



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Inês Catarina Garcia Ribeiro

**HEMATO-ONCOLOGIA: CONTRIBUTO DA  
CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E  
MOLECULAR NO CENTRO HOSPITALAR DE  
TRÁS OS MONTES E ALTO DOURO  
(CHTMAD)**

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial  
orientada pela Professora Doutora Isabel Carreira e Doutora Rosário Pinto  
Leite e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Junho de 2022



“The dictionary is the only place where success comes before work. Hard work is the price we must pay for success. I think you can accomplish anything if you're willing to pay the price.” - *Vince Lombard*



## **Agradecimentos**

Chegada ao fim desta etapa e ao apresentar este Relatório de Estágio, valorizo a importância e a influência que todos os envolvidos tiveram ao longo destes dois anos. Assim, cabe-me agradecer àqueles que contribuíram para a minha formação pessoal e académica:

À Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, na pessoa da Professora Doutora Isabel Carreira e da Professora Doutora Joana Melo, diretoras do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial, pelas oportunidades, profissionalismo e incentivo no decorrer deste Mestrado.

Ao Diretor do Departamento da Mulher e da Criança do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (CHTMAD), Doutor Osvaldo Moutinho, pela oportunidade da realização deste estágio, pelas facilidades concedidas e condições disponibilizadas durante o mesmo.

Ao Laboratório de Genética do CHTMAD na pessoa da Doutora Rosário Pinto Leite, minha orientadora e responsável pelo Laboratório, por me ter aceitado e acolhido como estagiária numa equipa coesa e dedicada, pela confiança que depositou e continua a depositar em mim, pelo seu espírito crítico e rigor científico e por me apoiar e incentivar incondicionalmente ao longo deste percurso e da minha vida.

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Carreira, pelo seu apoio, compreensão, exemplo, inspiração, por ter sido fundamental na minha formação pessoal e profissional e por exigir de mim sempre o melhor.

Ao Laboratório de Genética do CHTMAD: Doutora Regina Arantes, Dra. Marta Souto, Dra. Lucinda Silva e Dr. Pedro Botelho por me integrarem e ensinarem. Por toda a paciência, ajuda, incentivo, partilhas e crescimento pessoal e profissional que me possibilitaram. Ao Dr. Tiago e Maria, pela amizade, ajuda e motivação, pela partilha e sorrisos que escusaram palavras. À Fernanda e Patrícia, minhas companheiras de estágio, pela entreatajuda, apoio e risos. À Dona Rosa, por ser uma pessoa meiga, preocupada e amiga, por me ter apoiado incondicionalmente neste último ano.

Aos meus pais, por me permitirem sonhar e se certificarem sempre que cumpro os meus sonhos. Por ampararem todas as minhas quedas e por serem a força que me levanta. À minha mãe por ter o colo mais acolhedor e para onde, passe o tempo que passar, vou sempre voltar. Ao meu pai, por viver as minhas conquistas sempre com

tanta intensidade, por ouvir com atenção e entusiasmo cada explicação e por demonstrar continuamente o seu orgulho por mim.

Ao meu irmão por, independentemente da situação ficar sempre do meu lado e por me defender sempre, pelos risos, partilhas, abraços e por ser o meu melhor amigo, por ser a força que me faz ir e que me faz sempre voltar, por ser o melhor do mundo.

Ao meu namorado, João, por estar presente em todos os momentos, por me mostrar a maneira mais calma de dar a volta à vida, por ser a minha inspiração constante e o meu maior orgulho, por tudo aquilo que prescinde para que nada nos falte, por me fazer lutar incansavelmente pelos nossos sonhos, por ter o abraço mais compreensivo e calmo, por me mostrar que a definição de casa é onde ele estiver e pelos sete anos mais bonitos da minha vida. À Dona Brigitte, ao Senhor Fernando e ao Pedro por serem também eles a minha casa, pelo apoio, carinho, risos e histórias sem fim. Por me acolherem, apoiarem incondicionalmente e por nos permitirem ser tão felizes.

À minha família, pela união e por todas as minhas pequenas e grandes conquistas serem sempre motivo de uma mesa na horizontal. Aos meus avós, tios e primos em especial à tia Ia e Cláudia, pela força, exemplo de resiliência e carinho demonstrado.

À Rita e ao David, os melhores amigos da vida. À Rita, por me mostrar continuamente, que a distância nada significa quando uma amizade significa tanto. Pela preocupação, carinho e amor que traz no seu coração. Ao David, pela honestidade, pelas palavras certas à hora certa, pelo incentivo constante e pelo sentido de justiça. Por ser o primeiro a proporcionar encontros que se revelam grandes e bonitas amizades e o último a dar-me razão. Obrigada por tanto.

À Ana, pelos desabafos, descomplicações e passeios. Por ter sempre pronta a resposta certa, por fazer das minhas conquistas também as suas festejando-as sempre tão intensamente. À Vanessa, minha companheira de Mestrado, pelos olhares que escusaram palavras, por ter dado ainda mais sentido a este percurso e pela amizade. À Céline, Francisca e Ana Margarida pelos abraços que continuam a ser casa e pela amizade.

Aos manitos por continuarem do meu lado independentemente das voltas que a vida dê e passe o tempo que passar, por continuarem a fazer parte das minhas melhores memórias.

À Catarina, Tiago, Nunes, Balazeiro, Diogo, Beatriz, Afonso e Silva, pelos risos, brindes e pela amizade.

Aos meus ministros: Berte, Tiago, Ni, Márcio, Marta, Céu, Mada, David e João pelos encontros, viagens, auto-convites e gargalhadas. Pelas danças, fotos, partilhas e brindes. É tão bom estar rodeada de amigos certos, um bravo para vocês.

À Lara, Matilde e Larita, por serem as minhas meninas. Por encontrarem em mim uma amiga que lhes dá sempre a mão e uma amizade para a vida. Pela companhia, orações, mãos dadas e lágrimas partilhadas, por serem as afilhadas mais queridas e especiais. À Inês Pires, Maria Inês, Matilde Miranda e Isabel, por embarcarem comigo nas aventuras da vida, por me ensinarem tanto e por aumentarem a minha fé.

À Mi, por me ouvir, por estar na primeira fila a festejar as minhas conquistas, por me dar sempre a mão, pela preocupação, pelas partilhas, carinho, amizade e por todo o caminho que faremos, juntas.

À família do Rumos: Renato, Pedrinho e Samuel por terem sido o Rumo mais bonito que a minha vida tomou este ano. Ao Renato, o irmão mais velho que a Fé me deu, pelas conversas, gargalhadas, desabafos, partilhas e amizade, pelos abraços, lenços e crescimento que me permitiu e permite fazer a seu lado. Ao Pedrinho e Samuel, amigos e irmãos mais novos, pelos risos, conversas e pela amizade de uma vida. À Irmã Margarida, Frei Joaquim, Frei Francisco, Ricardo e Teresa e restante família Carmelita, por me terem acolhido de uma forma tão especial e calorosa na sua e agora também minha casa.

Sou muito grata por ter pessoas tão boas e que me querem tão bem, obrigada a todos!



## Publicações

Este trabalho encontra-se parcialmente publicado:

Ribeiro I, Souto M, Morais P, Cunha M, Moutinho O, Carreira I, Pinto-Leite R (2022) **A importância da análise Citogenética na Leucemia Mielóide Aguda: a propósito de um caso.** XIV Jornadas de Bioquímica, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

**Menção Honrosa** - Ribeiro I, Souto M, Morais P, Cunha M, Moutinho O, Pinto-Leite R (2022) **Conventional cytogenetics and FISH analysis of 10 samples with a suspected diagnosis of Multiple Myeloma in CHTMAD.** XIV Jornadas de Genética e Biotecnologia | IV Jornadas Ibéricas de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Ribeiro I, Souto M, Seixas F, Cunha M, Moutinho O, Pinto-Leite R (2021) **A case report of acute myeloid leukemia with t(11;21)(q13;q22) demonstrating the relevance of cytogenetics analysis.** Sociedade Portuguesa de Genética Humana, Portugal.



## Índice Geral

<b>Agradecimentos</b> .....	III
<b>Publicações</b> .....	VII
<b>Índice de Figuras</b> .....	XIII
<b>Índice de Tabelas</b> .....	XVII
<b>Resumo</b> .....	XIX
<b>Abstract</b> .....	XXI
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	XXIII
<b>Capítulo 1   Introdução</b> .....	1
1   Citogenética no cancro .....	3
1.1   Perspetiva histórica .....	3
1.2   Citogenética Convencional.....	4
1.3   Citogenética Molecular.....	6
1.3.1   Tipos de sondas.....	7
2   Doenças hemato-oncológicas .....	8
2.1   Hematopoiese .....	9
2.2   Classificação das doenças Hemato-Oncológicas .....	10
2.3   Neoplasias Mielóides .....	11
2.3.1   Leucemia Mielóide Crónica.....	11
2.3.2   Síndrome Mielodisplásico .....	13
2.3.3   Leucemia Mielóide Aguda.....	16
2.4   Neoplasias Linfóides .....	17
2.4.1   Neoplasias de Células B .....	17
2.4.1.1   Leucemia Linfática Crónica.....	17
2.4.1.2   Mieloma Múltiplo.....	19
2.4.2   Linfomas Não Hodgkin .....	20
2.4.2.1   Linfoma Folicular .....	20
<b>Capítulo 2   Objetivos</b> .....	21
1   Diagnóstico citogenético em hemato-oncologia .....	23
2   Integração na rotina laboratorial.....	23
<b>Capítulo 3   Materiais e Métodos</b> .....	<b>25</b>
1   Material Biológico.....	29
2   Citogenética Convencional.....	29
2.1   Culturas Celulares .....	29
2.1.1   Culturas Diretas .....	30

2.1.1.1   Sincronização.....	31
2.1.2   Culturas com estimuladores .....	31
2.2   Manipulação Celular.....	32
2.2.1   Colcemide.....	32
2.2.2   Solução hipotónica .....	33
2.2.3   Fixador .....	34
2.2.4   Espalhamento .....	34
2.3   Técnica de bandagem GTL.....	34
2.4   Análise microscópia.....	35
3   Citogenética Molecular – FISH.....	35
3.1   Espalhamento e Envelhecimento das amostras.....	36
3.2   Preparação das sondas.....	36
3.3   Desnaturação da sonda e do DNA alvo.....	37
3.4   Hibridação.....	37
3.5   Lavagens pós-hibridação .....	37
3.6   Contraste.....	38
3.7   Análise microscópica .....	38
<b>Capítulo 4   Resultados e Discussão.....</b>	<b>39</b>
1   Caracterização das amostras.....	41
1.1   Idade.....	41
1.2   Sexo.....	42
1.3   Análise citogenética .....	42
2   Neoplasias mielóides .....	45
2.1   Leucemia mielóide crónica.....	45
2.2   Síndrome Mielodisplásico.....	49
2.3   Leucemia Mielóide Aguda .....	52
3   Neoplasias linfóides .....	55
3.1   Leucemia Linfática Crónica.....	55
3.2   Mieloma múltiplo .....	58
3.3   Linfoma Folicular.....	61
<b>Capítulo 5   Conclusão .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 6   Referências Bibliográficas .....</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo 7   Anexos.....</b>	<b>XXV</b>
Anexo I – Protocolo de Linfócitos não cultivados.....	XXVII
Anexo II – Protocolo de culturas diretas e sincronizadas .....	XXVIII
Anexo III – Protocolo de culturas com estimuladores.....	XXXI

Anexo IV – Protocolo da bandagem GTL.....	XXXIII
Anexo V – Protocolo da Técnica de FISH.....	XXXV



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>   Representação de cromossomas metafásicos obtidos por Tijo e Levan, 1956 .....	3
<b>Figura 2</b>   Classificação dos cromossomas consoante a posição do centrómero .....	4
<b>Figura 3</b>   Representação esquemática das etapas principais da técnica de FISH. ....	7
<b>Figura 4</b>   Hematopoiese .....	9
<b>Figura 5</b>   Esquema da alteração cromossómica em doentes com LMC .....	12
<b>Figura 6</b>   <b>a)</b> Cariótipo de um indivíduo do sexo feminino com a t(9;22); <b>b)</b> FISH em cromossomas metafásicos para a t(9;22); <b>c)</b> FISH em núcleos interfásicos para a t(9;22) .....	12
<b>Figura 7</b>   Diagrama esquemático do cromossoma 5q com as regiões comumente deletadas representadas.....	15
<b>Figura 8</b>   Culturas celulares diretas e sincronizadas .....	31
<b>Figura 9</b>   Culturas celulares com estimuladores .....	32
<b>Figura 10</b>   Representação esquemática do processo de manipulação celular .....	32
<b>Figura 11</b>   Representação esquemática da técnica de FISH.....	36
<b>Figura 12</b>   Representação do resultado citogenético das amostras com anomalias citogenéticas .....	41
<b>Figura 13</b>   Representação da idade categorizada dos 53 indivíduos analisados .....	41
<b>Figura 14</b>   Representação do sexo dos indivíduos nas 29 amostras com anomalias cromossómicas características de neoplasia hematológica.....	42
<b>Figura 15</b>   Cariótipos com bandas GTL de um indivíduo do sexo feminino sem alterações cromossómicas (46,XX). a) cultura direta; b) cultura sincronizada.....	43
<b>Figura 16</b>   Cariótipo com bandas GTL resultante de uma cultura com estimuladores	44
<b>Figura 17</b>   Metafase com bandagem GTL.....	44
<b>Figura 18</b>   Amostra 6 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a t(9;22) .....	46
<b>Figura 19</b>   Amostra 6 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com a sonda de sequência única para a marcação dos cromossomas 9 (vermelho) e 22 (verde) .....	47

