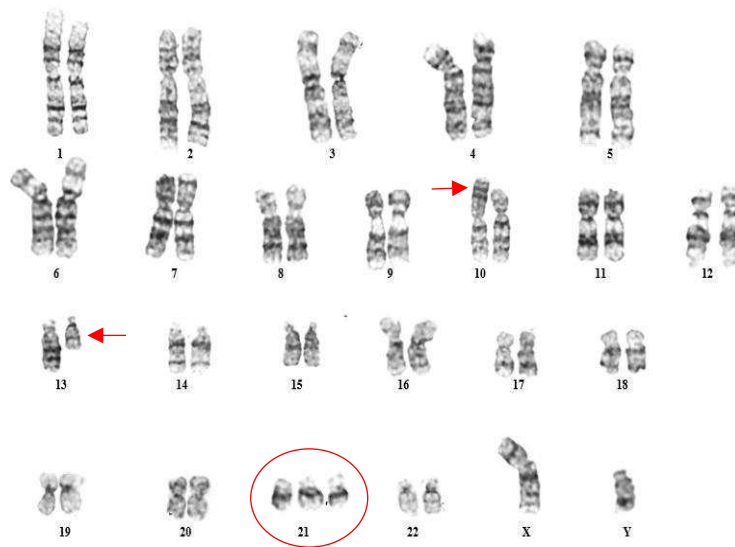
Para discussão do resultado e das suas implicações, foi sugerido no relatório que o casal fosse encaminhado para uma consulta de aconselhamento genético.

## **7.2. Caso clínico II**

Feto com indicação clínica de um NIPT com risco elevado para trissomia 21, às 16 semanas e cinco dias. Foi requerido o estudo do cariótipo.

A análise citogenética de metafases com bandagem G, obtidas a partir da cultura de células do líquido amniótico (com uma resolução de 400 bandas), revelou um cariótipo com 47 cromossomas, de constituição cromossômica masculina, com um cromossoma 21 adicional e uma translocação aparentemente equilibrada envolvendo os cromossomas 10 e 13 (com pontos de quebra em 10p13 e 13q14): 47,XY,t(10;13)(p13;q14),+21 (Figura 28).





**Figura 28** – Cariograma representativo do caso clínico II, com resolução de 400 bandas. É possível observar a presença de um cromossoma 21 adicional (círculo vermelho) e uma translocação aparentemente equilibrada entre os cromossomas 10 e 13 (setas vermelhas).  
Resultado (ISCN-2020): 47,XY,t(10;13)(p13;q14),+21.

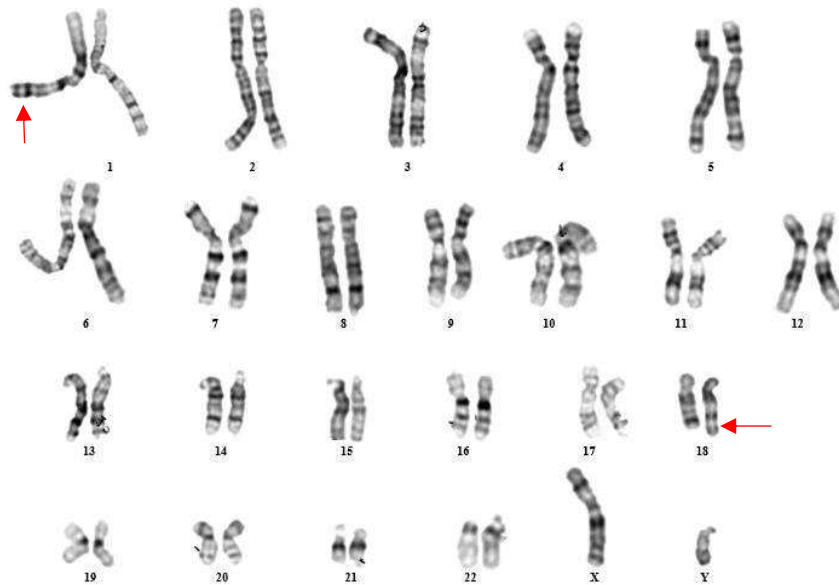
Assim, o estudo citogenético revelou que o feto é portador de uma trissomia 21 livre, associada à Síndrome de Down, e de uma translocação aparentemente equilibrada envolvendo os cromossomas 10p13 e 13q14.

O casal deve ser encaminhado para uma consulta de genética médica para explicação do resultado e suas implicações. Para averiguar a origem da translocação (se é herdada ou *de novo*), será necessário o envio de sangue dos progenitores em heparina, visto que, caso seja herdada, o casal terá um risco aumentado de gerar descendência com desequilíbrios.

### 7.3. Caso clínico III

Foi solicitado o estudo do cariótipo às 19 semanas e cinco dias devido à idade materna avançada.

A análise citogenética de metafases com bandagem G obtidas a partir da cultura de células do líquido amniótico revelou um cariótipo, de constituição cromossômica masculina, com uma translocação aparentemente equilibrada envolvendo os cromossomas 1 e 18, cujos pontos de quebra se localizam em 1q32.1 e 18q21.3 (Figura 29).



**Figura 29** – Cariograma representativo do caso clínico III. É possível observar a existência de uma translocação aparentemente equilibrada entre os cromossomas 1 e 18 (setas vermelhas). Resultado (ISCN-2020): 46,XY,t(1;18)(q32.1;q21.3).

Para averiguar a origem deste rearranjo, é necessário o envio de sangue dos progenitores. Caso se verifique que a translocação é *de novo*, é indicado prosseguir para estudos de aCGH de modo a confirmar se é uma alteração equilibrada ou se existe algum desequilíbrio, não detetável por citogenética. Caso seja herdada de um dos progenitores, é importante ver o fenótipo do portador, fazer estudos familiares e ter em conta que o fenótipo do feto poderá não ser igual ao do progenitor (devido a situações de penetrância incompleta, expressividade variável, etc). Para além disso, se a translocação estiver presente num dos progenitores, o casal terá um risco aumentado de ter descendentes com desequilíbrios.

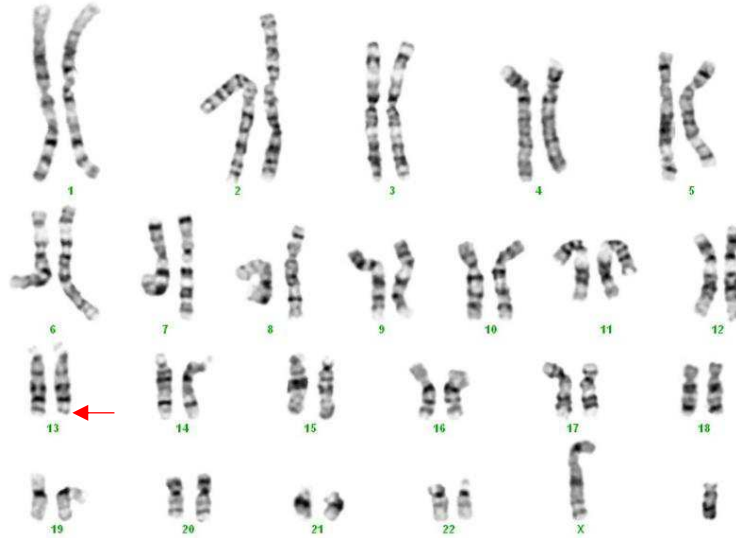
No relatório foi mencionado que o casal deve ser encaminhado para uma consulta de aconselhamento genético para lhe ser explicado o resultado e as suas implicações.

#### 7.4. Caso clínico IV

Feto com rastreio combinado positivo de 1:12 para T21. Primeiramente, foi solicitado o estudo do cariótipo e o despiste das aneuploidias mais comuns por QF-PCR.

O resultado do QF-PCR foi normal, não identificando a presença de aneuploidias mais comuns. A análise citogenética de metafases com bandagem GTL, obtidas a partir

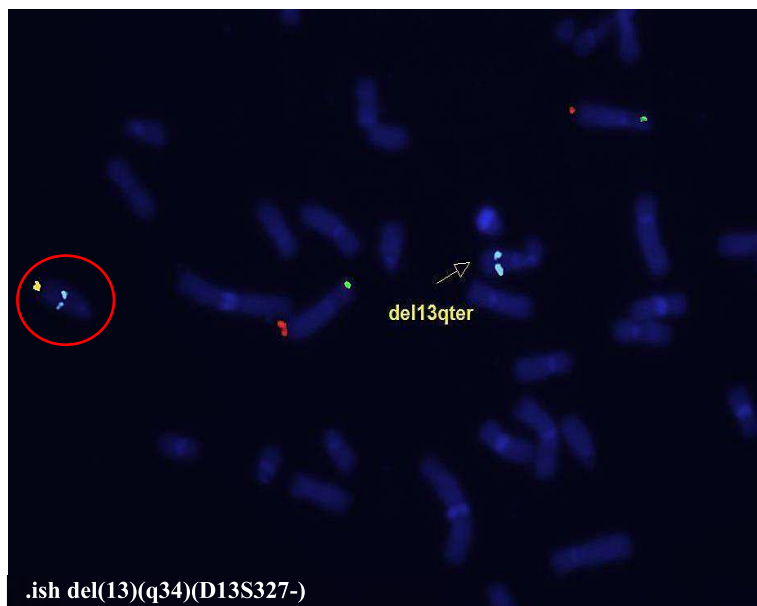
da cultura de células das vilosidades coriônicas, revelou um cariotipo, de constituição cromossômica masculina, com uma deleção terminal no braço longo do cromossoma 13 na região 13q34 (46,XY,del(13)(q34)) (Figura 30).



**Figura 30** – Cariograma representativo do caso clínico IV. Pela análise citogenética, foi possível detetar uma deleção terminal no braço longo do cromossoma 13 na região 13q34 (seta vermelha).

Para confirmar o resultado obtido por citogenética convencional, foi solicitado o estudo por FISH para a região sub-telomérica do braço longo do cromossoma 13.

A técnica de FISH foi realizada utilizando uma sonda sub-telomérica (D13S327) para a região 13q34, do sistema *Totalvision* da *Vysis*, e confirmou a presença de uma deleção terminal no braço longo do cromossoma 13, na região 13q34 (46,XY,del(13)(q34).ish del(13)(q34)(D13S327-)) (Figura 31).



**Figura 31** – Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metafase pela técnica de FISH. Através da sonda sub-telomérica D13S327, específica para a região 13q34 terminal (representada a amarelo), foi possível identificar os dois cromossomas 13, sendo que um tem deleção da região 13q34 (seta amarela) e o outro apresenta os dois sinais de hibridização (círculo vermelho). A sonda D13S327 está combinada com as sondas: VIJyRM2158, específica para a região 6qter (representada a vermelho); 6PTEL48, específica para a região 6pter (representada a verde); sonda aqua específica para a região 13q14.2 (representada a azul).