<b>Figura 20</b>   Amostra 9 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a t(9;22;16).....	47
<b>Figura 21</b>   Amostra 9 - Técnica de FISH em metafase com a sonda de sequência única para a marcação dos cromossomas 9 e 22 .....	48
<b>Figura 22</b>   Amostra 11 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino. a) perda do cromossoma Y; b) del(20)(q11.2).....	50
<b>Figura 23</b>   Amostra 11 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com a sonda de sequência única para o cromossoma 20 .....	50
<b>Figura 24</b>   Amostra 19 - Cariótipo com bandas GTL, resultante de uma amostra do sexo masculino com monossomia do #7 e com a t(11;21) .....	51
<b>Figura 25</b>   Amostra 19 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com sondas específicas para SMD.....	51
<b>Figura 26</b>   Amostra 21 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a t(19;21) .....	53
<b>Figura 27</b>   Amostra 21 - Técnica de FISH em metafase e núcleo interfásico com a sonda para o cromossoma 21 .....	53
<b>Figura 28</b>   Amostra 23 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a t(15;17).....	54
<b>Figura 29</b>   Amostra 23 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com a sonda para a t(15;17)(PML/RARA).....	54
<b>Figura 30</b>   Amostra 28 - Cariótipo com bandas GTL, de uma amostra do sexo feminino com trissomia do cromossoma 12, representada com setas. 47,XX,+12[15]/46,XX[5].	56
<b>Figura 31</b>   Amostra 28 - Técnica de FISH em metafase e núcleo interfásico com a sonda para o cromossoma 12.....	57
<b>Figura 32</b>   Amostra 30 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos e metafase com sondas específicas para LLC. a) um sinal para 13q14 (vermelho) e dois sinais para a região controlo (verde); b) um sinal para 17p13.1 (verde) e dois sinais para 11q22.3, (vermelho).....	57
<b>Figura 33</b>   Amostra 39 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com sondas específicas para MM.....	59
<b>Figura 34</b>   Amostra 47 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos e metafases com sondas específicas para MM. <b>a)</b> um sinal para 13q14 (vermelho) e dois sinais para a região controlo (verde); <b>b)</b> um sinal para o cromossoma 17 (vermelho) e dois sinais para a região controlo (verde); <b>c)</b> metafase com um sinal de fusão para a t(11;14), com três sinais para o cromossoma 14 (vermelho) e dois sinais para o cromossoma 11 (verde); <b>d)</b> metafase com três sinais para o cromossoma 14 (vermelho) e dois sinais para o cromossoma 4 (verde).....	60

<b>Figura 35</b>   Amostra 49 - Técnica de FISH em metafase com a sonda para a translocação (14;18) .....	61
<b>Figura 36</b>   Amostra 52 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a del(6)(q21q25).....	62
<b>Figura 37</b>   Amostra 52 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com a sonda para a deleção do cromossoma 6.....	62



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b>   Nomenclatura básica para cromossomas sem bandagem .....	5
<b>Tabela 2</b>   Técnicas de bandagem cromossómica .....	6
<b>Tabela 3</b>   Classificação das doenças hemato-oncológicas .....	10
<b>Tabela 4</b>   Alterações citogenéticas adicionais na leucemia mieloide crónica e o seu valor prognóstico. ....	13
<b>Tabela 5</b>   Classificação dos síndromes mielodisplásicos e suas características .....	14
<b>Tabela 6</b>   Alterações citogenéticas no síndrome mielodisplásico e o seu valor prognóstico .....	16
<b>Tabela 7</b>   Alterações citogenéticas na leucemia mielóide aguda e o seu valor prognóstico .....	16
<b>Tabela 8</b>   Alterações citogenéticas na leucemia linfática crónica e o seu valor prognóstico .....	18
<b>Tabela 9</b>   Alterações citogenéticas no mieloma múltiplo e o seu valor prognóstico ....	20
<b>Tabela 10</b>   Tipo de Leucemia, amostra, cultura e análise citogenética no total de amostras .....	27
<b>Tabela 11</b>   Indicação clínica e tipo de culturas realizadas .....	30
<b>Tabela 12</b>   Quantidade e tempo de exposição ao colcemide consoante o tipo de cultura .....	33
<b>Tabela 13</b>   Painel de sondas para as anomalias citogenéticas consoante o tipo de leucemia .....	37
<b>Tabela 14</b>   Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de leucemia mielóide crónica .....	46
<b>Tabela 15</b>   Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de síndrome mielodisplásico .....	49
<b>Tabela 16</b>   Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de leucemia mielóide aguda .....	52
<b>Tabela 17</b>   Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de leucemia linfática crónica .....	56
<b>Tabela 18</b>   Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de mieloma múltiplo .....	58

<b>Tabela 19</b>   Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de linfoma folicular .....	61
--	----

## Resumo

A Citogenética estuda a morfologia, estrutura, função e comportamento biológico dos cromossomas e divide-se em duas áreas: citogenética convencional e citogenética molecular. A evolução das técnicas citogenéticas permitiu, nas neoplasias hematológicas, a identificação e deteção de alterações cromossómicas com implicações no diagnóstico, orientação clínica, decisão terapêutica e avaliação do prognóstico. A citogenética convencional tem como objetivo o estudo de cromossomas e da sua morfologia pela análise do cariótipo, enquanto a citogenética molecular, pela técnica de Hibridação in situ fluorescente (FISH), permite a deteção de anomalias cromossómicas, a análise em núcleos interfásicos e em cortes de tecido. As neoplasias hematológicas influenciam a normal produção, desenvolvimento e diferenciação de células sanguíneas. A abordagem diagnóstica em hemato-oncologia deve ser feita de acordo com a classificação dos tumores dos tecidos hematopoiético e linfóide da Organização Mundial de Saúde, baseada nos dados morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e clínicos. Este relatório de estágio aborda seis neoplasias hematológicas: três de linhagem mielóide – Leucemia Mielóide Crónica (10 amostras), Síndrome Mielodisplásico (10 amostras) e Leucemia Mielóide Aguda (7 amostras); três de linhagem linfóide – Leucemia Linfática Crónica (10 amostras), Mieloma Múltiplo (10 amostras) e Linfoma Folicular (6 amostras). Estas neoplasias hematológicas perfazem um total de 53 amostras anonimizadas e excedentárias, 33 de medula óssea e 20 de sangue periférico, pertencentes a indivíduos do Centro Hospitalar de Trás os Montes e Alto Douro. Na totalidade das amostras, foi realizada a técnica de FISH, sendo que, em 35 destas, foi efetuada, cumulativamente, a análise por citogenética convencional, a bandagem GTL. Este estágio permitiu-me a obtenção de experiência em diagnóstico genético clínico laboratorial, nomeadamente diagnóstico citogenético hemato-oncológico pela aplicação e realização autónoma de técnicas de citogenética convencional e molecular, como a realização de culturas celulares, manipulação, espalhamento, bandagem, identificação, organização e análise de cariótipos e a sua respetiva classificação citogenética pela realização da técnica de FISH e análise. Do mesmo modo, permitiu-me a integração na rotina do Laboratório de Genética do CHTMAD e a realização de técnicas em amostras para diagnóstico pré-natal, pós-natal e oncológico e o acompanhamento no projeto de implementação da metodologia de Sequenciação de Nova Geração (NGS) em Oncologia.

**Palavras chave:** Citogenética Convencional, Citogenética Molecular, FISH, Doenças Hemato-oncológicas.

## **Abstract**

Cytogenetics is the study of the morphology, structure, function and biological behavior of chromosomes and is divided into two areas: conventional cytogenetics and molecular cytogenetics. The evolution of cytogenetic techniques has allowed, in hematological malignancies, the identification and detection of chromosomal alterations with implications for diagnosis, clinical guidance, therapeutic decision and the evaluation of prognosis. Conventional cytogenetics aims the study of chromosomes and their morphology by karyotype analysis, while molecular cytogenetics, using the Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) technique, allows the detection of chromosomal abnormalities, analysis in interphase nuclei and in sections of tissues. Hematologic neoplasms influence the normal production, development and differentiation of blood cells. The diagnostic approach in hemato-oncology should be performed according to the classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues of the World Health Organization, based on morphological, immunophenotypic, genetic and clinical data. This internship report addresses six hematological neoplasms: three of myeloid lineage – Chronic Myeloid Leukemia (10 samples), Myelodysplastic Syndrome (10 samples) and Acute Myeloid Leukemia (7 samples); three of lymphoid lineage – Chronic Lymphatic Leukemia (10 samples), Multiple Myeloma (10 samples) and Follicular Lymphoma (6 samples). These hematological neoplasms make up a total of 53 samples, anonymized and excess samples, 33 of bone marrow and 20 of peripheral blood, belonging to individuals from the Centro Hospitalar of Trás os Montes and Alto Douro. The FISH technique was performed in all samples and in 35 of these, the analysis by conventional cytogenetics, the GTL banding, was cumulatively performed. This internship allowed me to obtain experience in laboratory clinical genetic diagnosis, namely hemato-oncological cytogenetic diagnosis through the application and autonomous realization of conventional and molecular cytogenetic techniques such as cell cultures, manipulation, spreading, banding, identification, organization and analysis of karyotypes and their respective cytogenetic classification and by performing the FISH technique and analysis. Likewise, it allowed me to integrate into the routine of the Genetics Laboratory of CHTMAD and to perform techniques on samples for prenatal, postnatal and oncological diagnosis and follow-up in the implementation project of the Next Generation Sequencing methodology (NGS) in Oncology.

**Keywords:** Conventional cytogenetics, Molecular cytogenetics, FISH, Hematologic malignancies.



## Lista de Abreviaturas

-	perda
#	cromossoma
%	percentagem
+	ganho
°	graus celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
<i>ABL1</i>	<i>Abelson Murine Leukemia</i>
<i>ATM</i>	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
<i>BCL2</i>	<i>BCL2 apoptosis regulator</i>
<i>BCR</i>	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
<i>BIRC3</i>	<i>Baculoviral IAP repeat containing 3</i>
<i>CBFB</i>	<i>Core-binding factor subunit beta</i>
CC	Citogenética convencional
<i>CCND1</i>	<i>Cyclin D1</i>
CHTMAD	Centro Hospitalar de Trás os Montes e Alto Douro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
<i>CTNNA1</i>	<i>Catenin alpha 1</i>
D	Culturas diretas
DAPI	<i>Diamidino-2-phenylindole</i>
del	Deleção
DMP	Doenças mieloproliferativas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSP30	Cpg-oligonucleotide
E	Culturas com estimuladores
<i>EGR-1</i>	<i>Early growth response 1</i>
<i>FGFR3</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
G	Bandagem G
g	Gramas
<i>GMSI</i>	<i>Gamopatia monoclonal de significado indeterminado</i>
h	Hora
<i>IgH</i>	<i>Immunoglobulin heavy locus</i>
IL2	<i>Interleukin 2</i>
inv	Inversão
<i>k-max</i>	<i>Karyomax medium</i>
L	Litro
LF	Linfoma folicular
LH	Linfoma de Hodgkin
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LNC	Linfócitos não cultivados
LNH	Linfoma não Hodgkin
M	Molar

<i>MDM2</i>	<i>MDM2 proto-oncogene</i>
min	Minutos
miR	Micro RNA
mL	Mililitro
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
MO	Medula óssea
MTX	Metotrexato
<i>MYC</i>	<i>MYC proto-oncogene, bhlh transcription factor</i>
<i>MYH11</i>	<i>Myosin heavy chain 11</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCB	Neoplasias de células B
NCT	Neoplasias de células T e NK
NGS	Sequenciação de nova geração
NIH	<i>National cancer institute</i>
<i>NOTCH1</i>	<i>Notch receptor 1</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Braço curto do cromossoma
Ph	<i>Philadelphia</i>
PML	<i>PML nuclear body scaffold</i>
q	Braço longo do cromossoma
<i>RARA</i>	<i>Retinoic acid receptor alpha</i>
<i>RB1</i>	<i>RB transcriptional corepressor 1</i>
RCD	Região comumente deletada
rpm	Rotações por minuto
<i>RPS14</i>	<i>Ribosomal protein S14</i>
<i>RUNX1</i>	<i>RUNX family transcription factor 1</i>
<i>RUNX1T1</i>	<i>RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1</i>
SMD	Síndromes mielodisplásicas
SP	Sangue periférico
<i>SPARC</i>	<i>Secreted protein acidic and cysteine rich</i>
SSC	Citrato de sódio salino
SSC	Citrato de sódio salino
SVF	Soro de vitelo fetal
t	Translocação
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>
TPA	<i>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
TPK	Proteína tirosina quinase

## Capítulo 1 | Introdução



## 1 | Citogenética no cancro

### 1.1 | Perspetiva histórica

A citogenética humana teve origem em 1952 quando, por um erro no procedimento experimental, Hsu adicionou solução hipotónica a uma suspensão de células mitóticas humanas antes destas serem fixadas. A solução hipotónica ao permitir a entrada de água nas células promovia a sua turgescência e a separação dos cromossomas entre si, facilitando a sua visualização (1). Esta descoberta permitiu a Tijo e Levan, em 1956, a determinação do número correto de cromossomas humanos, 46 cromossomas (Figura 1) (2, 3). Em 1960 foi estabelecido um sistema internacional de nomenclatura que permitiu descrever os cromossomas humanos e as anomalias cromossómicas, *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) (4).



**Figura 1 | Representação de cromossomas metafásicos obtidos por Tijo e Levan, 1956.** Metáfase de fibroblastos embrionários humanos, obtida por tratamento com colquicina, que possibilitou a primeira contagem correta do número cromossómico humano. Adaptado de (2).

A descoberta de um pequeno cromossoma anormal, cromossoma *Philadelphia*, em 1960 em amostras de medula óssea de doentes com Leucemia Mielóide Crónica (LMC) por Peter Nowell e David Hungerford evidenciou pela primeira vez o cancro como resultado de uma alteração genética específica (5).

Com a evolução das técnicas citogenéticas, em 1973, Janet Rowley descobriu a existência de uma translocação entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22 na LMC que resultou num gene de fusão *BCR-ABL* expresso nas células destes doentes. O cromossoma *Philadelphia* deu então origem a uma nova era de diagnóstico citogenético, nomeadamente no cancro permitindo a associação entre anomalias cromossómicas e neoplasias hematológicas (3, 6).

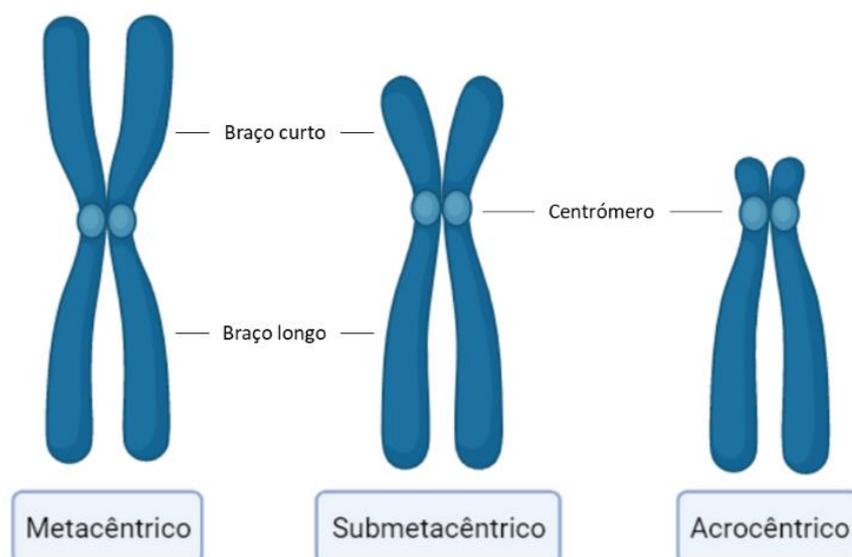
A Citogenética dedica-se ao estudo da morfologia, estrutura, função e comportamento biológico dos cromossomas e divide-se em duas áreas: citogenética

convencional e citogenética molecular. A evolução das técnicas citogenéticas permitiu, nas neoplasias hematológicas, a identificação e detecção de alterações cromossômicas com implicações no diagnóstico, orientação clínica, decisão terapêutica e avaliação do prognóstico (3, 7).

## 1.2 | Citogenética Convencional

A citogenética convencional tem como objetivo o estudo de cromossomas e da sua morfologia pela análise do cariótipo. O cariótipo ou cariograma consiste no alinhamento sistemático e classificação dos cromossomas de uma célula. As células somáticas humanas são constituídas por 23 pares de cromossomas (22 pares de autossomas e um par de cromossomas sexuais). Durante a construção do cariograma, os autossomas são numerados de 1 a 22 por ordem decrescente de tamanho (com exceção do cromossoma 21 que é inferior ao 22). Os cromossomas sexuais são denominados X e Y, sendo o complemento sexual feminino XX e o masculino XY (4, 8-10).

Os cromossomas são divididos num braço curto (p) e longo (q) pelo centrómero (#) (Slovak et al., 2013). Mediante a posição do centrómero, os cromossomas são classificados como metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos. Nos cromossomas metacêntricos, o centrómero cria um braço curto e um braço longo com tamanhos similares. Nos cromossomas submetacêntricos o centrómero cria um braço curto e um braço longo e os cromossomas acrocêntricos contêm o centrómero junto a uma extremidade (4, 9-11) (Figura 2).



**Figura 2 | Classificação dos cromossomas consoante a posição do centrómero.** Adaptado de (11). Ilustração criada no site *BioRender*.

Os cromossomas são divididos em grupos de A a G com base no tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas (Tabela 1) (4).

**Tabela 1 | Nomenclatura básica para cromossomas sem bandagem.** Adaptado de (12).

<b>Grupo</b>	<b>Cromossomas</b>	<b>Composição</b>
<b>A</b>	1 - 3	Cromossomas metacêntricos grandes
<b>B</b>	4 - 5	Cromossomas submetacêntricos grandes
<b>C</b>	6 - 12, X	Cromossomas metacêntricos médios ou submetacêntricos. O cromossoma X representa o cromossoma maior
<b>D</b>	13 - 15	Cromossomas acrocêntricos médios
<b>E</b>	16 - 18	Cromossomas metacêntricos relativamente pequenos ou submetacêntricos
<b>F</b>	19 - 20	Cromossomas metacêntricos pequenos
<b>G</b>	21 - 22, Y	Cromossomas acrocêntricos pequenos e o cromossoma Y

Com o surgimento e evolução de técnicas de bandagem cromossômico foi possível a identificação de cada cromossoma e de diferentes regiões dentro do mesmo cromossoma através do seu padrão de bandas específico. Uma banda é definida como parte de um cromossoma que é claramente distinguida dos seus segmentos adjacentes, surgindo mais clara ou mais escura através de uma ou mais técnicas de bandagem (4, 9, 10, 12).

Assim, as técnicas de bandagem podem ser divididas em técnicas básicas que, consoante a técnica, vão produzir padrões de bandagem específicos ao longo de todo o cromossoma (bandagem G, Q e R) e técnicas seletivas que vão apenas corar uma região ou banda específica dos cromossomas (bandagem C, NOR e T) (Tabela 2) (12, 13).

Tabela 2 | Técnicas de bandagem cromossômica. Adaptado de (12).

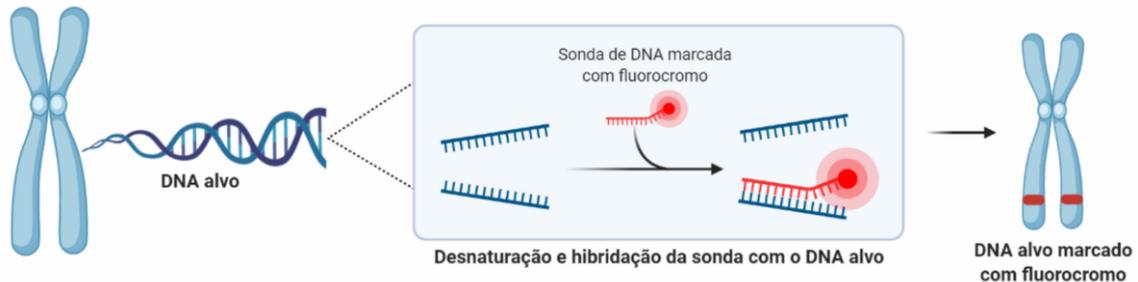
Técnica de bandagem	Tipo de bandas	
<b>G</b>	Giemsa que cora zonas ricas em bases A-T (bandas escuras) e pobres em bases G-C (bandas claras)	Técnicas básicas
<b>Q</b>	Padrão fluorescente que cora zonas ricas em bases A-T e pobres em bases G-C	
<b>R</b>	Cora inversamente à C e Q	
<b>C</b>	Cora sequências de DNA altamente repetitivas como centrômeros, porção distal do cromossoma Y e constrições secundárias dos cromossomas 1, 9 e 16	Técnicas Seletivas
<b>NOR</b>	Identifica o RNA ribossomal, regiões organizadoras do nucléolo e no ramo curto dos cromossomas acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22	
<b>T</b>	Cora as regiões teloméricas	

A citogenética convencional permite uma visão completa e geral através da análise do cariótipo sendo capaz de detetar mosaicos de baixa expressão, no entanto, apresenta uma baixa resolução de 5 a 10 mega pares de bases e algumas desvantagens como por exemplo a presença de poucas células na amostra, baixo índice mitótico e metafases com má qualidade. Algumas limitações da citogenética convencional foram ultrapassadas pela introdução de técnicas moleculares que complementam a análise cromossômica (7, 14).

### 1.3 | Citogenética Molecular

A citogenética molecular é uma área que combina a biologia molecular e a citogenética com o objetivo de superar a limitação de baixa resolução da citogenética convencional na deteção de anomalias cromossômicas de baixo índice mitótico uma vez que inclui a possibilidade de análise em núcleos interfásicos e em cortes de tecido. A evolução natural do laboratório de citogenética para o domínio da técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) levou ao termo "citogenética molecular" como sinónimo de FISH (14-16).

A técnica de FISH é uma abordagem bem estabelecida que consiste na hibridação de uma ou mais sondas marcadas com um fluorocromo com as sequências complementares do DNA alvo em preparações cromossômicas metafásicas ou núcleos interfásicos fixados em lâminas (17-19) (Figura 3).



**Figura 3 | Representação esquemática das etapas principais da técnica de FISH.** A sonda marcada com o fluorocromo e o DNA alvo são desnaturados. Após a hibridação, por complementaridade entre o DNA alvo e a sonda, a região cromossômica de interesse vai permanecer marcada com o fluorocromo, tornando possível a análise do sinal de fluorescência no microscópio de fluorescência. Adaptado de (20). Ilustração criada no site *BioRender*.

### 1.3.1 | Tipos de sondas

A utilização de mais de uma sonda no mesmo material permite a identificação de alterações genéticas que podem estar associadas a diferentes neoplasias hematológicas (18). Estas são classificadas de acordo com a sua sequência alvo:

Sondas de sequência de cópia única (sondas *locus-specific*) - usadas para detectar regiões cromossômicas específicas ou genes individuais. Podem ser marcadas com diferentes fluorocromos e usadas para identificar rearranjos cromossômicos específicos ou para diagnosticar, em amostras clínicas, a existência de um número de genes/sequências anormais:

- Sondas subtelo méricas - hibridam em regiões a montante dos telômeros
- Sondas para translocações específicas no qual os sinais de hibridação da sonda surgem, geralmente, a verde e vermelho:
  - sondas *dual fusion*: A fusão dos genes indica um resultado positivo e é assinalada por um sinal vermelho e um sinal verde individualizados e dois sinais de fusão vermelho/verde ou sinais amarelos no caso de sobreposição de sinais.
  - sondas *break-apart*: Uma região do gene afetada por uma translocação é indicada por um sinal verde separado e um sinal vermelho separado. Uma deleção do gene, resultando numa fusão, é indicada pela perda de um sinal verde/vermelho.

Sondas de sequência repetitiva - permitem a detecção de DNA satélite ou outros elementos de DNA repetidos localizados em regiões cromossômicas específicas e são utilizadas, preferencialmente, na identificação de deleções ou duplicações e de zonas de quebra, no caso de translocações;

Sondas *painting* - sondas complexas que contêm sequências específicas para todo o cromossoma e são utilizadas no estudo de rearranjos complexos, translocações e identificação de cromossomas marcadores (15, 18).

## 2 | Doenças hemato-oncológicas

As neoplasias hematológicas, no mundo, são responsáveis por 7% dos câncros, representando aproximadamente 9% na Europa (21). Estas neoplasias são frequentemente classificadas em quatro subtipos: Leucemia, Linfoma de Hodgkin (LH), Linfoma Não Hodgkin (LNH) e Mieloma Múltiplo (MM). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2020, no mundo, foram registados 474 519 novos casos de Leucemias, 83 087 de LH, 544 352 de LNH e 176 404 novos casos de MM (22).

As doenças hematológicas são cada vez mais comuns em doentes com idade avançada. O envelhecimento é um processo complexo influenciado, principalmente, pela instabilidade genómica e por fatores ambientais levando à diminuição ou perda de função de vários órgãos e ao aumento da suscetibilidade a infeções e a alterações genéticas carcinogénicas. Assim, com o aumento da idade, as células estaminais hematopoiéticas estão mais suscetíveis a danos no DNA pela diminuição da eficácia da sua reparação e mutações permanentes resultando em neoplasias hematológicas (23-25).

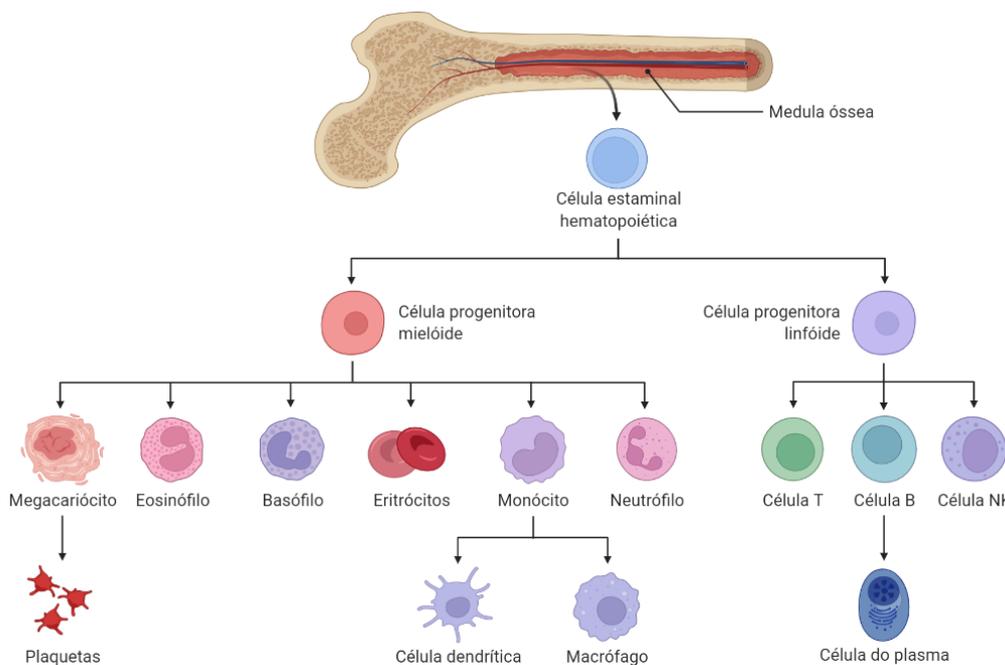
No geral, quando comparado com o sexo masculino, o sexo feminino apresenta um menor risco e melhor prognóstico em diferentes tipos de cancro e neoplasias hematológicas. O sexo masculino apresenta maior incidência e mortalidade de leucemia com uma incidência de 17,6 por 100.000 habitantes e 10,8 por 100.000 habitantes no sexo feminino, por ano. A taxa de mortalidade é 5% maior no sexo masculino em comparação com o sexo feminino durante os primeiros 5 anos após o diagnóstico (26-28).

Uma maior suscetibilidade do sexo masculino pode ser fundamentada pela exposição ambiental, estilo de vida, epigenética e hormonas sexuais, nomeadamente os estrogénios uma vez que estão descritos na literatura como tendo um papel crucial na sobrevivência das células B e, conseqüentemente, o sexo feminino apresenta um maior índice apoptótico. A perda do cromossoma Y ou do cromossoma X é mais frequentemente observada em doentes idosos do sexo masculino com neoplasias hematológicas em comparação com o sexo feminino. A presença destas anomalias sugere uma maior instabilidade genética das células leucémicas no sexo masculino, o que pode contribuir para a progressão da leucemia (28, 29).

## 2.1 | Hematopoiese

A hematopoiese é o processo pelo qual os constituintes celulares do sangue são continuamente reabastecidos ao longo da vida de um organismo. O sistema hematopoiético consiste em várias populações de células altamente especializadas que possuem funções únicas (30-32).

As células estaminais hematopoiéticas são células indiferenciadas, encontradas principalmente na medula óssea (MO) e são caracterizadas pela sua capacidade de auto-renovação e produção de vários progenitores que proliferam e diferenciam-se numa célula progenitora mielóide ou linfóide e, posteriormente, em células sanguíneas maduras (Figura 4) (31, 33).



**Figura 4 | Hematopoiese** - Diferenciação de células estaminais hematopoiéticas na medula óssea. Ilustração criada no site *BioRender*.

## 2.2 | Classificação das doenças Hemato-Oncológicas

A abordagem diagnóstica em hemato-oncologia deve ser feita de acordo com a classificação dos tumores dos tecidos hematopoiético e linfóide da OMS (OMS 2017), baseada nos dados morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e clínicos. Esta classificação divide as neoplasias quanto ao seu grau de maturação: aguda ou crônica e consoante a linhagem envolvida: neoplasias mielóides e neoplasias linfóides (21, 22)

As neoplasias mielóides estão divididas de acordo com o grau de maturação das células, proliferação celular: normal ou displásica, e quantidade de leucócitos e de células imaturas (células blásticas). Incluem as linhagens que dão origem aos monócitos, eritrócitos, megacariócitos e granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos). Estas neoplasias incluem, entre outras: Doenças Mieloproliferativas (DMP); Doenças Mieloproliferativas/Mielodisplásicas (DMP/SMD); Síndromes Mielodisplásicas e Leucemia Mielóide Aguda (LMA). (Tabela 3).