Esta alteração desequilibrada tem impacto no fenótipo, sendo caracterizada, essencialmente, por atraso global do desenvolvimento, défice intelectual, obesidade e dismorfismos craniofaciais. Pode, ainda, manifestar outras características como: cardiopatias congénitas, anomalias nas mãos e nos pés e agenesia do corpo caloso (*Orphanet: Monosomy 13q34* [online]).

É importante o envio do sangue dos progenitores em heparina para determinar a origem desta alteração (se é herdada de um rearranjo equilibrado de um dos progenitores ou se é *de novo*).

Por outro lado, uma vez que se trata de uma amostra de vilosidades coriônicas e a indicação clínica foi um rastreio bioquímico positivo, existe a possibilidade de se tratar de uma situação confinada à placenta. Deixa-se ao critério da clínica a avaliação da importância de realizar uma ecografia detalhada e a possibilidade de realização do estudo num novo tecido.

Por fim, o resultado encontrado no feto e as suas implicações devem ser discutidas numa consulta de genética.

## 7.5. Caso clínico V

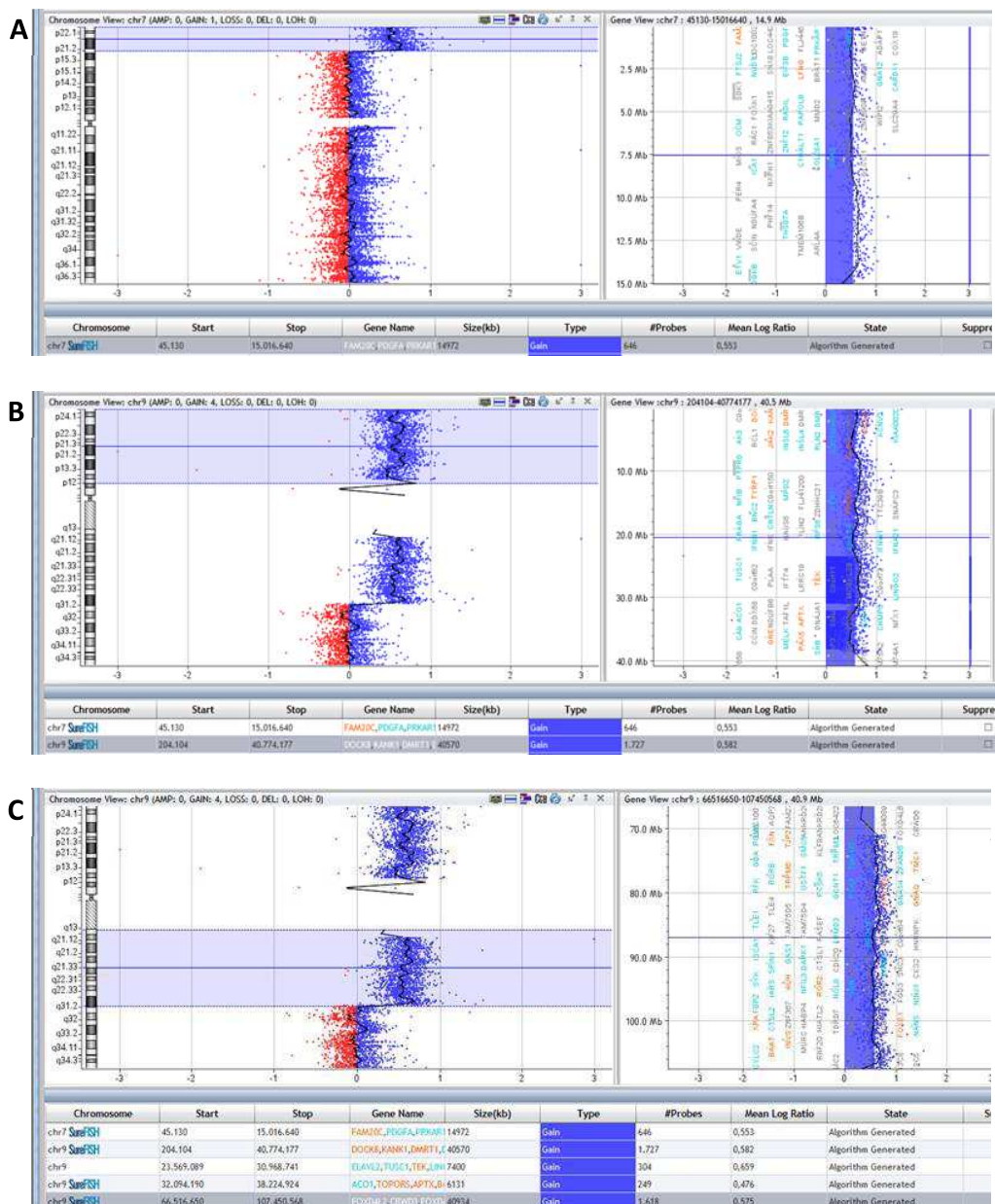
Feto com defeito no septo ventricular, ossos do nariz hipoplásicos e ossos longos <P5. Foi requerido o estudo de aCGH com 180K.

A análise por aCGH foi realizada utilizando um *array* de oligonucleótidos de 180K da *Agilent Technologies*<sup>®</sup> e foi feita com recurso ao software *CytoGenomics*, com um filtro de análise para DPN.

O resultado revelou 3 desequilíbrios:

1. Uma duplicação no braço curto do cromossoma 7 (p21.2p22.3) com tamanho de, aproximadamente, 15 Mb entre as posições nucleotídicas 45,130 e 15,016,640 (Figura 32A);
2. Uma duplicação do braço curto do cromossoma 9 (p13.1p24.3) de, aproximadamente, 40,6 Mb entre as posições nucleotídicas 204,104 e 40,774,177 (Figura 32B);
3. Uma duplicação no braço longo do cromossoma 9 (q13q31.1) com tamanho de cerca de 40,9 Mb entre as posições nucleotídicas 66,516,650 e 107,450,568 (Figura 32C).

Assim, o feto é portador de uma trissomia parcial da região distal do braço curto do cromossoma 7 e de uma trissomia do braço curto do cromossoma 9 e da região proximal do braço longo do cromossoma 9.



**Figura 32** – Resultados obtidos através do estudo de aCGH. **(A)** Duplicação 7p21.2p22.3; **(B)** Duplicação 9p13.1p24.3; **(C)** Duplicação 9q13q31.1. Resultado ISCN-2020: arr[GRCh37] 7p21.2p22.3(45130\_15016640)x3, 9p13.1p24.3(204104\_40774177)x3, 9q13q31.1(66516650\_107450568)x3.

Estas alterações envolvem centenas de genes descritos na base de dados OMIM, sendo que, muitos deles, estão reportados no OMIM *Morbid Map*.

Na base de dados *UCSC Genome Browser*, é possível ter acesso a outras bases de dados. Existem casos descritos na base de dados *Decipher*, com duplicações semelhantes às encontradas, classificadas como patogénicas e provavelmente

patogénicas. Já na base de dados *ClinGen*, estão reportadas várias CNVs em duplicação semelhantes às do feto, classificadas como patogénicas, e na DGV não existem duplicações idênticas descritas.

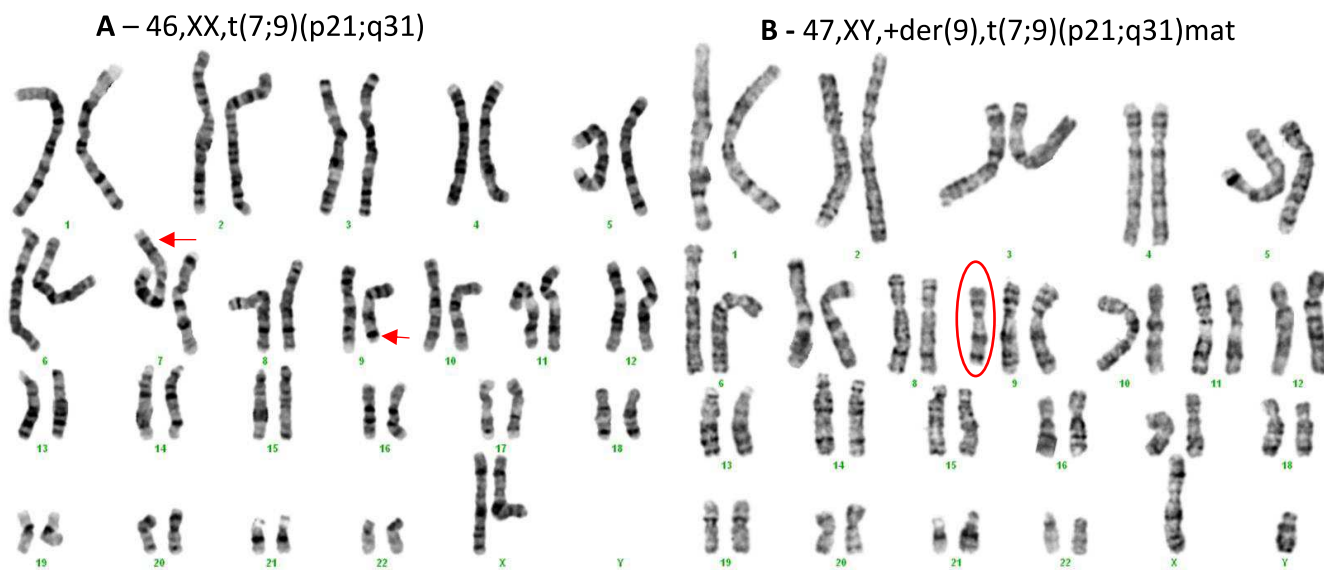
Na literatura, está descrito que as duplicações 7p21.2p22.3, 9p13.1p24.3 e 9q13q31.1 estão associadas, essencialmente, a atraso global do desenvolvimento, dismorfismos craniofaciais, defeitos cardíacos e malformações (Udayakumar *et al.*, 2015; Leone *et al.*, 2019).

Para averiguar a origem das alterações encontradas, foram realizados estudos citogenéticos nos progenitores (Figura 33).

A análise citogenética de metafases com bandagem G da mãe revelou um cariótipo, de constituição cromossómica feminina, com uma translocação aparentemente equilibrada envolvendo os cromossomas 7 e 9, com pontos de quebra em 7p21 e 9q31 (Figura 33A). Já a análise citogenética de metafases com bandagem G do pai revelou um cariótipo, de constituição cromossómica masculina, com 46 cromossomas, sem alterações cromossómicas detetadas: 46,XY.