As neoplasias linfóides são divididas de acordo com as suas características morfológicas e imunofenotípicas e são constituídas por três grupos: Neoplasias de células B (NCB); Neoplasias de células T e NK (NCT) e Linfoma de Hodgkin (LH) (22, 34).

**Tabela 3 | Classificação das doenças hemato-oncológicas.** (OMS, 2017).

<b>Doenças Hemato-oncológicas</b>	<b>Neoplasias Mielóides</b>	Doenças Mieloproliferativas
		Doenças Mieloproliferativas / Mielodisplásicas
		Síndromes Mielodisplásicas
		Leucemia Mielóide Aguda
	<b>Neoplasias Linfóides</b>	Neoplasias de células B
		Neoplasias de células T e NK
		Linfoma de Hodgkin

## 2.3 | Neoplasias Mielóides

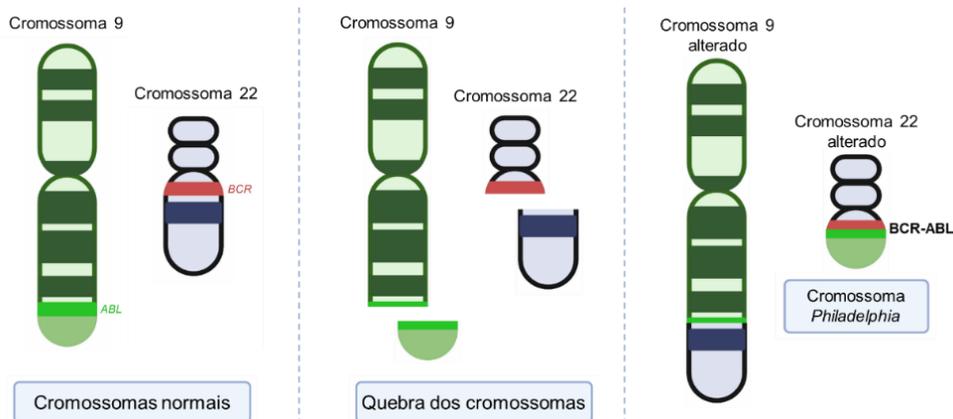
Vão ser abordados durante este trabalho três tipos de leucemia da linhagem mielóide: leucemia mielóide crónica, síndrome mielodisplásico e leucemia mielóide aguda.

### 2.3.1 | Leucemia Mielóide Crónica

A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa que resulta da expansão clonal de precursores hematopoiéticos mielóides, granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos), na medula óssea e que se manifesta frequentemente com leucocitose (aumento do número de leucócitos), anemia (diminuição do número de eritrócitos) e trombocitose (aumento do número de plaquetas). Segundo o *National Cancer Institute* (NIH) a LMC apresenta uma incidência de 1 a 1,5 novos casos por 100 000 habitantes, por ano e é ligeiramente mais frequente no sexo masculino, sendo geralmente diagnosticada entre os 55 e os 65 anos (22, 35-37).

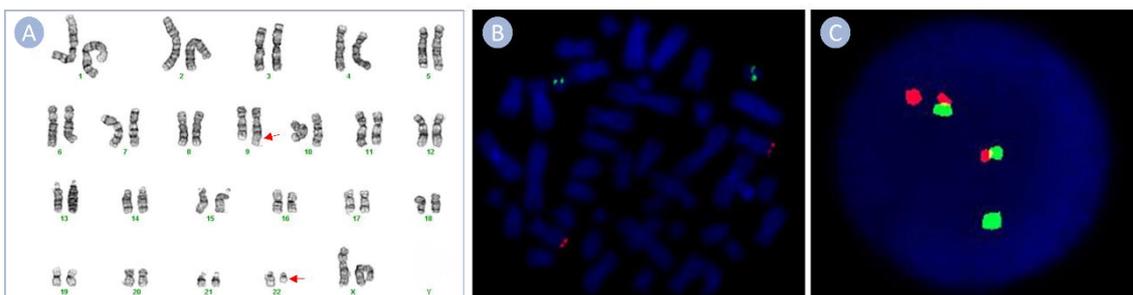
Esta doença apresenta características clínicas e evolutivas heterogéneas e é constituída por três fases: crónica, acelerada e blástica. É diagnosticada, habitualmente, na fase crónica, em que apresenta uma elevada proliferação de células mielóides com capacidade de manter a capacidade de diferenciação. Não sendo tratada, esta doença pode progredir para a fase acelerada em que é perdida a capacidade de diferenciação e o controlo da mesma é cada vez menos eficaz, culminando com a evolução para a fase blástica ou leucemia aguda (37, 38).

A LMC é, de um modo geral, facilmente diagnosticado uma vez que mais de 95% das células destes doentes apresentam uma alteração citogenética, o cromossoma *Philadelphia* (Ph), que resulta de uma translocação recíproca, t(9;22)(q34;q11), entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22. Assim, oncogene *ABL1* (*Abelson Murine Leukemia*), localizado no cromossoma 9, com a função de codificar uma proteína tirosina cinase (TPK), é translocado para uma região específica do gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) no cromossoma 22. Do mesmo modo, parte do gene *BCR* permanece no cromossoma 22 enquanto que a outra região é translocada para o cromossoma 9. Desta translocação resulta o gene de fusão *BCR/ABL1*, também designado de Ph com produção anormal de TPK que causa a desregulação de várias vias de sinalização e, conseqüente proliferação excessiva, resistência à apoptose e outros fatores responsáveis pela oncogénese na LMC (Figura 5) (37-41).



**Figura 5 | Esquema da alteração cromossômica em doentes com LMC.** Da t(9;22) resulta o gene de fusão BCR/ABL1, o cromossoma *Ph*. Adaptado de (42). Ilustração criada no site *BioRender*.

O gene de fusão *BCR/ABL1* pode ser detetado através da citogenética convencional pela análise do cariótipo e por FISH utilizando sondas específicas para os cromossomas 9 e 22 em núcleos interfásicos e em cromossomas metafásicos (Figura 6) (40, 41).



**Figura 6 | a) Cariótipo de um indivíduo do sexo feminino com a t(9;22) assinalada a vermelho, resulta no gene de fusão BCR-ABL1. b) FISH em cromossomas metafásicos para a t(9;22) com resultado normal, o padrão de sinal consiste em dois sinais vermelhos (duas cópias normais para o cromossoma 9) e dois sinais verdes (duas cópias normais para o cromossoma 22). c) FISH em núcleos interfásicos para a t(9;22) com resultado indicativo da fusão dos genes *BCR* (cor verde) e *ABL1* (cor vermelha).** Adaptado de (43, 44).

O cromossoma *Ph* é encontrado em células mielóides da medula óssea e em células nucleadas sanguíneas em mais de 90% dos doentes com sintomatologia e achados clínicos característicos da LMC. Outras alterações cromossômicas adicionais são classificadas como alterações *major* ou *minor* (37).

As alterações citogenéticas *major* estão associadas a um pior prognóstico e são caracterizadas pela trissomia do cromossoma 8, trissomia do cromossoma 19, isocromossoma do braço longo do cromossoma 17. Em contrapartida as alterações cromossômicas *minor* apresentam uma baixa incidência e incluem a deleção do cromossoma Y, trissomia do cromossoma 17, trissomia do cromossoma 21, deleção do cromossoma 7 e deleção do cromossoma 17 (Tabela 4) (37, 38, 40, 43).

**Tabela 4 | Alterações citogenéticas adicionais na leucemia mieloide crónica e o seu valor prognóstico (43).**

<b>Prognóstico</b>	<b>Alterações citogenéticas</b>
	Deleção do cromossoma Y
	Trissomia do cromossoma 17
	Trissomia do cromossoma 21
	Deleção do cromossoma 7
	Deleção do cromossoma 17
<b>Desfavorável</b>	Trissomia do cromossoma 8
	Trissomia do cromossoma 19
	Isocromossoma do braço longo do cromossoma 17

### **2.3.2 | Síndrome Mielodisplásico**

Os síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo de neoplasias mielóides que se caracteriza por hematopoiese clonal ineficaz e displasia numa ou mais linhagens mielóides, anomalias genéticas recorrentes e citopenias (diminuição de um ou mais tipo de células). Deste modo, verifica-se uma apoptose excessiva dos precursores hematopoiéticos na medula óssea e, conseqüentemente, uma diminuição do número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas no sangue periférico. Estes doentes apresentam ainda um risco aumentado para desenvolver leucemia mielóide aguda (LMA) (22, 45-47).

Os SMD apresentam uma incidência de 3 a 4 novos casos por 100 000 habitantes, por ano, na Europa. São mais frequentes no sexo masculino, particularmente em pessoas de idade avançada uma vez que cerca de 60% dos doentes ao diagnóstico têm uma idade superior a 70 anos (45).

A classificação dos SMD pela OMS é baseada no número de citopenias e de linhagens mielóides com displasia, na presença/ausência de sideroblastos no sangue ou medula, na percentagem de blastos no sangue periférico e em alterações citogenéticas ou moleculares (Tabela 5). O diagnóstico de leucemia aguda corresponde a um número de blastos na medula superior a 20% (48, 49).

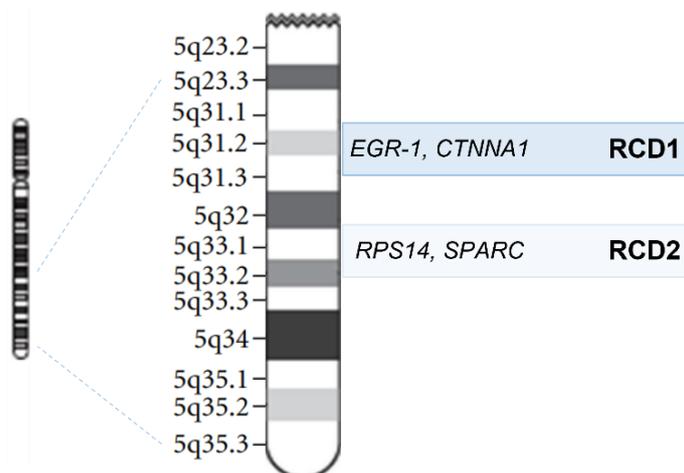
**Tabela 5 | Classificação dos síndromes mielodisplásicas e suas características.** Adaptado de (22, 49, 50)

<b>Tipo de SMD</b>	<b>Características</b>
<b>SMD com displasia numa única linhagem</b>	5-10% dos SMD. Há diminuição de um único tipo de células sanguíneas sendo a mais comum a anemia refratária. O número de blastos na medula é inferior a 5%. A maioria dos doentes têm uma sobrevida longa e a evolução para leucemia aguda é muito rara
<b>SMD com sideroblastos em anel</b>	Muito semelhante à anemia refratária, mas na medula são encontrados sideroblastos
<b>SMD com displasia múltiplas linhagens</b>	40% dos SMD. Há diminuição de células do sangue e apresentam displasia; o número de blastos é inferior a 5%. Prognóstico mais grave, com várias complicações e cerca de 10% destes doentes vêm a ter leucemia aguda.
<b>SMD com excesso de blastos 1</b>	A percentagem de blastos na medula é de 5 a 10%, podendo igualmente encontrar-se no sangue periférico. A probabilidade de evoluir para leucemia aguda é de cerca de 25%
<b>SMD com excesso de blastos 2</b>	O número de blastos na medula e sangue periférico é superior, entre 10 a 20% e, geralmente, existem diversas anomalias no estudo citogenético. Em cerca de 50% dos casos culmina em leucemia aguda
<b>SMD não classificável</b>	Muito raro em que as anomalias encontradas não se enquadram em nenhuma das classificações
<b>SMD com del(5q) isolada</b>	Caracteriza-se por anemia e trombocitose; a percentagem de blastos na medula é inferior a 5%. Ocorre a deleção no braço longo do cromossoma 5. Tem um bom prognóstico e responde ao tratamento com imunomoduladores
<b>Citopenia refratária da infância</b>	Tipo de SMD provisória caracterizada por citopenia persistente, com <5% de blastos na medula óssea e <2% de blastos no sangue periférico

Aproximadamente 50% dos doentes com SMD apresentam anomalias citogenéticas como a monossomia do cromossoma 5 ou 7, trissomia do cromossoma 7 ou 11, deleção do braço longo dos cromossomas 5, 7, 12, 13, 17, 20 ou Y, e outros rearranjos cromossómicos e cariótipos complexos com três ou mais anomalias. As anomalias mais recorrentes incluem a deleção do braço longo do cromossoma 5, 7 e 20 e a trissomia do cromossoma 8 (22, 49, 51).

A anomalia mais frequentemente detetada no SMD é a deleção do braço longo do cromossoma 5, del(5q), e apresenta um prognóstico favorável e baixa progressão para

LMA. O mapeamento citogenético de regiões comumente deletadas (RCDs) inclui as bandas cromossômicas 5q31 e 5q32-5q33 e identificou genes supressores tumorais na RCD1 como o *EGR-1* (*early growth response 1*) e *CTNNA1* (*catenin alpha 1*) ambos em 5q31.2 e na RCD2 como os genes *RPS14* (*ribosomal protein S14*) e *SPARC* (*secreted protein acidic and cysteine rich*) ambos em 5q33.1 (Figura 7) (50-52).



**Figura 7 | Diagrama esquemático do cromossoma 5q com as regiões comumente deletadas representadas.** Adaptado de Fuchs, 2022 (52).

Anomalias do cromossoma 7, nomeadamente monossomia ou deleção do braço longo do cromossoma 7, estão associadas a um prognóstico desfavorável e são relatadas em aproximadamente 10% dos casos de SMD *de novo* e até 50% de SMD relacionado à terapia. O cromossoma 7 apresenta três RCD que incluem as bandas 7q21-q22, 7q34 e 7q35-q36 e contêm genes envolvidos na leucemogénese. A trissomia do cromossoma 8 isolada está descrita em 5% dos doentes com SMD e está associada a um prognóstico intermédio (22, 51, 53).

A deleção do braço longo do cromossoma 20 está descrita em 5% dos casos de SMD. Estes doentes geralmente apresentam um curso clínico indolente quando a *del(20q)* é a única anomalia cromossômica e ocorre no início da doença. Por outro lado, está associada a um prognóstico desfavorável quando detetada posteriormente, promovendo a progressão para LMA (Tabela 6) (22, 53-56).

**Tabela 6 | Alterações citogenéticas no síndrome mielodisplásico e o seu valor prognóstico.**  
Adaptado de (22).

<b>Prognóstico</b>	<b>Alterações citogenéticas</b>
<b>Muito favorável</b>	-Y, del(11q)
<b>Favorável</b>	del(5q), del(12p), del(20q) Duplas, incluindo del(5q)
<b>Intermédio</b>	del(7q), +8, +19, isocromossoma 17q Anomalias simples ou duplas não especificadas noutros subgrupos
<b>Desfavorável</b>	-7, inv(3), t(3q) ou del(3q) Duplas incluindo -7 ou del(7q) Cariótipo complexo (3 anomalias)
<b>Muito desfavorável</b>	Cariótipo complexo (>3 anomalias)

### 2.3.3 | Leucemia Mielóide Aguda

As LMA têm origem nas células estaminais hematopoiéticas e são o resultado da acumulação de precursores mielóides (mieloblastos) na medula óssea, sangue e outros tecidos. Apresenta uma incidência de 4,3 novos casos por 100 000 habitantes, por ano. É ligeiramente mais frequente no sexo masculino, e a idade média ao diagnóstico é de 68 anos (57-60).

Diferentes subtipos de LMA estão associados a alterações genéticas e moleculares distintas, sendo o estudo citogenético fundamental no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de doentes com LMA uma vez que as alterações cromossómicas estão presentes em 55% destes casos. O diagnóstico é baseado numa contagem de >20% de blastos ou na presença de anomalias citogenéticas recorrentes (Tabela 7) (22, 60-63).

**Tabela 7 | Alterações citogenéticas na leucemia mielóide aguda e o seu valor prognóstico.**  
Adaptado de (62, 63)

<b>Prognóstico</b>	<b>Alterações citogenéticas</b>
<b>Favorável</b>	t(15;17) isolada; t(8;21) isolada inv(16)/ t(16;16)/ del(16q)
<b>Intermédio</b>	+8, -Y, +6, del(12p) Cariótipo normal
<b>Desfavorável</b>	-5/del(5q), -7/del(7q), inv(3q), del(9q), t(6;9), t(9;22) Cariótipo complexo Anomalias no 11q23, 20q, 21q, 17p

As anomalias citogenéticas mais comuns associadas à LMA são t(8;21)(q22;q22.1), inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22), t(15;17)(q24.1;q21.2) e as translocações que envolvem o ponto de quebra 11q23. Estes rearranjos cromossômicos estruturais resultam na formação de genes de fusão que codificam proteínas quiméricas que podem contribuir para o início ou progressão da leucemogénese (22, 47, 62, 64).

A translocação t(8;21)(q22;q22.1) envolve o gene *RUNX1* (*RUNX family transcription factor 1*) e o gene *RUNX1T1* (*RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1*). O gene de fusão *RUNX1/RUNX1T1* é uma das alterações cromossômicas mais comuns na LMA. Esta translocação é encontrada em 1 a 5% dos casos de LMA, geralmente em doentes mais jovens e em casos com características de LMA com maturação granulocítica. A inv(16)(p13.1 q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) envolve o gene *CBFB* (*core-binding factor subunit beta*) e o gene *MYH11* (*myosin heavy chain 11*) resultando no gene de fusão *CBFB-MYH11* detetado em 5 a 8% dos doentes mais jovens e, com menos frequência, em adultos. A t(15;17)(q22;q11-12) envolve o gene *PML* (*PML nuclear body scaffold*) e o gene *RARA* (*retinoic acid receptor alpha*), resulta no gene de fusão *PML-RARA* e corresponde a 5 a 8% dos casos de LMA em doentes mais jovens, com menor frequência em doentes mais velhos (22, 60, 64).

## **2.4 | Neoplasias Linfóides**

Serão abordados três tipos de leucemia da linhagem linfóide: leucemia linfática crónica, mieloma múltiplo e linfoma folicular.

### **2.4.1 | Neoplasias de Células B**

#### **2.4.1.1 | Leucemia Linfática Crónica**

A leucemia linfática crónica (LLC) é uma doença linfoproliferativa caracterizada pela acumulação progressiva de linfócitos B funcionalmente incompetentes no sangue periférico, medula óssea e órgãos linfóides. A LLC apresenta uma incidência de 4,1 novos casos por 100 000 habitantes, por ano e é o tipo de leucemia mais comum nos países ocidentais. É ligeiramente mais frequente no sexo masculino e a idade média ao

diagnóstico é de 65 anos, com 80% dos doentes assintomáticos no momento do diagnóstico. Apresenta um curso clínico variável desde casos indolentes a doença agressiva e com progressão rápida (65-67).

Cerca de 80% dos doentes com LLC apresentam, ao diagnóstico, múltiplas anomalias citogenéticas, com diferentes valores de prognóstico, sendo as mais comuns del(13q), trissomia 12, del(11q) e del(17p) (Tabela 8) (68-70).

**Tabela 8 | Alterações citogenéticas na leucemia linfática crónica e o seu valor prognóstico.** Adaptado de (69, 70).

Prognóstico	Alterações citogenéticas
Favorável	Cariótipo normal del(13q)
Intermédio	+12, del(6q) Cariótipo normal
Desfavorável	del(17p), del(11q), +14q Cariótipo complexo

A deleção do braço longo do cromossoma 13, del(13q14) é a alteração citogenética mais comum, encontrada em cerca de 55 a 60% dos casos e está associada a uma evolução clínica favorável quando detetada isoladamente. A região deletada causa a perda de dois microRNAs reguladores, miR15a e miR16-1 (ambos localizados em 13q14.2), responsáveis por inibir a transição no ciclo celular da fase G0 para G1 e inibir a expressão da proteína anti-apoptótica *BCL2* (*BCL2 apoptosis regulator*). Deste modo, doentes com a deleção 13q14 apresentam uma sobre-expressão de *BCL2* culminando na desregulação de genes que regulam o ciclo celular e na evasão à apoptose. A deleção 13q afeta ainda o gene *RB1* (*RB transcriptional corepressor 1*), localizado, igualmente, em 13q14.2 e envolvido no controlo do ciclo celular e na regulação da transcrição (71-73).

A trissomia do cromossoma 12 é considerada a segunda alteração cromossómica mais frequente sendo observada em 10 a 20% dos doentes com LLC e geralmente ocorre numa fase inicial da doença. A sobre expressão do gene *MDM2* (*MDM2 proto-oncogene*) localizado em 12q15 promove a degradação do gene supressor tumoral *TP53* (*tumor protein p53*) levando à desregulação do ciclo celular. O gene *NOTCH1* (*notch receptor 1*) está associado a esta trissomia uma vez que se encontra sobre expresso, promovendo a sobrevivência celular e induzindo a resistência à apoptose (71, 74, 75).

A del(11q) é detetada em cerca de 5 a 20% dos doentes com LLC, nomeadamente em doentes mais jovens e está associada a uma rápida progressão da doença. A região deletada inclui o gene supressor tumoral *ATM* (*ATM serine/threonine kinase*), localizado em 11q22.3 e envolvido na reparação de danos no DNA, regulação do ciclo celular e apoptose e o gene *BIRC3* (*baculoviral IAP repeat containing 3*) localizado em 11q22.2 e implicado na apoptose (71, 76).

A del(17p) é observada em 3 a 10% dos doentes com LLC, no entanto fatores como a progressão da doença e o tratamento (quimioterapia refratária), podem elevar esta percentagem para 30%. Esta deleção provoca a perda do gene *TP53*, e a sua inativação pode ser causada pela sobre expressão de *MDM2*, estando associada a um prognóstico desfavorável (75, 77, 78).

#### 2.4.1.2 | Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia de células plasmáticas ou plasmócitos (células B na fase final de diferenciação) e que se caracteriza pela proliferação de plasmócitos monoclonais que transportam imunoglobulinas não funcionais designadas de proteína monoclonal ou proteína M. O MM apresenta uma incidência de 7 novos casos por 100 000 habitantes, por ano, correspondendo a 1% de todos os cancros diagnosticados e representam 10 a 15% das neoplasias hematológicas. São mais frequentes no sexo masculino e idade média ao diagnóstico é de 70 anos (79-81).

O MM é derivado, em cerca de 30% a 50% dos casos de uma neoplasia benigna das células plasmáticas, a gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), a qual pode ser sucedida pela etapa intermédia, de Mieloma Múltiplo Indolente (MMI), e posteriormente pelo MM sintomático (22, 82, 83).

Os eventos genéticos iniciais ou primários podem ser detetados na GMSI e divididos em hiperplóides e não hiperplóides. Nos eventos hiperplóides o aparecimento do tumor é caracterizado pela presença de trissomias dos cromossomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21 e monossomia dos cromossomas 13,14,16 e 22. Nos eventos não hiperplóides as translocações são frequentes e representam cerca de 40-50% dos eventos primários no MM. Estas translocações envolvem o gene *IgH* (*immunoglobulin heavy locus*) localizado em 14q32.33 sendo a t(11;14) e t(4;14) as mais frequentes e outras regiões como 11q13 que inclui o gene *CCND1* (*cyclin D1*) e 4p16.3 envolvendo o gene *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*). (83-85).

A monossomia ou deleção parcial 13q14 é descrita em cerca de 50% dos casos de MM e inclui o gene *RB1*. Outras anomalias citogenéticas como a deleção do braço curto dos cromossomas 1 e 17, translocações envolvendo o gene *MYC* (*MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*) localizado em 8q24, e ganhos no ramo longo do cromossoma 1 estão associadas à progressão da doença (Tabela 9) (83, 86, 87).

**Tabela 9 | Alterações citogenéticas no mieloma múltiplo e o seu valor prognóstico.** Adaptado de (87).

Prognóstico	Alterações citogenéticas
Favorável	Cariótipo normal t(11;14), t(6;14)
Desfavorável	t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(13q), del(17p) Cariótipo complexo

## 2.4.2 | Linfomas Não Hodgkin

Os LNH de células B correspondem a, aproximadamente, 80% dos LNH no qual se inclui o Linfoma Folicular (LF).

### 2.4.2.1 | Linfoma Folicular

O LF inclui-se nos LNH e consiste no LNH de baixo grau mais frequente uma vez que constitui cerca de 35% dos linfomas. Apresenta uma maior incidência no sexo masculino e a idade média ao diagnóstico é de 65 anos (22, 88).

Aproximadamente 85% dos doentes com LF apresentam a t(14;18). Esta translocação envolve o gene *IGH* localizado em 14q32 e o gene *BCL2* localizado em 18q21 e vai levar à sobre expressão do *BCL2* que, sendo uma proteína anti-apoptótica vai levar à inibição da apoptose. Neste tipo de linfomas podem ocorrer alterações citogenéticas secundárias como as del(1p), del(17p), del(6q), del(10q) e ganhos do cromossoma 1, 7, 8 e X ou do ramo curto do cromossoma 12 e 18, associadas com a progressão da doença (89, 90).

## **Capítulo 2 | Objetivos**



O presente relatório foi efetuado no Laboratório de Genética do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (CHTMAD), em Vila Real, no âmbito da unidade curricular de “Estágio” para a obtenção do grau de Mestre em Genética Clínica Laboratorial pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

## **1 | Diagnóstico citogenético em hemato-oncologia**

O principal objetivo deste estágio consistiu na obtenção de experiência em diagnóstico em genética clínica laboratorial, nomeadamente diagnóstico citogenético hemato-oncológico pela aplicação e realização autónoma de técnicas de citogenética convencional e molecular em amostras de sangue periférico e medula óssea:

- ✓ Realização de culturas celulares, manipulação, espalhamento, bandagem (G, C, NOR);
- ✓ Identificação, organização e análise de cariótipos e a sua respetiva classificação citogenética;
- ✓ Realização da técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH);
- ✓ Análise e interpretação de resultados.

## **2 | Integração na rotina laboratorial**

O segundo objetivo deste estágio prendeu-se com a integração na rotina do Laboratório de Genética do CHTMAD tendo sido realizadas, sob supervisão e em paralelo com o objetivo principal, outras técnicas em amostras para diagnóstico pré-natal, pós-natal e oncológico.

Durante o primeiro mês foi-me proporcionada a integração na rotina do laboratório nas várias vertentes do diagnóstico pela aprendizagem dos protocolos. Posteriormente, realizei numa semana em cada mês, durante os 9 meses, todas as técnicas laboratoriais, receção e triagem de amostras, preparação de reagentes, execução de bandas, arquivos de amostras, extração e quantificação de DNA.

No decorrer deste estágio tive a oportunidade de orientar 10 alunos no Projeto Ciência Viva realizado no Laboratório de Genética do CHTMAD, durante os meses de Julho e Agosto e participei ainda no projeto de implementação da metodologia de Sequenciação de Nova Geração (NGS) em Oncologia, em Agosto de 2021.



## **Capítulo 3 | Materiais e Métodos**



O objetivo do Laboratório de Genética do CHTMAD é realizar a análise por citogenética convencional, citogenética molecular e genética molecular em diferentes tipos de amostras. Todo o procedimento está bem definido pelo Laboratório e consiste em receber as amostras, triar e dar entrada das mesmas no sistema informático do hospital (*Clindata*), associando-as a um número do Laboratório de Genética - GE e a um número interno consoante o tipo de amostra. As técnicas de diagnóstico são executadas com base no solicitado pelo clínico e estão descritas na folha de colheita de cada amostra. O Laboratório valida os resultados consoante os seus critérios de validação, elabora e disponibiliza o respetivo relatório que é enviado ao médico.

Neste relatório de estágio foram realizadas, em aproximadamente 200 amostras, as técnicas mencionadas e posteriormente selecionadas 53 dessas amostras anonimizadas de indivíduos com diferentes tipos de leucemia: LMC, SMD, LMA, LLC, MM e LF, 33 de medula óssea (MO) e 20 de sangue periférico (SP) cuja análise citogenética está representada nas tabelas a seguir representadas.

Para a análise citogenética foram aplicados diferentes tipos de cultura celular consoante o tipo de Leucemia, 33 culturas celulares diretas e sincronizadas e 16 culturas com estimuladores. Nas 4 amostras restantes não foi realizada cultura celular uma vez que era apenas solicitada a análise por citogenética molecular sendo realizada unicamente a técnica de FISH em linfócitos não cultivados (LNC) (Anexo I). Na totalidade das amostras (n=53), foi realizada a técnica de FISH, sendo que, em 35 destas foi efetuada, cumulativamente, a análise por citogenética convencional, o bandagem GTL (Tabela 10).