A análise citogenética de metafases com bandagem G, obtidas a partir da cultura de células do líquido amniótico, revelou um cariótipo desequilibrado com 47 cromossomas, de constituição cromossómica masculina, com um derivativo do cromossoma 9 resultante de uma translocação envolvendo os cromossomas 7 e 9, com pontos de quebra em 7p21 e 9q31, de origem materna (Figura 33B).





**Figura 33** – Resultados do estudo citogenético do caso V. **(A)** Cariograma da mãe – é possível ver a presença de uma translocação aparentemente equilibrada envolvendo os cromossomas 7 e 9, com pontos de quebra em p21 e q31 (setas vermelhas); **(B)** Cariograma do feto – é possível ver a presença de três cromossomas 9: dois cromossomas 9 normais e um derivativo do cromossoma 9, resultante de uma translocação envolvendo os cromossomas 7 e 9, de origem materna (círculo vermelho).

O feto é portador de uma alteração desequilibrada caracterizada por uma trissomia parcial do braço curto do cromossoma 7 e uma trissomia do braço curto e da região proximal do braço longo do cromossoma 9, resultantes de uma segregação 3:1 da translocação recíproca, de origem materna.

Na literatura, está descrito um caso com uma alteração cromossômica semelhante à identificada neste feto. O fenótipo apresenta um amplo espectro fenotípico, nomeadamente atraso global do desenvolvimento, défice cognitivo, múltiplas anomalias e radiografia da idade óssea com valores abaixo do esperado (Penehaszadeh e Coco, 1975).

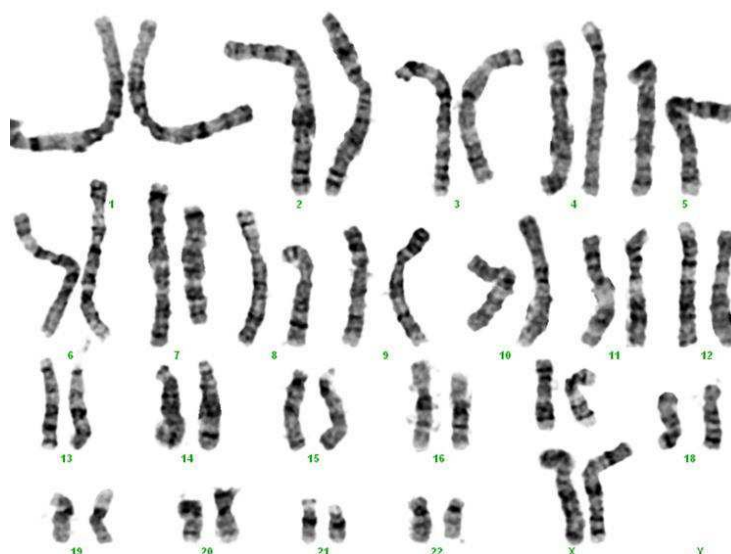
Para discussão do resultado e das suas implicações, o casal deve ser encaminhado para uma consulta de aconselhamento genético.



## 7.6. Caso clínico VI

Feto com ventriculomegália e agenesia do corpo caloso. Primeiramente, foi solicitado o estudo do cariótipo e aCGH-180K para esclarecimento do fenótipo apresentado.

A análise citogenética de metafases com bandagem G, obtidas a partir da cultura de células do líquido amniótico, revelou um cariótipo, de constituição cromossômica feminina, com 46 cromossomas, não tendo sido detetadas quaisquer alterações: 46,XX (Figura 34).



**Figura 34** – Cariograma representativo do caso VI. Pela análise citogenética, não foi possível encontrar nenhuma alteração cromossômica: 46,XX.

A análise por aCGH foi realizada utilizando um *array* de oligonucleótidos de 180K da *Agilent Technologies*<sup>®</sup> e foi feita com recurso ao software *CytoGenomics*, com um filtro de análise para DPN. O resultado revelou uma deleção no braço curto do cromossoma 1 (p31.3p32.1) com tamanho de, aproximadamente, 3.9Mb entre as posições nucleotídicas 59,649,753 e 63,622,471 (Figura 35).

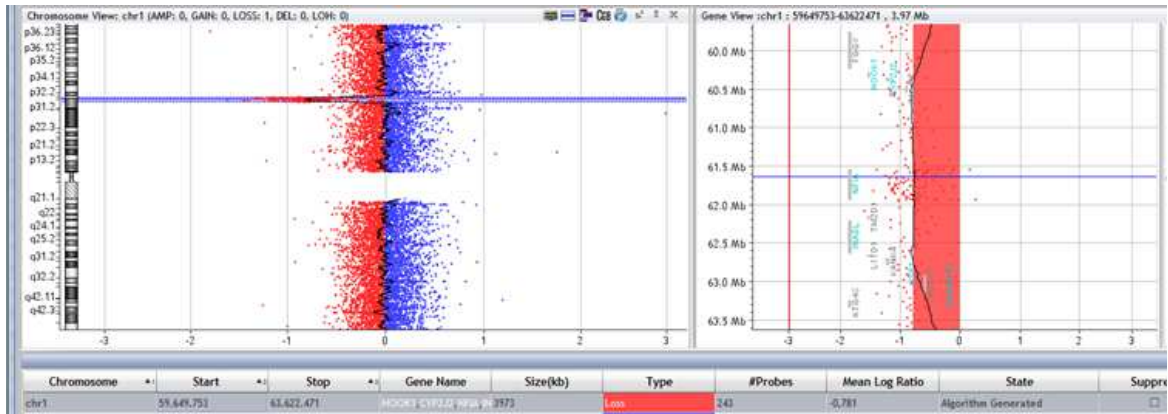


Figura 35 – Resultado obtido através do estudo de aCGH: arr[GRCh37] 1p31.3p32.1(59649753\_63622471)x1.

Esta alteração envolve dezenas de genes descritos na base de dados OMIM, sendo que dezasseis estão, ainda, reportados no OMIM *Morbid Map* (Figura 36). Os genes *DOCK7* e *ANGPTL3* (OMIM: 615730-*DOCK7*, 604774-*ANGPTL3*) estão associados, essencialmente, a défice intelectual, anomalias craniofaciais, dismorfismos e anomalias no sistema nervoso central (SNC).

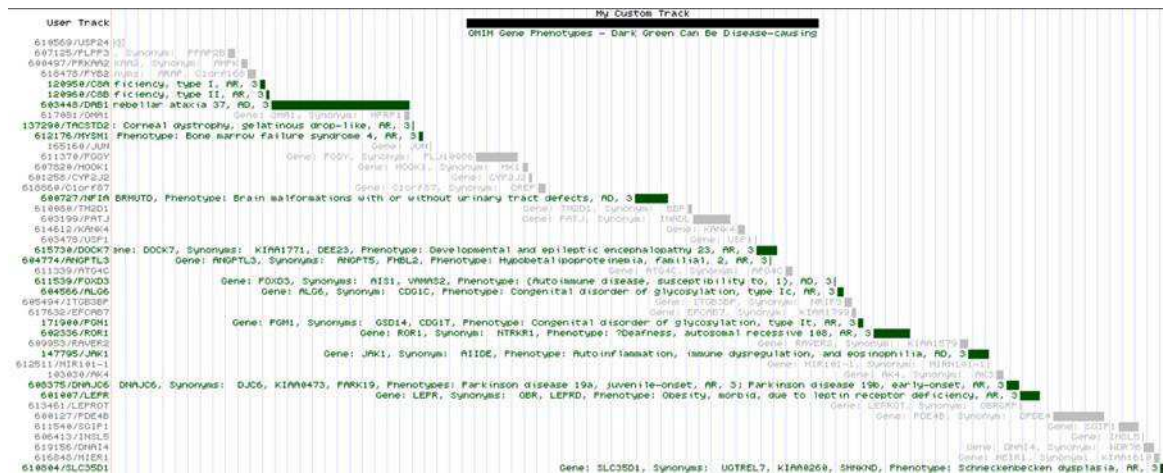
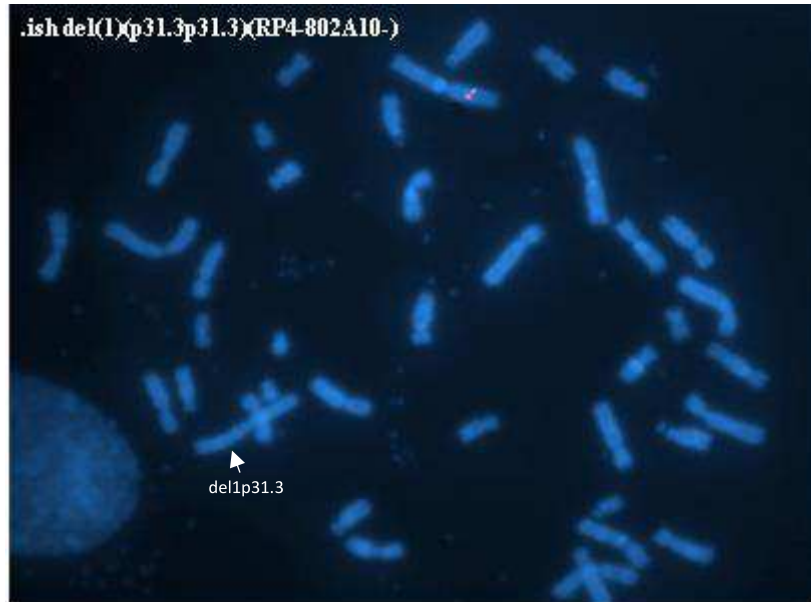


Figura 36 – Análise dos genes envolvidos na alteração encontrada recorrendo à base de dados UCSC Genome Browser.

Na base de dados *UCSC Genome Browser*, é possível ver que existem casos descritos na base de dados *Decipher*, com uma deleção semelhante à encontrada no feto, classificada como patogénica. Já na base de dados *ClinGen*, estão reportadas várias CNVs em deleção, semelhantes às do feto, classificadas como patogénicas e provavelmente patogénicas, e na DGV não existem deleções idênticas descritas.

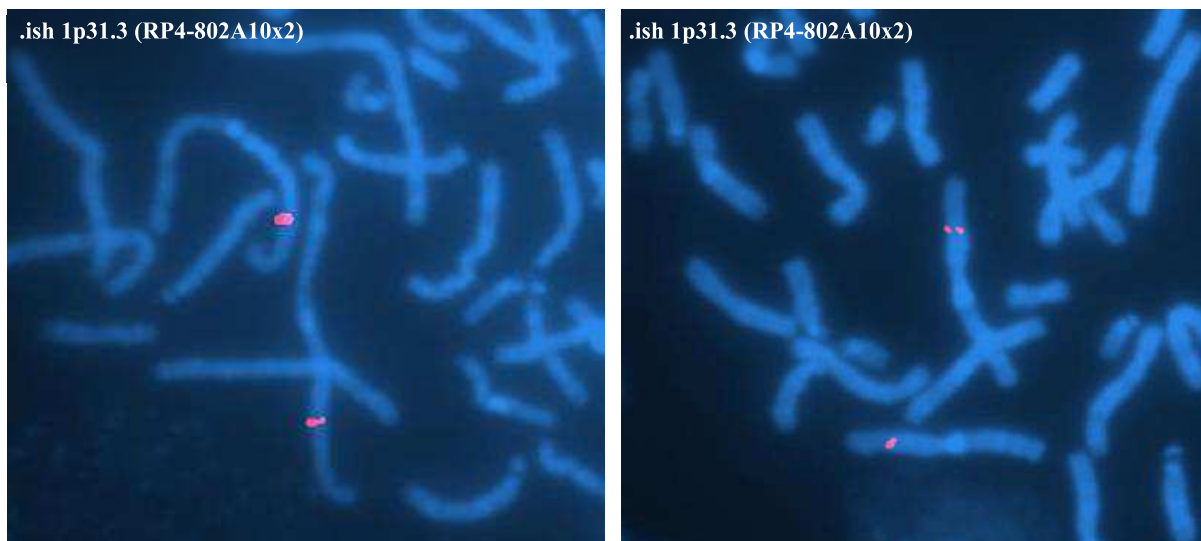
Para confirmar o resultado obtido pelo estudo de aCGH, foi solicitado o estudo por FISH para a região 1p31.3.

A técnica de FISH foi realizada utilizando uma sonda de BAC RP4-802A10, da *BlueGenome*, específica para a região 1p31.3, marcada de Orange, e confirmou a deleção intersticial no braço curto do cromossoma 1, na região 1p31.3 (Figura 37).



**Figura 37** – Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metafase pela técnica de FISH. Através da sonda de BAC RP4-802A10, específica para a região 1p31.3, foi possível confirmar que o feto tem uma deleção intersticial no braço curto do cromossoma 1 (p31.3) (seta branca).

Posteriormente, para determinar a origem da alteração, foi feito o estudo dos progenitores, pela técnica de FISH, e a análise revelou um resultado normal em ambos os progenitores, o que demonstra que a deleção encontrada no feto é *de novo* (Figura 38).



**Figura 38** – Observação ao microscópio de fluorescência de células em metafase dos progenitores, pela técnica de FISH, com a sonda RP4-802A10, específica para a região 1p31.3. A análise de FISH revelou um resultado normal em ambos os progenitores.

O feto é portador de uma deleção no braço curto do cromossoma 1 (p31.3p32.1)

*de novo*:

46,XX.ish del(1)(p31.3)( RP4-802A10-).arr[GRCh37] 1p31.3p32.1(59649753\_63622471)x1  
dn.

Esta alteração é sobreponível à síndrome de deleção 1p32p31 (OMIM: 613735), cujas características fenotípicas estão fortemente associadas à haploinsuficiência do gene *NF1A* (OMIM: 600727), que é responsável por anomalias no sistema nervoso central, nomeadamente hipoplasia do corpo caloso, ventriculomegália e atraso global do desenvolvimento, e ainda, anomalias do trato urinário e dismorfismos craniofaciais. Este espectro fenotípico está de acordo com o quadro clínico encontrado no feto (Tassano *et al.*, 2015; Labonne *et al.*, 2016; Rivera-Pedroza *et al.*, 2016).

O resultado e as suas implicações devem ser explicados ao casal numa consulta de aconselhamento genético.

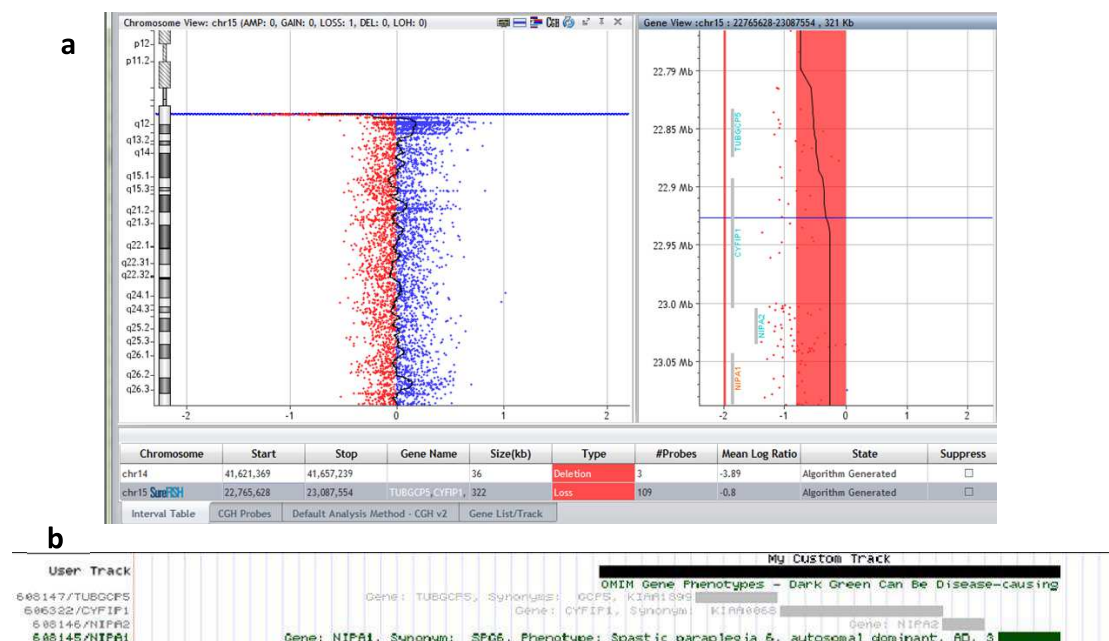
## 7.7. Caso clínico VII

Feto do sexo masculino com indicação clínica de ossos longos curtos e todas as extremidades superiores e inferiores com valores abaixo do normal para a idade gestacional (<P1), às 31 semanas e 2 dias. Foi solicitado o estudo por aCGH de 180K, para tentar entender a causa das alterações ecográficas encontradas, com uma nota de especial atenção para o gene *SHOX*.

O estudo por aCGH foi realizado utilizando um *array* de oligonucleótidos de 180K da *Agilent Technologies*<sup>®</sup> e a análise foi feita com recurso ao *software CytoGenomics*, com um filtro de análise para DPN.

Foi detetada uma deleção no braço longo do cromossoma 15 (na região 15q11.2), com tamanho de, pelo menos, 322kb e com ponto de quebra proximal no intrão 1 no gene *GCP5* e ponto de quebra distal no intrão 1 nos genes *IPAI* e *NIPAI* (Figura 39a).

Esta alteração envolve quatro genes descritos na base de dados OMIM (OMIM: 606322, 608145, 608146, 608147), sendo que o gene *NIPAI* (OMIM: 608145) está, ainda, reportado no OMIM *Morbid Map*, e está associado a uma doença de hereditariedade dominante – Paraplegia Espática Autossómica Dominante (OMIM: 600363) (Figura 39b).



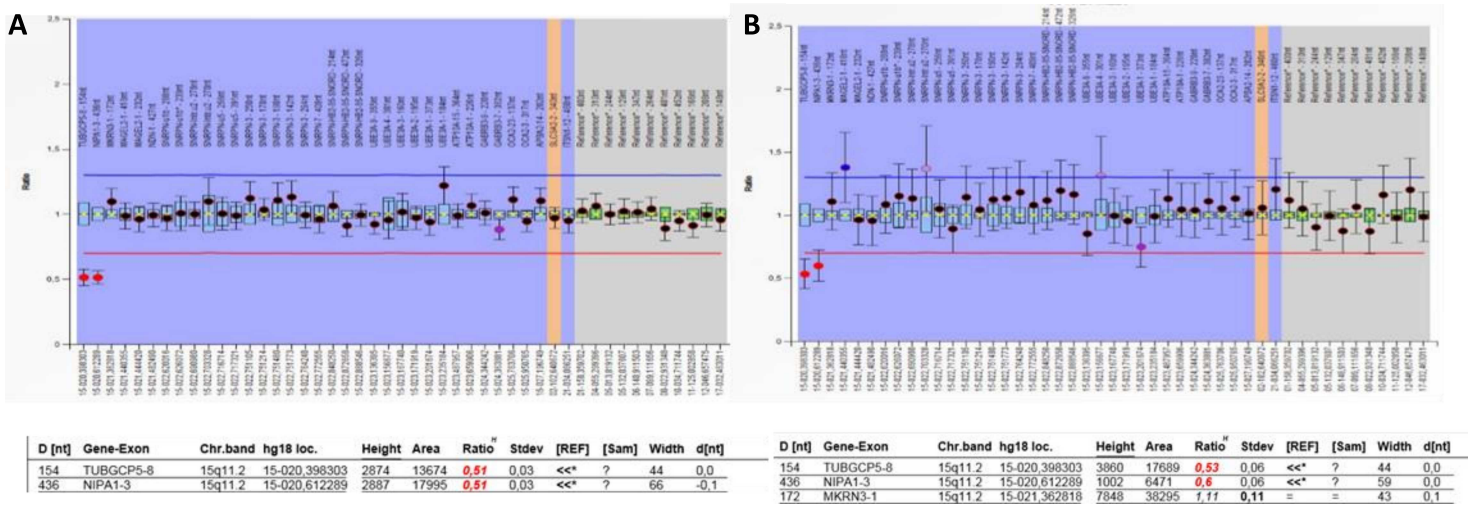
**Figura 39 – (a)** Resultado obtidos através do estudo de aCGH: arr[GRCh37] 15q11.2(22765628\_23087554)x1; **(b)** Análise dos genes envolvidos na alteração encontrada recorrendo à base de dados *UCSC Genome Browser*.



Através da base de dados *UCSC Genome Browser*, é possível verificar que existem muitos casos descritos na base de dados *Decipher*, com deleções semelhantes à encontrada no feto, classificadas como patogênicas e provavelmente patogênicas. Já na base de dados *ClinGen*, estão reportadas várias CNVs em deleção, semelhantes às do feto, classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas, significado clínico incerto, provavelmente benignas e benignas. Por fim, na DGV existem algumas deleções idênticas descritas.