**Tabela 10 | Tipo de Leucemia, amostra, cultura e análise citogenética no total de amostras**

Tipo Leucemia	Amostra	Tipo de amostra	Tipo de cultura	Protocolo efetuado	
				Citogenética Convencional	FISH
LMC	1	SP	-	-	✓
	2	SP	-	-	✓
	3	SP	-	-	✓
	4	MO	Direta	✓	✓
	5	SP	-	-	✓
	6	MO	Direta	✓	✓
	7	MO	Direta	✓	✓
	8	MO	Direta	✓	✓
	9	MO	Direta	✓	✓
	10	MO	Direta	✓	✓
SMD	11	MO	Direta	✓	✓

	12	MO	Direta	✓	✓
	13	MO	Direta	✓	✓
	14	MO	Direta	✓	✓
	15	MO	Direta	✓	✓
	16	MO	Direta	✓	✓
	17	MO	Direta	✓	✓
	18	MO	Direta	✓	✓
	19	MO	Direta	✓	✓
	20	SP	Direta	-	✓
<b>LMA</b>	21	MO	Direta	✓	✓
	22	SP	Direta	✓	✓
	23	MO	Direta	✓	✓
	24	MO	Direta	✓	✓
	25	MO	Direta	✓	✓
	26	MO	Direta	✓	✓
	27	SP	Direta	✓	✓
<b>LLC</b>	28	MO	Estimuladores	✓	✓
	29	SP	Estimuladores	-	✓
	30	SP	Estimuladores	-	✓
	31	SP	Estimuladores	-	✓
	32	SP	Estimuladores	-	✓
	33	MO	Estimuladores	-	✓
	34	SP	Estimuladores	✓	✓
	35	SP	Estimuladores	-	✓
	36	SP	Estimuladores	-	✓
	37	SP	Estimuladores	-	✓
<b>MM</b>	38	MO	Direta	✓	✓
	39	MO	Direta	✓	✓
	40	MO	Direta	✓	✓
	41	MO	Direta	✓	✓
	42	SP	Direta	-	✓
	43	MO	Direta	✓	✓
	44	MO	Direta	✓	✓
	45	MO	Direta	✓	✓
	46	MO	Direta	✓	✓
	47	SP	Direta	-	✓
<b>LF</b>	48	MO	Estimuladores	✓	✓
	49	SP	Estimuladores	-	✓
	50	MO	Estimuladores	✓	✓
	51	SP	Estimuladores	-	✓
	52	MO	Estimuladores	✓	✓
	53	SP	Estimuladores	-	✓

## **1 | Material Biológico**

As amostras utilizadas no decorrer deste estágio nas quais foram aplicadas as diferentes técnicas citogenéticas consistiram em amostras anonimizadas e excedentárias. O material biológico de cada indivíduo era recolhido para tubos de heparina e enviado para o Laboratório de Genética do CHTMAD onde eram posteriormente identificados e semeados ou armazenados consoante o tipo de leucemia.

## **2 | Citogenética Convencional**

O procedimento do estudo citogenético convencional, apesar de variar consoante o tipo de amostra, na generalidade inclui: colheita e identificação das amostras, estabelecimento e manutenção da cultura, manipulação celular, bandagem e análise cromossómica (11).

### **2.1 | Culturas Celulares**

O estudo dos cromossomas usando técnicas de citogenética convencional requer células em divisão ativa e manipulação para obtenção de cromossomas metafásicos tanto em culturas diretas como em células estimuladas para se dividirem aquando a cultura (11, 13).

As culturas de células hemato-oncológicas devem ser realizadas em condições rigorosas de assepsia para evitar a contaminação da amostra e, conseqüentemente, devem cumprir requisitos como o nível de CO<sub>2</sub> de 5% para manutenção do pH entre 7,2 a 7,4, humidade de 97%, culturas de suspensão e um sistema aberto para permitir trocas gasosas com o meio envolvente (13).

Para amostras de leucemia, no Laboratório de Genética do CHTMAD, as culturas consistem na sementeira de uma pequena quantidade de amostra, entre 3 a 6 gotas de SP ou MO no meio de cultura. São usados dois meios de cultura básicos (para assegurar a qualidade e a obtenção de um resultado) aos quais são adicionados soro vitelo fetal e L-glutamina, antibióticos, estimuladores mitóticos e fatores de crescimento.

Consoante a informação clínica de cada amostra é realizada uma cultura celular direta ou com estimuladores (Tabela 11).

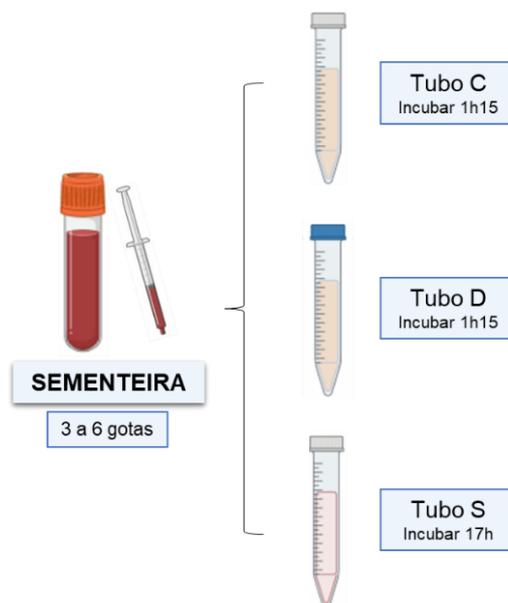
**Tabela 11 | Indicação clínica e tipo de culturas realizadas**

Indicação clínica	Tipo de cultura
Leucocitose	Cultura direta D e C Cultura sincronizada S
Pancitopenia	
GMSI	
Leucemia Mielóide Crónica	
Trombocitose	
Bicitopenia	
Leucemia Mielóide Aguda	
Síndrome Mielodisplásico	
Eosinofilia	
Policitemia Vera	
Anemia	
Mieloma	
Leucemia Linfática Crónica	
Prolinfocítica	
Linfocitose	
Linfomas	
Leucemia Linfática aguda	

IL2 - interleukin 2; DSP30 - CpG-oligonucleotide; TPA - 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

### 2.1.1 | Culturas Diretas

A cultura direta tem como objetivo a visualização de células em divisão espontânea. Consiste na sementeira da amostra sendo usadas 6 gotas de sangue no caso da amostra ser SP e 3 a 6 gotas de MO, dependendo da viscosidade da mesma. São efetuadas 3 culturas em suspensão: duas culturas diretas com 1h15 de incubação, tubo C e tubo D que diferem no lote do meio *K-max* (*Karyomax*) e o tubo S, cultura sincronizada, com 17h de incubação em meio *RPMI1640*. (Anexo II) (Figura 8).



**Figura 8 | Culturas celulares diretas e sincronizadas** - sementeira e tempo de incubação.

### 2.1.1.1 | Sincronização

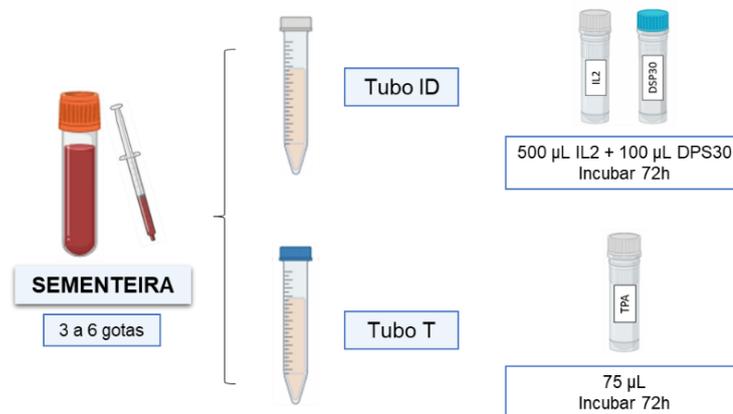
A sincronização celular é um procedimento iniciado aquando da cultura direta, no tubo S, de forma a que as células que se encontram em divisão fiquem estabilizadas numa fase do ciclo celular e reiniciem o ciclo de forma sincronizada obtendo assim um elevado número de células em metáfase. Deste modo, é adicionado metotrexato (MTX) que vai induzir a paragem e, conseqüentemente, acumulação das células na fase G1/S. A timidina é adicionada passadas 17h para que as células interrompidas em G1/S iniciem, novamente, o seu ciclo celular (13).

### 2.1.2 | Culturas com estimuladores

A cultura com estimuladores tem como objetivo estimular os linfócitos B que não se encontram em divisão ativa. A IL2 (interleukin 2) é conjugada com DSP30 (CpG-oligonucleotide) e são responsáveis pela proliferação dos linfócitos B pela redução da apoptose celular enquanto que o TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) é utilizado para a estimulação mitogénica (13).

Na sementeira da amostra são usadas 3 a 6 gotas de MO, consoante a viscosidade. São efetuadas 2 culturas em suspensão com meio k-max: tubo ID e tubo T com 72h de

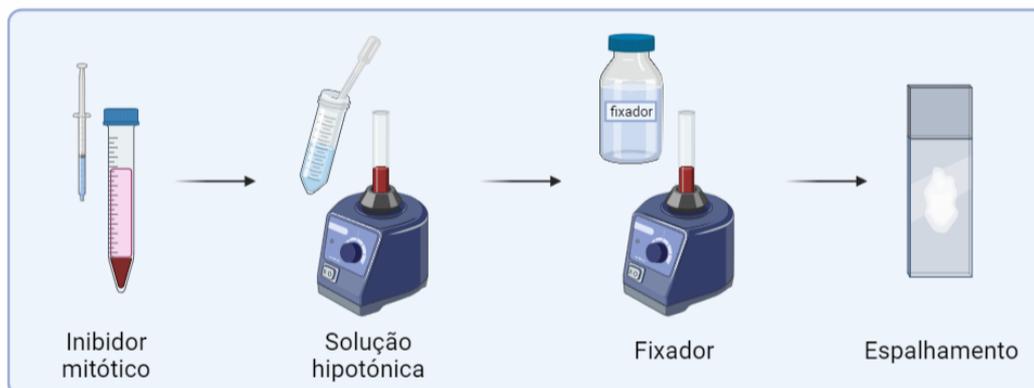
incubação. À cultura ID são adicionados estimuladores, nomeadamente IL2 conjugada com DSP30 e à cultura T é adicionado TPA (Anexo III) (Figura 9).



**Figura 9 | Culturas celulares com estimuladores** - sementeira e tempo de incubação.

## 2.2 | Manipulação Celular

A paragem do ciclo celular quer de células em divisão espontânea quer em divisão sincronizada é crucial para a identificação e análise dos cromossomas. Assim, a manipulação celular consiste na paragem das células em metáfase, tratamento hipotónico, fixação e espalhamento para posterior bandagem e análise (Figura 10) (11).



**Figura 10 | Representação esquemática do processo de manipulação celular.** Adaptado de (11). Ilustração criada no site *BioRender*.

### 2.2.1 | Colcemide

O colcemide é um inibidor mitótico utilizado no decorrer da cultura com as células em divisão que vai impedir a formação do fuso acromático e, conseqüentemente, a separação dos cromátídeos irmãos na anáfase, interrompendo o ciclo celular em

metáfase. Uma maior exposição a esta solução possibilita, por um lado, um maior número de metafases mas, por outro lado, vai encurtar os cromossomas, ficando mais condensados. Aquando a adição deste inibidor mitótico é necessário ter em consideração o tipo de amostra de células em cultura (SP ou MO), tipo de cultura (direta e sincronizada ou com estimuladores), tipo de leucemia e estado da doença (11, 13) (Tabela 12).

**Tabela 12 | Quantidade e tempo de exposição ao colcemide consoante o tipo de cultura**

Tipo de cultura	Tubos de cultura	Quantidade	Tempo de exposição
Direta e sincronizada	C	3 gotas	1h15min
	D	3 gotas	30min
	S	2 gotas	20min
Estimuladores	ID e T	1 gota	17h

### 2.2.2 | Solução hipotónica

O tratamento hipotónico é realizado após exposição ao colcemide. A solução hipotónica por ter uma concentração salina inferior ao citoplasma celular é pré-aquecida a 37°C facilitando a entrada da água, via osmose, nas células, turgindo-as. Esta é uma etapa fundamental para o correto espalhamento dos cromossomas permitindo uma menor sobreposição, melhor visualização e análise dos mesmos. O tempo de exposição à solução hipotónica, solução de cloreto de potássio (KCl), é crítico, dado que um elevado tempo de exposição vai provocar a lise das células e um reduzido tempo de exposição não vai turgir as células resultando num espalhamento de baixa qualidade (11, 13).

O tempo de exposição e concentração da solução hipotónica utilizados neste trabalho variou consoante o tipo de cultura. Nas culturas diretas (tubo C e D) bem como na cultura com estimuladores (tubo ID e T) o tempo de exposição é de 15 minutos e a concentração 0,0075M. Na cultura sincronizada a concentração da solução hipotónica é de 0,06M e o tempo de exposição 20 minutos.

### 2.2.3 | Fixador

A solução de fixador é composta por metanol absoluto e ácido acético glacial e é utilizada para parar a ação da solução hipotônica pela remoção de água das células, precipitando e desnaturando proteínas e ácidos nucleicos (as membranas e a cromatina ficam mais endurecidas) melhorando assim a morfologia dos cromossomas. É utilizada numa proporção 3:1, 3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético, preparada de fresco e armazenada no frio aquando da sua adição às células. São efetuadas 3 lavagens com o fixador: a primeira adição deve ser feita sob agitação do vortex, lentamente, para que não haja a formação de coágulos e perda de células metafásicas, e as duas restantes podem ser adicionadas mais rapidamente uma vez que as células já se encontram fixadas (11).

### 2.2.4 | Espalhamento

O espalhamento é a última etapa da manipulação celular e consiste em colocar duas gotas de suspensão celular (10µL cada) numa lâmina para posterior coloração e análise. Esta etapa é muito importante uma vez que um bom espalhamento vai permitir uma boa análise cromossómica com metafases suficientes, bem espalhadas pela lâmina e com pouca sobreposição cromossómica e desprovidas de citoplasma. Para isso é necessário ter em conta alguns fatores como a humidade, temperatura e tempo de duração da evaporação (11).

Quando o fixador começa a espalhar-se e a evaporar as células entram em contacto com a lâmina, rebentam, e os cromossomas ficam espalhados. Posteriormente, as lâminas são postas numa placa de aquecimento a 60°C e visualizadas num microscópio de contraste de fases para a análise da qualidade do espalhamento. As lâminas são então colocadas, durante a noite, numa estufa à mesma temperatura até à bandagem.

## 2.3 | Técnica de bandagem GTL

Na bandagem GTL é utilizada uma enzima proteolítica, a tripsina, que vai digerir os cromossomas, desnaturando as proteínas cromossómicas e, assim, permitir a distinção das diferentes bandas cromossómicas através da coloração com corante de *Leishman*. É obtido um padrão alternado de bandas escuras e bandas claras ao longo do comprimento dos cromossomas permitindo a sua identificação. As bandas escuras

contêm DNA rico em adenina-timina, que correspondem a regiões de heterocromatina enquanto as bandas claras são ricas em guanina-citosina que correspondem a regiões ricas em genes. O tempo de exposição à tripsina é um fator crucial uma vez que uma elevada exposição vai proporcionar um padrão de bandas demasiado translúcido e pouco tempo de exposição a bandas demasiado escuras e indistinguíveis (91).

Após a exposição à tripsina as lâminas são cuidadosamente lavadas em solução salina e tampão GURR, coradas, e novamente lavadas em tampão GURR e água destilada como descrito no protocolo do laboratório (Anexo IV).