Para determinar a origem da alteração e confirmar o resultado do aCGH, recorreu-se à técnica MS-MLPA (Figura 40).

O resultado do MS-MLPA do feto confirmou a deleção na região cromossômica 15q11.2 e o resultado da mãe revelou a deleção encontrada no feto, envolvendo os mesmos genes, pelo que se conclui que esta alteração foi herdada da mãe.



**Figura 40** – Resultados obtidos através da técnica de MS-MLPA, com recurso ao painel de sondas ME028-PWS/AS. (A) É possível observar que o feto é portador de uma deleção na região 15q11.2, confirmando o resultado obtido por aCGH. (B) É possível verificar que a mãe é portadora da mesma deleção 15q11.2 e envolve os mesmos genes.

Esta deleção compreende a região cromossômica 15q11.2, onde estão presentes os genes *NIPA1* (OMIM: 608145), *NIPA2* (OMIM: 608146), *CYFIP1* (OMIM:606322) e *TUBGCP5* (OMIM: 608147), considerados genes críticos que causam a Síndrome de microdeleção 15q11.2 BP1-BP2 (Burnside-Butler) (OMIM: 615656).

A Síndrome de microdeleção 15q11.2 BP1-BP2 (Burnside-Butler) é caracterizada por ter uma hereditariedade autossômica dominante, com

penetrância incompleta, e uma grande variabilidade fenotípica. Esta síndrome abrange uma região que varia entre 300 e 500kb localizada entre os pontos de quebra BP1 e BP2 proximal ao centrômero do cromossoma 15 e engloba apenas quatro genes (*NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIP1* e *TUBGCP5*). Estes genes não sofreram processo de *imprinting* na região crítica de Prader-Willi (PWS; OMIM: 176270)/Angelman (AS; OMIM: 105830), pelo que esta deleção não origina nenhuma destas síndromes (Cox e Butler, 2015; Butler, 2017; Farrell *et al.*, 2020).

Os genes *NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIP1* e *TUBGCP5*, quando deletados, originam problemas neuropsiquiátricos (esquizofrenia/psicose) ou de desenvolvimento neurológico, como atraso no desenvolvimento psicomotor, atraso na fala, transtorno do espectro autista (TEA), transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, transtorno obsessivo-compulsivo e convulsões. Outras anomalias relatadas associadas à Síndrome de microdeleção do cromossoma 15q11.2 incluem anomalias congénitas e defeitos cerebrais estruturais (Cox e Butler, 2015; Butler, 2017; Farrell *et al.*, 2020).

Na literatura, está descrito que, quando a deleção é herdada da mãe, existe um maior risco de o feto apresentar deficiência intelectual, epilepsia, transtorno do espectro autista e macrocefalia. Quando a deleção é herdada do pai, existe um risco maior de apresentar defeitos cardíacos congénitos (Butler, 2017).

A análise de aCGH detetou uma microdeleção na região 15q11.2, herdada da mãe, caracterizada pela síndrome de microdeleção 15q11.2 BP1 – BP2 (Burnside – Butler), tendo sido confirmada pela técnica de MS-MLPA. Contudo, não é possível prever o fenótipo do feto, devido à penetrância incompleta e expressividade variável. Serão necessários estudos neuropsiquiátricos e comportamentais para avaliar a variabilidade de expressão e o nível de penetrância desta microdeleção e tentar identificar possíveis patologias inerentes.

Estes resultados e as suas implicações devem ser discutidos numa consulta de aconselhamento genético e poderá ser oferecido diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

## 7.8. Caso clínico VIII

Feto com rastreio combinado de 1/216 para trissomia 21. Foi realizado o NIPT. A metodologia baseou-se na extração, purificação e análise do DNA fetal livre em circulação materna (cfDNA) a partir de uma amostra de sangue materno, de modo a determinar o risco do feto para trissomias dos cromossomas 13, 18 e 21.

A sequenciação foi feita através da plataforma *MiSeq*, da *Illumina*, e a amostra foi processada e analisada com recurso ao *Clarigo Reporter V2*.

Os resultados obtidos pelo teste não-invasivo estão representados na Figura 41. Na Figura 41a, é possível obter a informação sobre a fração fetal (*fetal fraction*), o risco para trissomia (13, 18 ou 21) (*trisomy evidence*), os valores calculados do *Z-Score* e o sexo fetal (*gender evidence/gender call*). De notar que não são obtidos resultados se a amostra for rejeitada por motivos de qualidade ou se a fração fetal (FF) estiver abaixo de 3%.

A *trisomy evidence* é um valor empírico que indica a presença de uma trissomia fetal para um cromossoma específico quando o valor é superior a +2,0.

O *Z-score* é uma medida estatística que, na ausência de trissomia, apresenta um valor médio 0 e desvio-padrão 1. Um valor mais elevado indica mais *trisomy evidence*.

A *trisomy call* corresponde ao resultado automático para a presença/ausência de uma trissomia fetal, com base na *trisomy evidence* e no *Z-score*. Para os cromossomas 18 e 21, a *trisomy call* é negativa se o *Z-score* for inferior a 3,5 e a *trisomy evidence* for inferior a -0,5. Contrariamente, é positiva se apresentar valores superiores a 3,5 e +2,0 no *Z-score* e na *trisomy evidence*, respetivamente. Já para o cromossoma 13, a *trisomy call* é negativa se o *Z-score* for inferior a 4 e a *trisomy evidence* for inferior a -0,5 e é positiva se apresentar valores superiores a 4 no *Z-score* e 2,0 na *trisomy evidence*.

No caso dos valores do *gender evidence*, se forem próximos de -1, significa que o feto é masculino e, se forem próximos de 1, trata-se de um feto feminino.

Interpretando os resultados da Figura 41a, esta amostra apresenta uma fração fetal de 7,7%. O feto é do sexo feminino, visto que o *gender evidence* é igual a  $0,99 \approx 1$ , e



apresenta um risco elevado para trissomia 13, tendo em conta os valores de *trisomy evidence* e *Z-score*.

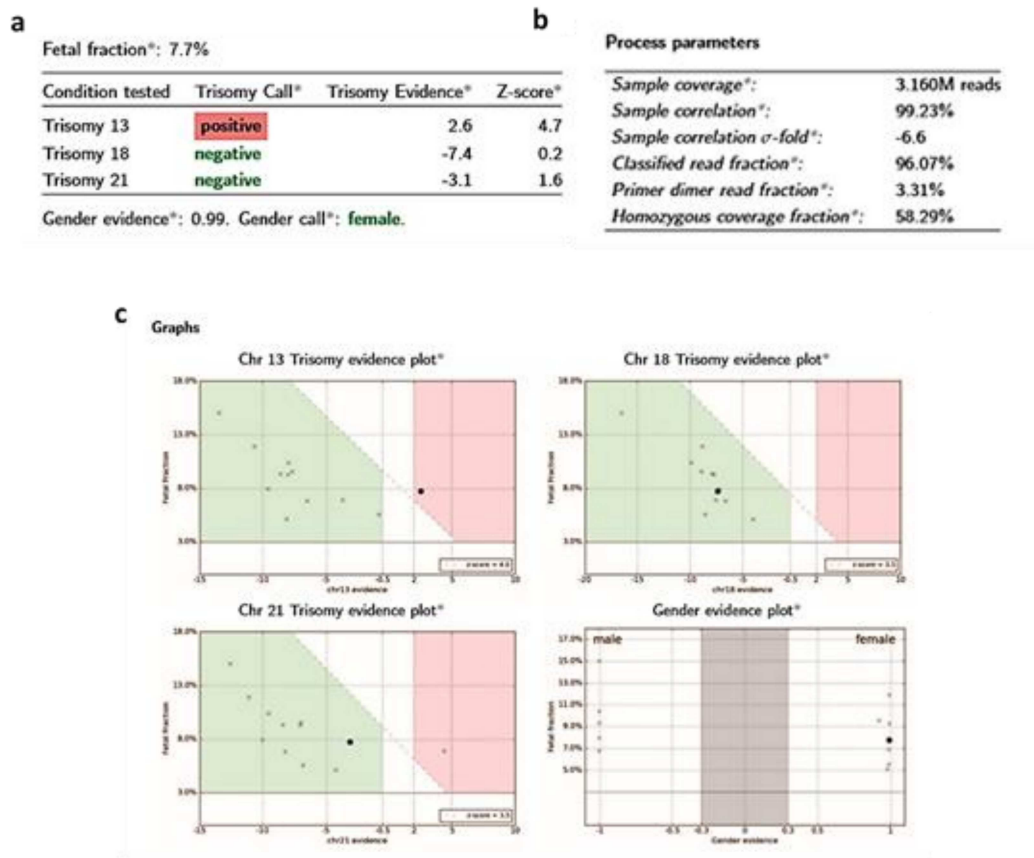
A figura 41b mostra os parâmetros do processo, cujo objetivo é verificar se a sequenciação foi bem-sucedida e se os resultados obtidos são confiáveis.

Deste modo, idealmente, a *sample coverage* deve apresentar valores entre 2 e 3 mil milhões de *reads* e a *sample correlation* deve constar acima de 99%. Caso estes valores não se verifiquem, os resultados poderão ser inconclusivos devido a uma má qualidade da biblioteca ou do próprio DNA inicial.

Outros parâmetros a ter em conta são a fração de dímeros de *primers* (que deve ser inferior a 5%) e a fração de homozigotia (que deve constar entre os 50 e 60%, numa situação normal).

Nesta amostra, os valores da *sample coverage* estão ligeiramente elevados, mas nada significativo. Já os outros parâmetros estão dentro dos valores esperados.

Por fim, a Figura 41c corresponde aos gráficos de evidência. Estes resumem a relação entre a fração fetal e a *trisomy evidence* para o *Z-score* obtido.



**Figura 41** – Resultados obtidos através da técnica de NIPT. **(a)** Resultado da amostra: FF de 7,7%, *Gender evidence* de 0,99 (indicativo de um feto do sexo feminino) e *Trisomy call* positiva para trissomia 13; **(b)** Parâmetros do processo: a *sample coverage* apresenta um valor ligeiramente superior, mas não é significativo. Os outros parâmetros estão dentro do esperado, o que indica que a reação foi bem-sucedida; **(c)** Gráficos de evidência: as zonas verdes indicam que se trata de uma situação normal e a zona vermelha indica que existe risco de trissomia.

Tendo em conta que o NIPT é um teste de rastreio, é fortemente recomendado que a grávida recorra a métodos invasivos para confirmar o resultado obtido e obter um diagnóstico do feto, através de técnicas de citogenética e/ou de biologia molecular.

## **Capítulo VII – Conclusão**

A realização do estágio curricular foi muito importante para adquirir e consolidar conhecimentos sobre Genética Clínica Laboratorial, em contexto de trabalho, e permitiu desenvolver competências teóricas e práticas de citogenética, genética molecular e genómica, no âmbito do diagnóstico pré e pós-natal.

As técnicas de citogenética e/ou moleculares revelaram ser de extrema relevância para o esclarecimento de diversos casos clínicos, nomeadamente no DPN, no âmbito das malformações ecográficas e sinais ecográficos de alerta.

Através do contacto com as diferentes áreas (citogenética, genética molecular e genómica), foi possível distinguir as várias fases do processo laboratorial (fase pré-analítica, analítica e pós-analítica) e analisar/interpretar diversos casos clínicos, com o objetivo de definir a melhor estratégia de estudo de acordo com a indicação clínica e as vantagens/limitações de cada metodologia, de modo a obter um diagnóstico correto.

Em suma, o estágio curricular no LCG-FMUC foi essencial para o desenvolvimento pessoal e profissional e cumpriu com todos os objetivos e expectativas iniciais.

## Capítulo VIII – Bibliografía

Acmgen.org. (2022). [online] Available at: <<http://acmgen.org/wp-content/uploads/2017/04/Cytogenetics-prenatal-diagnosis-best-practice-guidelines-ACC-2009.pdf>> [Accessed 7 May 2022].

ACOG TAC of O and G. Committee Opinon: Carrier Screening for Fragile X Syndrome. *Am Coll Obstet Gynecol* (2009); 116(469):1008–10.

Adinolfi, M.; Pertl, B.; Sherlock, J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenatal Diagnosis* (1997).

Ahn, JW.; Bint, S.; Bergbaum, A.; Mann, K.; Hall, RP.; Ogilvie, CM. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Molecular Cytogenetics* (2013); 6:16.

Ahn, JW.; Mann, K.; Walsh, S.; Shehab, M.; Hoang, S.; Docherty, Z.; Mohammed, S.; Ogilvie, CM. Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. *Molecular Cytogenetics* (2010); 3:9.

Allermesch, J.; Van Vooren, S.; Hannes, F.; De Moor, B.; Vermeesch, J.R.; Moreau, Y. An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. *BMC Bioinformatics* (2009); ISSN 1471-2105. 10:380.

Arnold, J. Ueber feinere Structur der Zellen unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* (1879); 181-206.

Badenas, C.; Revenga, LR.; Morales, C.; Mediano, C.; Plaja, A.; Pérez-Iribarne, M.; Soler, A.; Clusellas, N.; Borrel, A.; Sanchez, M.; Miró, E.; Sanchez, A.; Milà, M.; Jiménez, W. Assessment of QF-PCR as the First Approach in Prenatal Diagnosis. *Journal of Molecular Diagnostics* (2010); 12:6.

Benn, P.A.; Hsu, L.Y.F. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis (2004); 214-296.

Bi, W.; Breman, AM.; Venable, SF.; Eng, PA.; Sahoo, T.; Lu, X.; Patel, A.; Beaudet, AL.; Cheung, SW.; White, LD. Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array CGH. *Prenatal Diagnosis* (2008); 28: 943-949.

Biancalana, V.; Glaeser, D.; McQuaid, S.; Steinbach, P. 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* (2015); 417-425.

Bianchi, DW.; Parker, RL.; Wentworth, J.; Madankumar, R.; Saffer, C.; Das, AF.; Craig, JÁ.; Chudova, DI.; Devers, PL.; Jones, KW.; Oliver, K.; Rava, RP.; Sehnert, AJ. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* (2014); 370(9):799–808.

Binns, V.; Hsu, N. Prenatal Diagnosis. *Encyclopedia of life sciences* (2002); 1-17.

Bishop, R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance *Bioscience Horizons* (2010); 85-95.

Boyle, T.; Griffin, D. The cytogenetics of pregnancy. In: Rooney, D. E. (ed.) *Human Cytogenetics: constitutional analysis* (2001); 55-98.

Brady, P.D.; Vermeesch, J.R. Genomic microarrays: a technology overview. *Prenatal Diagnosis* (2012); ISSN 0197-3851. 32:4 336-343.

Breviglieri, G.; D'Aversa, E.; Finotti, A.; Borgatti, M. Non-invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA. *Molecular Diagnosis & Therapy* (2019); 291-299.

Butler, M. Clinical and genetic aspects of the 15q11.2 BP1-BP2 microdeletion disorder. *Journal of Intellectual Disability Research* (2017); 568-579.

Cai, G.; Edelman, L.; Goldsmith, J.E.; Cohen, N.; Nakamine, A.; Reichert, J.G.; Hoffman, E.; Zurawiecki, D.M.; Silverman, J.M.; Hollander, E.; Soorya, L.; Anagnostou, E.; Betancur, C.; Buxbaum, J.D. Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: Efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT. *BMC Medical Genomics* (2008).

Callaway, JLA.; Huang, S.; Karampetsou, E.; Crolla, JA. Perspective on the technical challenges involved in the Implementation of Array-CGH in Prenatal Diagnostic Testing. *Molecular Biotechnology* (2013); 56: 312-318.

Carlson, L.M.; Vora, N. L. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet Gynecol Clin North Am* (2017); 44, 245-256.

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

Caspersson, T.; Farber, S.; Foley, G.E.; Kudynowski, J.; Modest, E.J.; Simonsson, E.; Wagh, U.; Zech, L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research* (1968); 219-222.

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

Cirigliano, V. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of nine years of clinical experience. *Prenat Diagn* (2009); 29: 40-49.

Clancy, S. Copy Number Variation. *Nature Education* (2008).

Clark, W.; Christopher, K. An Introduction to DNA: Spectrophotometry, Degradation, and the 'Frankengel' Experiment: S. J. Karcher Editor (2001).

Clouston, H.J. Lymphocyte culture. In Rooney, D.E. *Human Cytogenetics: constitutional analysis*. New York: Oxford University Press (2001).

Colaiani, V.; Mazzei, R.; Cavallaro, S. Copy number variations and stroke. *Neurological Sciences* (2016); 1895-1904.

Collins, SL.; Impey, L. Prenatal diagnosis: Types and techniques. *Early Human Development* 88 (2012); 3-8.

Cox, D.; Butler, M. The 15q11.2 BP1–BP2 Microdeletion Syndrome: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* (2015); 4068-4082.

Curnow, K.; Sanderson, R.; Beruti, S. Noninvasive Detection of Fetal Aneuploidy Using Next Generation Sequencing. *Prenatal Diagnosis* (2018); 325-345.

Das, K.; Tan, P. Molecular cytogenetics: recent developments and applications in cancer. *Clinical genetics* (2013); 315-325.

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

Devyser (2022). [online] Available at: <<https://www.devysers.com/knowledge-hub/x-chromosome-counting-markers>> [Accessed 7 December 2021].

Diário da República, 2ª série – Nº - Portaria 5411/97, de 6 de Agosto de 2007.

Edwards, J.H.; Harnden, D.G.; Cameron, A.H.; Crosse, V.M.; Wolff, O.H. A new trisomic syndrome. *Lancet* (1960).

Farrell, M.; Lichtenstein, M.; Harner, M.; Crowley, J.; Filmyer, D.; Lázaro-Muñoz, G.; Dietterich, T.; Bruno, L.; Shaughnessy, R.; Biondi, T.; Burkholder, S.; Donmoyer, J.; Berg, J.; Szatkiewicz, J.; Sullivan, P.; Josiassen, R. Treatment-resistant psychotic symptoms and the 15q11.2 BP1–BP2 (Burnside-Butler) deletion syndrome: case report and review of the literature. *Translational Psychiatry* (2020); 10(1).

Flemming, W. Zellsubstanz, kern und zelltheilung. Leipzig, F.C.W. Vogel (1882).

Gall, J.G.; Pardue, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations (1969);378-83.

Gardner, R.J.; Sutherland, GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York: Oxford University Press, 3ª edição (2004); ISBN 0-19-514960-2.

Gardner, R.J.M.; Amor, D.J. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling 5ª edição. Oxford University Press (2018).

Genome.gov. (2022). *Hibridación fluorescente in situ (FISH) | NHGRI*. [online] Available at: <<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Hibridacion-fluorescente-in-situ>> [Accessed 24 May 2022].

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

Griffin, D. The cytogenetics of pregnancy. *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis: a Practical Approach* (2001); 1-55.

Hassold, T.; Abruazzo, M.; Adkins, K.; Griffin, D.; Merrill, M.; Millie, E.; Saker, D.; Shen, J.; Zaragoza, M. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environmental and molecular mutagenesis* (1996); 167-175.

Hassold, T.; Hunt, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* (2001); 2-280.

Hastings, R. J.; Cavani, S.; Bricarelli, F.D.; Patsalis, P.C.; Kristoffersson, U. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: a common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations. *European Journal of Human Genetics* (2007); 15-525.

Hastings, R.; Howell, R.; Bricarelli, FD. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. *European Cytogeneticists Association* (2012); 11-19.

Hayes, EW.; Matalon, R. Fragile X Syndrome. *Pediatrics*. (2009).

Hillman, SC.; McMullan, DJ.; Williams, D.; Maher, ER.; Kilby, MD. Microarray comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: a review. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* (2012); 40: 385-391.

Hsu, T.C. Mammalian Chromosomes in vitro. The Karyotype of Man. *Journal of Heredity* (1952); 167-172.

Hultén, MA.; Dhanjal, S.; Pertl, B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* (2003); 126:279-297.



Hunter, J.; Rivero-Arias, O.; Angelov, A.; Kim, E.; Fotheringham, I.; Leal, J. Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis (2014); 164(7):1648–58.

Jacobs, P.A.; Strong, J.A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism (1959).

Jensen, E. Technical review: In situ hybridization. *The Anatomical Record* (2014); 1349-1353.

Kaiser-Rogers, K. Constitutional chromosome abnormalities. In: Arsham, M.S.; Barch, M.J. & Lawce, H.J. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, 4ª edição (2017); 429-480.

Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O.P.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J.W.; Waldman, F.; Pinkel, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* (1992); 818-821.

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

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

Khandekar, S.; Dive, A.; Munde, P. Chromosomal abnormalities -A review. *Central India Journal of Dental Sciences* (2012); 35-40.

Kim, K. *Advantages of the single nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test* (2022).