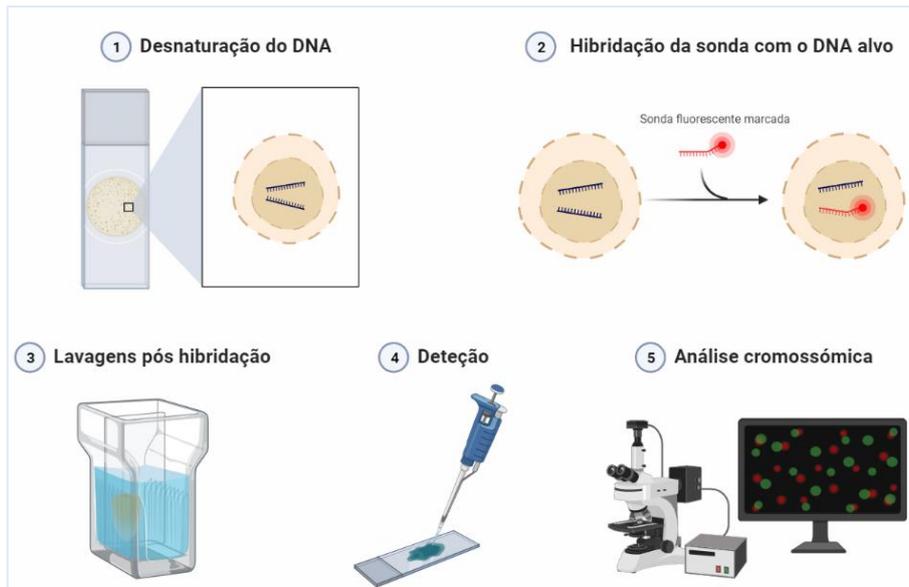
## **2.4 | Análise microscópia**

Após a bandagem, as lâminas são analisadas num microscópio de campo claro (*Leica DM4000B*) e as metafases captadas pelo sistema de análise de imagem computadorizado, *Cytovision*. Após a captação de, pelo menos 20 metafases, os cromossomas são organizados em kariogramas e analisados.

## **3 | Citogenética Molecular – FISH**

A técnica de FISH permite, através da hibridação de uma sequência de DNA alvo com uma sonda marcada com fluorescência, a deteção de regiões específicas do DNA e a análise interfásica ou metafásica de alterações cromossómicas numéricas ou estruturais (19).

O procedimento do estudo por citogenética molecular, mais precisamente pela técnica de FISH, inclui o envelhecimento das lâminas, desnaturação do DNA, hibridação da sonda com o DNA alvo, lavagens pós hibridação, deteção ou contraste e a análise cromossómica (Figura 11) (Anexo V).



**Figura 11 | Representação esquemática da técnica de FISH.** Adaptado de (11). Ilustração criada no site *BioRender*.

### 3.1 | Espalhamento e Envelhecimento das amostras

O espalhamento deve ter as condições ideais de umidade e temperatura uma vez que a concentração de núcleos interfásicos, na lâmina, vai influenciar a acumulação de sinais e a hibridação da sonda com o DNA alvo (13).

Após o espalhamento, as lâminas são colocadas numa placa de aquecimento a 60°C durante, pelo menos, 15 minutos, a envelhecer, com o objetivo de obter uma melhor morfologia e marcação da sonda.

### 3.2 | Preparação das sondas

São utilizadas sondas consoante o tipo de leucemia (Tabela 13). Estas estão conservadas a -20°C e são descongeladas aproximadamente 15min antes da sua utilização.

**Tabela 13 | Painel de sondas para as anomalias citogenéticas consoante o tipo de leucemia**

<b>Tipo de Leucemia</b>	<b>Painel de sondas</b>
<b>Leucemia mielóide crónica</b>	t(9;22)
<b>Síndrome mielodisplásico</b>	del5q; del7q; +8; del20q
<b>Leucemia mielóide aguda</b>	t(15;17); inv(16)
<b>Leucemia linfática crónica</b>	+12; del13q; del11q; del17p
<b>Mieloma múltiplo</b>	del13q; del17p; t(4;14); t(11;14)
<b>Linfoma folicular</b>	t(14;18)

### **3.3 | Desnaturação da sonda e do DNA alvo**

A desnaturação da sonda juntamente com o DNA alvo é denominada codesnaturação e consiste em colocar, aproximadamente, 3 $\mu$ L da sonda sob a suspensão celular na lâmina previamente espalhada e envelhecida. Seguidamente é colocada uma lamela e cola para evitar a sua evaporação. A lâmina é, posteriormente, colocada sob uma placa de aquecimento com tempo e temperatura variáveis consoante a casa comercial de cada sonda, *Leica* (5 min, 80°C) ou *Zytovision* (10 min, 75°C).

### **3.4 | Hibridação**

Uma vez desnaturadas, ocorre a hibridação cujo objetivo é a ligação da sonda ao DNA alvo da amostra, consoante a sua complementaridade. Assim, as lâminas são colocadas numa câmara húmida e escura durante a noite a 37°C.

### **3.5 | Lavagens pós-hibridação**

Após a hibridação, e de forma a evitar sinais inespecíficos e remover o excesso de sonda que não se ligou ao DNA alvo da amostra, são feitas lavagens em soluções de diferentes concentrações, temperaturas e tempo, consoante a casa comercial da sonda.

### **3.6 | Contraste**

Após as lavagens e a secagem da lâmina durante 2 minutos, é feita a detecção com o objetivo de criar um contraste entre o sinal da sonda e o complemento cromossômico. Assim, vai possibilitar a análise da hibridação entre sonda e o DNA da amostra, sendo a cor do contraste, DAPI (diamidino-2-phenylindole) diferente da de fluorescência, permitindo a detecção do sinal. São adicionados, aproximadamente, 4µL de DAPI sobre a lâmina, esta é coberta por uma lamela e colocada numa caixa de alumínio a 4°C durante, pelo menos, 15 minutos, até à sua análise.

### **3.7 | Análise microscópica**

A análise microscópica e contagem de sinais da hibridação da sonda com o DNA alvo é realizada num microscópio de epifluorescência, num lugar resguardado da luz. Para cada sonda são analisados 200 núcleos pelo geneticista clínico laboratorial. Os núcleos analisados para cada sonda são captados no microscópio através do sistema *Cytovision*.

## **Capítulo 4 | Resultados e Discussão**



## 1 | Caracterização das amostras

No presente relatório de estágio foram selecionadas 53 amostras anonimizadas e excedentárias com suspeita de neoplasia hematológica. Destas, 29 amostras (55%) revelaram a presença de alterações citogenéticas características de neoplasias hematológicas e em 24 amostras (45%) não foi detetada nenhuma alteração cromossômica, tendo sido obtido um resultado normal (Figura 12).

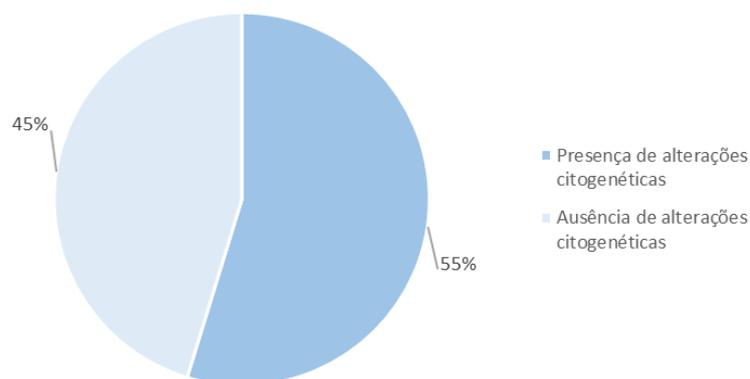


Figura 12 | Representação do resultado citogenético das amostras com anomalias citogenéticas

### 1.1 | Idade

No presente relatório de estágio foram selecionadas 53 amostras de indivíduos, sendo a idade mínima de 22 anos e a idade máxima de 88 anos. A faixa etária dos 71 aos 80 anos apresenta uma maior frequência, representando 30% das amostras (16 amostras) enquanto que apenas 4 indivíduos têm idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos, correspondendo a 8% (Figura 13).

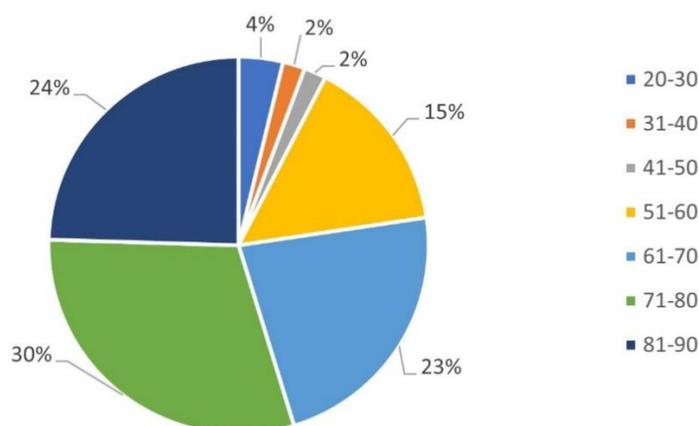


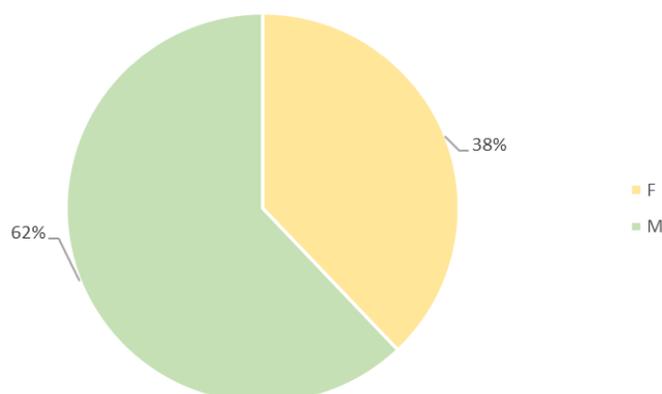
Figura 13 | Representação da idade categorizada dos 53 indivíduos analisados.

Quando efetuada a análise estatística para os indivíduos com alterações citogenéticas características de neoplasias hematológicas e resultado FISH positivo, num total de 29 casos, a média de idades é de 67 anos, e a categoria que apresenta um maior número de casos, 9 amostras, é dos 61 aos 70 anos.

O Laboratório de Genética do CHTMAD recebe, diariamente, amostras hematológicas de Lamego, Chaves e Vila Real, regiões caracterizadas por populações mais envelhecidas. No entanto, e apesar da baixa amostragem, a média de idades de 67 anos está de acordo com o descrito na literatura de uma idade média ao diagnóstico de 65 anos (24, 25).

## 1.2 | Sexo

No presente relatório de estágio das 29 amostras de indivíduos com resultado citogenético característico de neoplasia hematológica, 62% correspondem ao sexo masculino (18 amostras) e 38% ao sexo feminino (11 amostras). Estes resultados, apesar da baixa amostragem, corroboram com a literatura que indica uma maior incidência de casos no sexo masculino (Figura 14).



**Figura 14 | Representação do sexo dos indivíduos nas 29 amostras com anomalias cromossómicas características de neoplasia hematológica.**

## 1.3 | Análise citogenética

Nas diferentes amostras foram realizadas técnicas de citogenética convencional, culturas celulares e bandagem GTL. Foram efetuados diferentes tipos de cultura celular consoante o tipo de leucemia com o objetivo de obter cromossomas metafásicos, realizar bandagem, captação de imagens para posterior organização e montagem de cariogramas no sistema de análise computadorizado. Foram realizadas 33 culturas

celulares diretas e sincronizadas e 16 culturas com estimuladores (5 culturas com TPA e 16 culturas com IL2+DSP30).

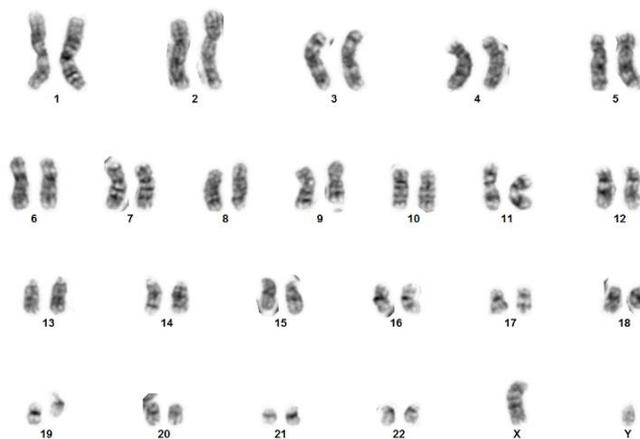
Nas culturas diretas as células encontram-se em diferentes fases do ciclo celular, razão pela qual o número e qualidade de metafases nesta cultura ser mais reduzida. Estas culturas apresentam a vantagem de ser possível em, aproximadamente, 24h fazer a análise e reportar o resultado para auxiliar o clínico na decisão terapêutica, no entanto e uma vez que as células se encontram em divisão espontânea em diferentes fases do ciclo celular, pode não ser possível a obtenção de metafases com resolução.

A cultura sincronizada é crucial nestes casos para a obtenção de metafases com melhor resolução. Nas culturas celulares sincronizadas, por adição do bloqueador do ciclo celular, MTX, dá-se a acumulação das células na fase G1/S, permitindo a sua sincronização e a obtenção de um maior número de metafases nesta cultura, com cromossomas mais distendidos e resolução de bandas superior (Figura 15).



**Figura 15 | Cariótipos com bandas GTL de um indivíduo do sexo feminino sem alterações cromossômicas (46,XX). a) cultura direta; b) cultura sincronizada mostrando uma resolução de bandas superior.**

Do mesmo modo, na cultura com estimuladores as células vão progredir no ciclo celular e vão ser estimuladas, aumentando o seu índice mitótico e permitindo uma maior resolução de bandas e alongamento dos cromossomas. No entanto, com esta metodologia, a análise cromossômica só é possível 96h após a entrada da amostra, sendo a emissão de resultados mais tardia relativamente às outras leucemias (Figura 16).



**Figura 16 | Cariótipo com bandas GTL resultante de uma cultura com estimuladores** pertencente a um indivíduo do sexo masculino com suspeita de LLC, sem alterações cromossômicas (46,XY).

Na técnica de bandagem o tempo de tripsina é crucial para uma boa coloração e para um padrão alternado de bandas escuras e bandas claras ao longo dos cromossomas permitindo a sua identificação (Figura 17).



**Figura 17 | Metáfase com bandagem GTL** apresentando um bom espalhamento e boa qualidade de tempo de exposição à tripsina num indivíduo com suspeita de mieloma múltiplo.