Labonne, J.; Shen, Y.; Kong, I.; Diamond, M.; Layman, L.; Kim, H. Comparative deletion mapping at 1p31.3-p32.2 implies NFIA responsible for intellectual disability coupled with macrocephaly and the presence of several other genes for syndromic intellectual disability. *Molecular Cytogenetics* (2016).

Lawce, H.; Brown, M. Cytogenetics: an overview, in *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, 3ª edição, Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia (1997).

Lawce, H.J.; Brown, M.G. Cytogenetics: an overview. In: Arsham, M.S.; Barch, M.J. & Lawce, H. J. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (2017); 25-85.

Lee, C.; Iafrate, A.J.; Brothman, A.R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nature Genetics* (2007); ISSN 1061-4036 39:7 48-54.

Lee, J.; Park, Y.; Choi, J.; Lee, E.; Kim, H. Comparisons of Three Automated Systems for Genomic DNA Extraction in a Clinical Diagnostic Laboratory. *Yonsei Medical Journal* (2010).

Lejeune, J.; Gautier, M.; Lafourcade, J.; Berger, R.; Turpin, R. Trois cas de délétion partielle du bras court d'un chromosome 5 (1964); 7-12.

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

Leone, P.; Pérez-Villa, A.; Yumiceba, V.; Hernández, M.; García-Cárdenas, J.; Armendáriz-Castillo, I.; Guerrero, S.; Guevara-Ramírez, P.; López-Cortés, A.; Zambrano, A.; García, J.; Hernández, J.; Paz-y-Miño, C. De Novo Duplication of Chromosome 9p in a Female Infant: Phenotype and Genotype Correlation. *Journal of Pediatric Genetics* (2019); 069-075.

Lippi, G.; Mattiuzzi, C.; Favaloro, EJ. Pre-analytical variability and quality of diagnostic testing. Looking at the moon and gazing beyond the finger. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science* (2015); 4-8.

Lo, YM.; Corbetta, N.; Chamberlain, PF.; Rai, V.; Sargent, IL.; Redman, CW. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* (1997); 350(9076):485-7.

M. Carpi, F.; Di Pietro, F.; Vincenzetti, S.; Mignini, F.; Napolioni, V. Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* (2011); 1-7.

Machado, IN.; Heinrich-Muçouçah, JKR.; Barini, R. Prenatal genetic testing: where we are at, where we are heading to. *Femina* (2012); 46: 87-96.

Maddalena, A.; Richards, CS.; McGinniss, MJ. Technical Standards and Guidelines for Fragile X: The First of a Series of Disease-Specific Supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. *Genetics in Medicine* (2001); 3:3:200-205.

Malone, FD.; Canick, JA.; Ball, RH.; Nyberg, DA.; Comstock, CH.; Bukowski, R.; Berkowitz, RL.; Gross, SJ.; Dugoff, L.; Craigo, SD.; Timor-Tritsch, IE.; Carr, SR.; Wolfe, HM.; Dukes, K.; Bianchi, DW.; Rudnicka, AR.; Hackshaw, AK.; Lambert-Messerlian, G.; Wald, NJ.; D'Alton, ME. First, Second-Trimester Evaluation of Risk Research C. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome (2005); 353(19):2001–2011.

Matoso, E. Desequilíbrios genômicos nas patologias do desenvolvimento e do comportamento (2014). Tese de doutoramento. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10316/26669>>

McCary, LM.; Roberts, JE. Early identification of autism in fragile X syndrome: a review (2013); 57(9):803–14.

McGowan-Jordan, J.; Simons, A.; Schmid, M. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016).

Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - General Protocol, MRC-Holland (2020).

Milunsky, A. Genetic Disorders and Fetus Diagnosis, Prevention and Treatment. 4<sup>a</sup> edição (1998).

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

Mrcholland.com. (2022). *MLPA Technique - MRC Holland*. [online] Available at: <<https://www.mrcholland.com/technology/mlpa/technique>> [Accessed 9 December 2021].

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - General Protocol, MRC-Holland (2019).

Nascimento, A.; Abreu, T.; Liberato, É.; Santos, T.; Marsiglio, H.; Melo, D. Chromosomal abnormalities identified in a medical genetics service in the interior of São Paulo State, Brazil. *Revista Saúde e Desenvolvimento Humano* (2021).

Novelli, A.; Grati, F.R.; Ballarati, L.; Bernardini, L.; Bizzoco, D.; Camurri, L.; Casalone, R.; Cardarelli, L.; Cavalli, P.; Ciccone, R.; Clementi, M.; Dalpra, L.; Gentile, M.; Gelli, G.; Grammatico, P.; Malacarne, M.; Nardone, A.M.; Pecile, V.; Simoni, G.; Zuffardi, O.; Giardino, D. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU) (2011); ISSN 0960-7692. 39:1 (2012) 384-388.

Nussbaum, R.L.; McInnes, R.R.; Willard, H.F. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 6ª edição (2004).

Pandey, U.B.; Phadke, S.R.; Mittal, B. Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation. (2004); 52:1:36-42.

Park, S.J.; Jung, E.H.; Ryu, R.S.; Kang, H.W.; Ko, J.M.; Kim, H.J.; Cheon, C.K.; Hwang, S.H.; Kang, H.Y. - Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Molecular Cytogenetics* ISSN 1755-8166. 4:12 (2010) 1-10.

Patau, K.; Smith, D.W.; Therman, E.; Inhorn, S.L.; Wagner, H.P. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome (1960).

Penehaszadeh, V.; Coco, R. Partial 9 trisomy by 3:1 segregation of balanced maternal translocation (7q+; 9q-). *Journal of Medical Genetics* (1975); 301-305.

Pennings, J.L.A.; Koster, M.P.H.; Rodenburg, W.; Schielen, P.C.J.I. Discovery of novel serum biomarkers for prenatal Down syndrome screening by integrative data mining. *PloS One* (2009).

Pierce, B. *Genetics Essentials: Concepts and Connections*, W. H. Freeman (2009).

Pierce, B. *Genetics: A Conceptual Approach*, Worth Publishers, Incorporated (2002).

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

Riegel, M. Unbalanced 18q/21q translocation in a patient previously reported as monosomy 21 (2005).

Rivera-Pedroza, C.; Barraza-García, J.; Paumard-Hernández, B.; Nevado, J.; Orbea-Gallardo, C.; Sánchez del Pozo, J.; Heath, K. Chromosome 1p31.1p31.3 Deletion in a Patient with Craniosynostosis, Central Nervous System and Renal Malformation: Case Report and Review of the Literature. *Molecular Syndromology* (2016); 30-35.

Rooney, D. Human cytogenetics constitutional analysis. 3ª edição (2001).

Schouten, JP.; McElgunn, CJ.; Waaijer, R. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* (2002); 30-57.

Schrijver, I.; Cherny, S.C.; Zehnder, J.L. Testing for maternal cell contamination in prenatal samples. *J. Mol. Diagnosis* (2007); 9(3): 394-400.

Scott, F.; Murphy, K.; Carey, L.; Greville, W.; Mansfield, N.; Barahona, P.; Robertson, R.; McLennan, A. Prenatal diagnosis using combined quantitative fluorescent polymerase chain reaction and array comparative genomic hybridization analysis as a first-line test: results from over 1000 consecutive cases. *Ultrasound Obstet Gynecol* (2013); ISSN 0960-7692. 41:5 500-507.

Seneca, S.; Lissens, W.; Endels, K.; Caljon, B.; Bonduelle, M.; Keymolen, K.; Randemaeker, M.; Ullman, U.; Haentjens, P.; Berkel, K. V.; Dooren, S. V. Reliable and sensitive detection of Fragile X (expanded) alleles in clinical prenatal DNA samples with a fast turnaround time. *The Journal of Molecular Diagnostics* (2012); 560-568.

Shaffer, L.G.; Dabell, M.P.; Fisher, A.J.; Coppinger, J.; Bandholz, A.M.; Ellison, J.W.; Ravnan, J.B.; Torchia, B.S.; Ballif, B.C.; Rosenfeld, J.A. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenatal Diagnosis* (2012); ISSN 0197-3851. 32:10 976-985.

Shaffer, LG.; Bui, T. Molecular Cytogenetic and Rapid Aneuploidy Detection Methods in Prenatal Diagnosis. *American Journal of Medical Genetics* (2007); 98: 87-98.

Sherman, S.; Pletcher, BA.; Driscoll, DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genet Med. Various* (2005); 7(8):584-7.

Silva, M.; Leeuw, N. Mann, K. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *European Journal of Human Genetics* (2019); 27: 1-16.

Sismani, C.; Armour, J.A.; Flint, J.; Girgalli, C.; Regan, R.; Patsalis, P.C. Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay (2001); 527-32.

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

Slovak, ML.; Theisen, A.; Shaffer, LG. Human Chromosome Nomenclatura: An Overview and Definition of Terms. *In: Gersen, SL.; Keagle, MB. The Principles of Clinical Cytogenetics, 3ª edição* (2013); 23-49.

Smeets, D. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical Biochemistry* (2004); 37: 439- 446.

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

Stemcell.com. (2022). *Cryopreservation Basics: Protocols and Best Practices for Freezing Cells*. [online] Available at: <<https://www.stemcell.com/cryopreservation-basics-protocols-and-best-practices-for-freezing-cells>> [Accessed 20 May 2022].

Tabolacci, E.; Moscato, U.; Zalfa, F. Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations. *European Journal of Human Genetics* (2008); 16:12:1487-1498.

Tan, S.; Yiap, B. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2009); 1-10.

Tassano, E.; Gamucci, A.; Celle, M.; Ronchetto, P.; Cuoco, C.; Gimelli, G. Clinical and Molecular Cytogenetic Characterization of a de novo Interstitial 1p31.1p31.3 Deletion in a Boy with Moderate Intellectual Disability and Severe Language Impairment. *Cytogenetic and Genome Research* (2015); 39-43.

Tezcan, B.; Bredaki, F. Prenatal Diagnosis of Rare Familial Unbalanced Translocation of Chromosomes 7 and 12. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology* (2015); 1-4.

Thompson, MT.; Thompson, JS. Genetics in Medicine, 8<sup>a</sup> edição. Elsevier (2015).

Tjio, J.H.; Levan, A. The chromosome number of man. *Hereditas* (1956); 1-6.

Trask, B. Human Cytogenetics: 46 Chromosomes, 46 Years and Counting. *Nature Reviews Genetics* (2002); 3: 769-778.

Udayakumar, A.; Al-Mamari, W.; Al-Sayegh, A.; Al-Kindy, A. De Novo Duplication of 7p21.1p22.2 in a Child with Autism Spectrum Disorder and Craniofacial Dysmorphism. *Sultan Qaboos University Medical Journal* (2015); 415-419.

Valayatham, V.; Subramaniam, R.; Juan, YM.; Chia, P. Indications for invasive prenatal diagnostic procedures at a dedicated fetal medicine centre: an 8 year audit 2003-2010. *The Medical Journal of Malaysia* (2013); 68: 297-300.

Van Veghel-Plandsoen, M.M.; Wouters, C.H.; Kromosoeto, J. N.; Den Ridder-Klunnen, M.C.; Halley, D.J.; Van Den Ouweland, A.M. Multiplex ligation-dependent probe amplification is not suitable for detection of lowgrade mosaicism (2011).

Vermeesch, J.; Melotte, C.; Froyen, G.; Van Vooren, S.; Dutta, B.; Maas, N.; Vermeulen, S.; Menten, B.; Speleman, F.; Moor, B.; Van Hummelen, P.; Marynen, P.; Fryns, J.; Devriendt, K. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (2012); 53: 413-422.

Volpi, E.V.; Bridger, J.M. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques* (2008); 45, 385-409.

- Wang, C. Autosomal Aneuploidy. In: Gersen, S. & Keagle, M. The Principles of Clinical Cytogenetics. 3ª edição (2013); 113-138.
- Wang, N. Methodologies in Cancer Cytogenetics and Molecular Cytogenetics. American Journal of Human Genetics (2002); ISSN 0002-9297. 115: 118–124 118124.
- Wang, T.; Bray, SM.; Warren, ST. New perspectives on the biology of fragile X syndrome. Curr Opin Genet Dev (2012); 22(3):256–63.
- Wanner, G.; Formanek, H. A new chromosome model (2000).
- Wattendorf, DJ.; Muenke, M. Diagnosis and Management of Fragile X Syndrome. American Family Physician (2005); 72:1:111-113.
- Whaley, D.; Damyar, K.; Witek, R.; Mendoza, A.; Alexander, M.; Lakey, J. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation* (2021).
- Wieacker, P.; Steinhard, J. The Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases. Deutsches Ärzteblatt International (2010); 857-862.
- Willis, AS.; Van den Veyver I.; Eng, CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. Prenatal Diagnosis (2012); 32: 315320.
- Wolf, J.M.; Wolf, L.M. Fases Pré-Analítica, Analítica e Pós-analítica no monitoramento laboratorial da anticoagulação com antagonistas da vitamina K. Clinical & Biomedical Research (2017); 125–131.
- Wu, Y.; Ji, T.; Wang, J.; Xiao, J.; Wang, H.; Li, J.; Gao, Z.; Yang, Y.; Cai, B.; Wang, L. Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. BMC medical genetics (2010).
- Zuffardi, O.; Vetro, A.; Brady, P.; Vermeesch, J. Array technology in prenatal diagnosis. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine (2011); 16: 94-98.



## Anexos

### REQUISITOS DE COLHEITA E ENVIO DE AMOSTRAS

Anexo 1:

AMOSTRA	QUANTIDADE	RECIPIENTE
<b>Citogenética convencional e Citogenética molecular</b>		
Líquido amniótico (LA)	16-20 mL para gestações entre 16 e 20 semanas (1ml/semana de gestação)	2 frascos de cultura esterilizados de 25 cm <sup>3</sup> (ou tubos esterilizados de 16 a 20ml)
Vilosidades Coriônicas (CV8)	-----	Tubos estéreis com meio de cultura fornecidos pelo laboratório <sup>1</sup>
Sangue fetal do cordão <sup>2</sup>	2 mL	Tubo esterilizado com heparina de sódio (ou litio)
Sangue (adultos)	6-10 mL	Tubo esterilizado com heparina de sódio (ou litio)
Sangue (recém-nascidos)	2 mL	Tubo esterilizado com heparina de sódio (ou litio)
Sangue (orifícios)	4-5 mL	Tubo esterilizado com heparina de sódio (ou litio)
Imortalização de Linfócitos	8-12 mL	Tubo esterilizado com heparina de sódio (ou litio)
Amostra de placenta; Amostra de pele fetal; Biópsia de pele	-----	Tubo esterilizado com meio de transporte fornecido pelo laboratório <sup>3</sup>
Lâminas <sup>4</sup> para estudo citogenético prénatal (DPN) e pónatal	3 lâminas por cultura (Pré-natal- suficiente para analisar 20 metafases de 2 culturas independentes <sup>5</sup> ; pós-natal- suficiente para analisar 20 metafases <sup>5</sup> )	
Suspensão de células fixadas <sup>4</sup>	1 tubo por cultura (Pré-natal- suficiente para analisar 20 metafases de 2 culturas independentes <sup>5</sup> ; pós-natal- suficiente para analisar 20 metafases <sup>5</sup> )	

<sup>1</sup> Devem ser requeridos com antecedência e ter sempre em atenção o prazo de validade indicado. As CV8 devem chegar ao Laboratório até às 14.00 do dia da colheita e devem ser acompanhadas de sangue materno (6-8mL em EDTA) para eventual exclusão de contaminação materna. <sup>2</sup> Antes do envio da amostra é imprescindível a realização dos testes necessários para garantir que o sangue é fetal e não materno. <sup>3</sup> Devem ser requeridos com antecedência e ter sempre em atenção o prazo de validade indicado. No caso de não ser possível usar o meio de transporte adequado, nem haver tempo suficiente para o solicitar ao laboratório, poderá excepcionalmente ser usado soro fisiológico esterilizado. <sup>4</sup> O resultado do estudo citogenético está dependente da qualidade do material fornecido. <sup>5</sup> Poderá ser necessário pedir material adicional para exclusão de mosaicismo ou estudos adicionais.

### Biologia Molecular

Sangue (recém-nascido)	2-3 mL	Tubo esterilizado com EDTA
Sangue (criança/adulto)	5-6 mL	Tubo esterilizado com EDTA
DNA para array-CGH	Volume e concentração mínimos - 100 µL [40 ng/µL] <sup>6</sup>	Tubos "safe lock"
DNA para Diagnóstico Molecular (DM) incluindo MLPA	Volume e concentração mínimos - 50 µL [40 ng/µL]	Tubos "safe lock"
DNA para DM prénatal (DNA fetal+DNA materno) <sup>7</sup>	Volume e concentração mínimos - 50 µL [40 ng/µL]	Tubos "safe lock"

<sup>6</sup> Indicar sempre método de extração do DNA. <sup>7</sup> Deve ser enviado DNA materno juntamente com o DNA fetal para que seja possível a exclusão de contaminação materna.

#### Notas:

I. As amostras devem estar sempre devidamente identificadas com o nome do paciente (e o da mãe no caso de um recém-nascido) e data de nascimento. II. Todas as amostras devem ser acompanhadas por uma requisição fornecida pelo laboratório ou equivalente devidamente preenchida contendo descrição clínica detalhada justificativa dos motivos para essa análise. III. Por favor notificar o laboratório por telefone antes do envio de amostras urgentes ou amostras enviadas fora das horas ou dias habituais de recepção. IV. As amostras de LA, CVS e biópsias de pele devem ser enviadas imediatamente após a colheita, salvo acordo prévio com o laboratório. V. As amostras de biópsia de pele só podem ser recebidas no laboratório de 2ª a 5ª feira; excepcionalmente e após acordo com o laboratório poderão ser enviadas 6ª feira até às 12.00h. VI. Amostras para imortalização devem ser recebidas no laboratório de preferência até 3h após a colheita e no máximo até 24h depois (Segunda e Terça-feira, salvo acordo prévio com o laboratório). VII. As amostras de sangue que não possam ser enviadas imediatamente devem ser armazenadas, durante a noite, num frigorífico a 4°C (não congelar). VIII. Todas as amostras devem ser enviadas à temperatura ambiente.

<b>Nº da amostra:</b> X	<b>Entidade requisitante:</b> Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
<b>Tipo de amostra:</b> Líquido Amniótico	<b>Serviço/consulta:</b> DPN
<b>Data de colheita:</b> 20/1/2022	<b>Médico requisitante:</b> X
<b>Nome:</b> X	<b>Data de requisição:</b> 20/01/2022
<b>Data de nascimento:</b> 12/09/1983	<b>Data de entrada:</b> 20/01/2022
<b>Sexo:</b> Feminino	<b>Data de saída:</b> 10/02/2022
<b>Morada:</b> X	

**Análise solicitada:** Estudo do cariótipo e despiste das aneuploidias mais comuns (QF-PCR).

**Indicação clínica:** Progenitores com rearranjos cromossómicos (46,XX,inv(22)(p13q11.21); 45,XY,der(13;14)(q10;q10)).

**Resultado (ISCN-2020):** 45,XY,der(13;14)(q10q10) pat

**Interpretação:** A análise citogenética de metafases com bandagem GTL obtidas a partir da cultura de células do líquido amniótico revelou um cariótipo com uma constituição cromossómica masculina com uma translocação robertsoniana envolvendo os cromossomas 13 e 14, de origem paterna. Tendo em conta que o cromossoma 14 está associado a *imprinting* genómico, deverá ser oferecido o estudo de dissomia uniparental<sup>1</sup>.

Para despiste da inversão pericêntrica do cromossoma 22, foi feita bandagem CBG e AgNOR, não tendo sido encontradas quaisquer alterações.

**Conclusão:** O feto é portador de uma translocação robertsoniana envolvendo os cromossomas 13 e 14, de origem paterna. Visto que envolve o cromossoma 14 e este está associado a regiões de *imprinting* genómico, é relevante fazer o estudo de dissomia uniparental<sup>1</sup>.

Este resultado está de acordo com o despiste das aneuploidias mais comuns, através da técnica de QF-PCR, reportado no dia 21/01/2022, em que não foram encontradas alterações: rsa(X,Y)x1,(13,18,21)x2.

Análise efetuada por:

Análise conferida por:

A Coordenadora:

<sup>1</sup>Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics: Prenatal Diagnosis Best Practice Guidelines (2009).

**Nota:**

- A citogenética convencional não permite excluir rearranjos submicroscópicos, pequenas anomalias estruturais, mosaicismo de baixa expressão, assim como alterações a nível génico.
- A técnica QF-PCR poderá não detetar aneuploidias parciais ou mosaicos.
- Este laboratório possui um Sistema de Gestão de Qualidade certificado pela NP EN ISSO 9001:2008, com o Certificado Número 2016/CEP.5027
- O LCG-FMUC participa num programa de Avaliação Externa da Qualidade em diagnóstico pré e pós-natal, nomeadamente nas suas vertentes de citogenética convencional, diagnóstico molecular rápido das aneuploidias mais comuns e array-CGH.