Para que seja considerada a existência de um clone é necessária a identificação de no mínimo, 2 metafases com a mesma alteração de estrutura e 3 metafases com a mesma alteração numérica. São observadas e analisadas, sempre que possível e dos diferentes tubos de cultura, 20 metafases por amostra.

A técnica de FISH tem vantagens pela sua rápida execução, capacidade da detecção de rearranjos (como pequenas deleções e translocações) que a citogenética

convencional não consegue detetar e o facto de não necessitar de células em divisão uma vez que é realizada em núcleos interfásicos. *Guidelines* indicam que um resultado citogenético pode ser considerado positivo quando a percentagem de núcleos interfásicos com a anomalia é igual ou superior a 10% (92).

No presente trabalho a análise por citogenética molecular foi efetuada no total de 53 amostras, 35 das quais foram efetuadas culturas celulares (33 diretas e 16 com estimuladores). Foram analisados pelo geneticista clínico laboratorial ao microscópio de fluorescência 200 núcleos interfásicos para cada sonda utilizada em cada amostra.

## **2 | Neoplasias mielóides**

Neste trabalho foram selecionadas 27 amostras com suspeita de neoplasia mielóide, entre elas, 10 amostras de leucemia mielóide crónica, 10 amostras de síndrome mielodisplásico e 7 amostras com suspeita de leucemia aguda.

### **2.1 | Leucemia mielóide crónica**

Foram selecionadas 10 amostras de indivíduos com indicação clínica de LMC (leucocitose, trombocitose, anemia, etc). Nestas, foram feitas 6 culturas diretas em MO e não foi realizada cultura celular nas restantes 4 amostras de SP. Uma vez que estes indivíduos apresentam anemia é usual que o clínico não solicite a análise por citogenética convencional sendo mais frequentemente realizada a técnica de FISH em núcleos interfásicos de linfócitos não cultivados, permitindo que a emissão de resultados seja mais rápida uma vez que não é efetuada cultura celular.

Em 6 amostras foi detetada a translocação entre o cromossoma 9 e o cromossoma 22 (amostras nº 2, 3, 5, 6, 9 e 10) por FISH e em 3 destas foi solicitada e realizada a análise por citogenética convencional que confirmou a t(9;22). Nos restantes casos não foram encontradas anomalias citogenéticas (Tabela 14).

**Tabela 14 | Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de leucemia mielóide crônica**

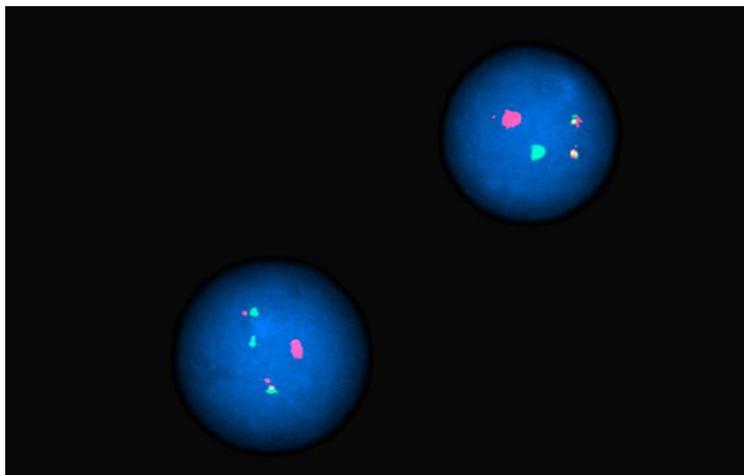
Caso	Idade	Tipo de amostra	Resultado CC	Resultado FISH
1	77	SP	_____	Neg t(9;22)
2	68	SP	_____	Pos t(9;22) (67%)
3	78	SP	_____	Pos t(9;22) (20.5%)
4	58	MO	46,XX[20]	Neg t(9;22)
5	31	SP	_____	Pos t(9;22) (83,5%)
6	68	MO	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Pos t(9;22) (76.5%)
7	87	MO	46,XY[20]	Neg t(9;22)
8	75	MO	46,XY[20]	Neg t(9;22)
9	68	MO	46,XY,t(9;22;16)(q34;q11;p13)[3]/46,XY[17]	Pos t(9;22)
10	45	MO	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[19]/46,XY[1]	Pos t(9;22) (80%)

Nas amostras 6, 9 e 10, foram realizadas culturas diretas e sincronizadas a partir das amostras de medula óssea que revelaram a translocação entre o cromossoma 9 e 22. Particularmente, na amostra nº6 de um indivíduo do sexo masculino com 68 anos, esta translocação foi detetada nas 20 metafases analisadas (Figura 18).



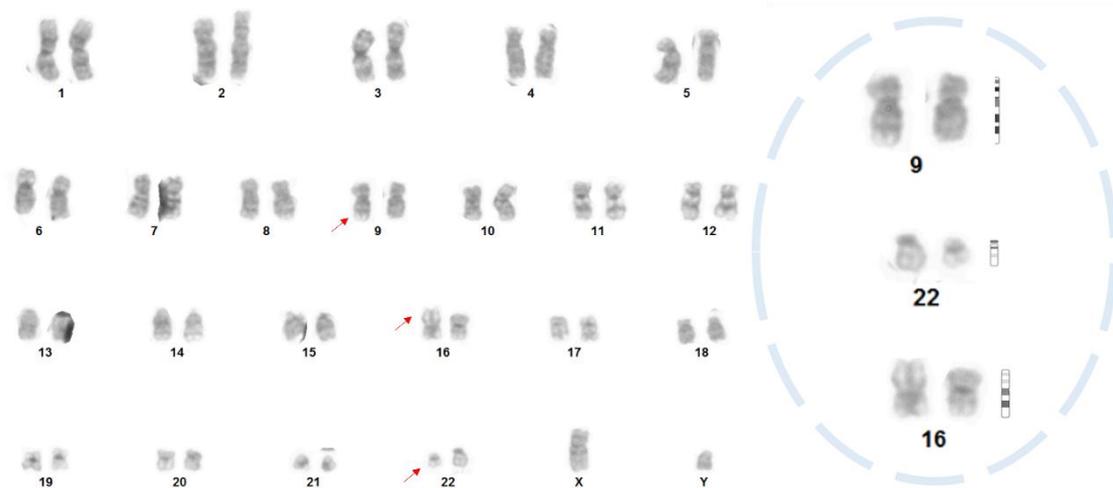
**Figura 18 | Amostra 6 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a t(9;22) representada com setas e esquema representativo do rearranjo com os cromossomos envolvidos e respectivos ideogramas. 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20].**

A análise por FISH com a sonda t(9;22)(ABL1;BCR) confirmou esta translocação em 76,5% dos núcleos interfásicos analisados [153/200] (Figura 19).



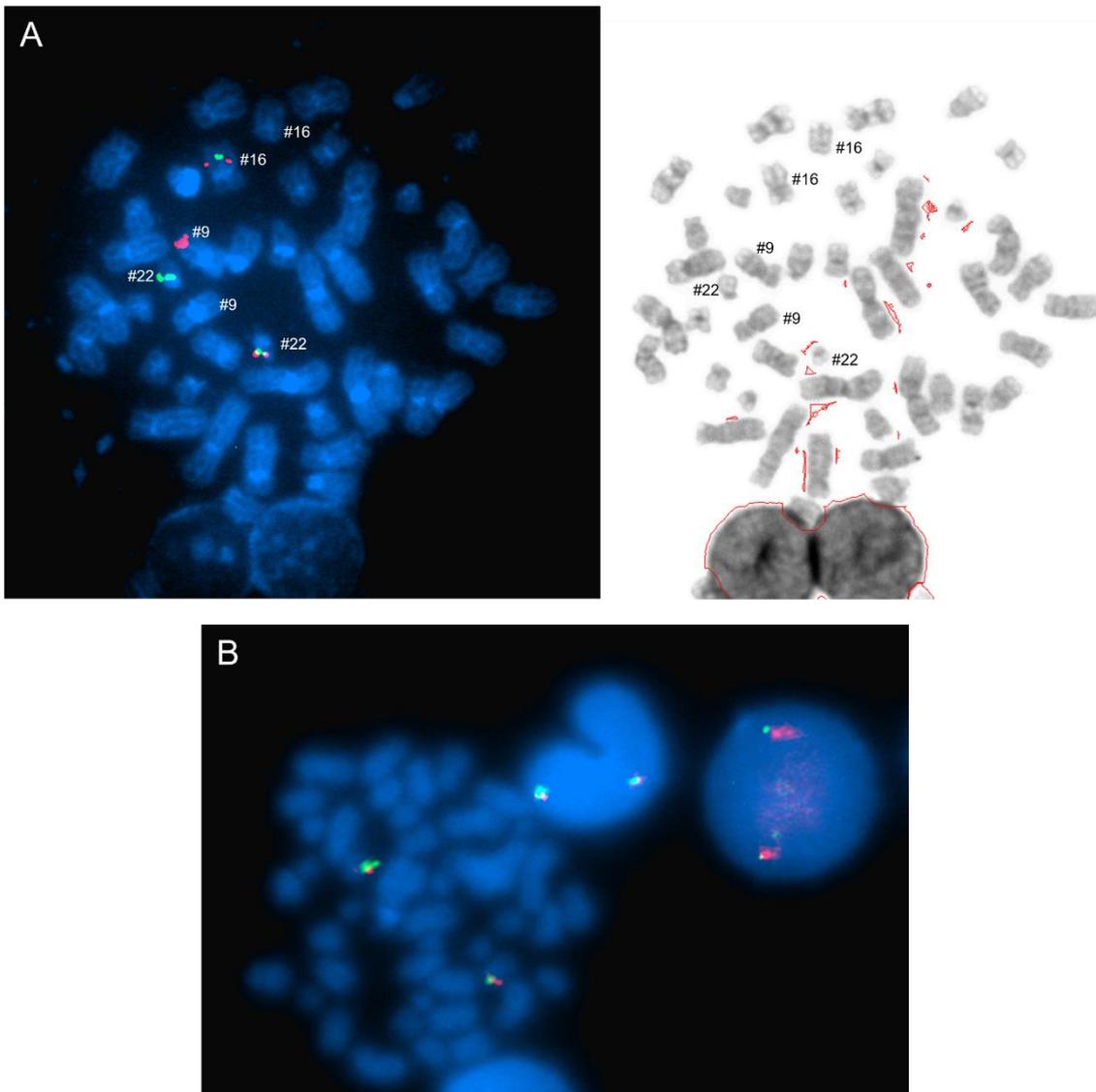
**Figura 19 | Amostra 6 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com a sonda de sequência única para a marcação dos cromossomas 9 (vermelho) e 22 (verde). A translocação é evidenciada pela fusão dos dois sinais (amarelo) nuc ish(ABL1,BCR)x3(ABL1 con BCRx2)[153/200].**

Na amostra nº 9 de um indivíduo do sexo masculino com 68 anos que apresentava suspeita de LMC, a análise por citogenética convencional revelou uma translocação envolvendo os cromossomas 9, 22 e 16. O primeiro evento foi a t(9;22) com a formação do cromossoma Filadelfia e o que estaria no cromossoma 9 foi translocado para a parte terminal do braço curto do cromossoma 16 (16p13). (Figura 20)



**Figura 20 | Amostra 9 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a t(9;22;16) representada com setas e esquema representativo do rearranjo com os cromossomas envolvidos e respetivos ideogramas. 46,XY,t(9;22;16)(q34;q11;p13).**

A técnica de FISH foi realizada com a sonda t(9;22)(ABL1;BCR) tendo sido observados 2 sinais de fusão (Figura 21A) e um padrão normal no cromossoma 16 (pontos de quebra p13 a q22) (Figura 21B).



**Figura 21 | Amostra 9 a) Técnica de FISH em metafase com a sonda de sequência única para a marcação dos cromossomas 9 (vermelho) e 22 (verde). A translocação é evidenciada pela fusão dos dois sinais (amarelo) no cromossoma 22. Os cromossomas envolvidos na translocação estão representados. b) Técnica de FISH em metafase com a sonda para o cromossoma 16 evidenciando a ausência de anomalias citogenéticas.**

Cerca de 95% dos indivíduos com LMC apresentam a  $t(9;22)(q34;q11)$ . Destes, entre 5% a 10% apresentam translocações complexas envolvendo um terceiro cromossoma além dos cromossomas 9 e 22 (93, 94). Apesar de estarem descritos na literatura alguns casos em que o cromossoma 16 está envolvido na  $t(9;22)(q34;q22)$ , apenas foi encontrado um caso que envolvia os mesmos pontos de quebra da nossa amostra. Shu e colaboradores, em 2018, relataram um caso recorrente, complicado e diferenciado de LMC com a  $t(9,22,16)(q34;q11;p13)$  que foi tratado com nilotinib, um inibidor de tirosina quinase de segunda geração. Estes rearranjos no cromossoma 16 afetam o gene *MYH11* localizado em 16p13, uma miosina implicada na migração celular, adesão e com outras funções implicadas na carcinogénese (95-97).

## 2.2 | Síndrome Mielodisplásico

Foram selecionadas 10 amostras com indicação clínica de SMD (anemia, trombocitopenia, pancitopenia, etc). Foram realizadas culturas diretas na totalidade das amostras, em 9 destas foi feita a análise por citogenética convencional e na amostra restante foi realizada apenas a técnica de FISH. Em 6 amostras foram detetadas anomalias associadas ao SMD como a deleção do cromossoma 5 e 20, trissomia do cromossoma 8 e monossomia do cromossoma 7, perda do cromossoma Y e outras anomalias menos comuns (amostras nº 11, 14, 15, 18, 19 e 20) e nas restantes quatro amostras não foram detetadas anomalias citogenéticas (Tabela 15).

**Tabela 15 | Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de síndrome mielodisplásico.**

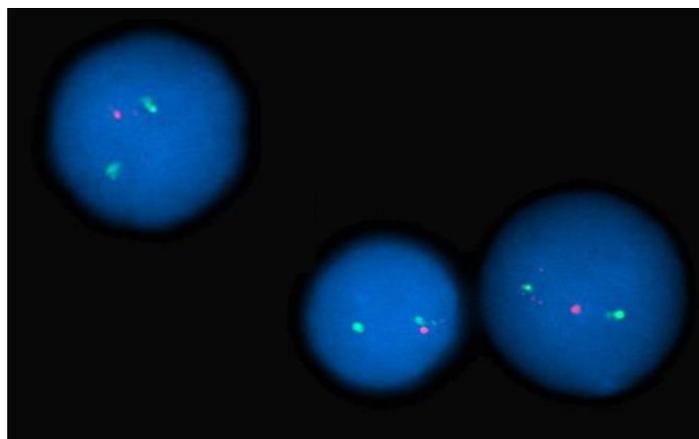
Caso	Idade	Tipo de amostra	Resultado CC	Resultado FISH
11	78	MO	45,X,-Y[8]/46,XY,del(20)(q11.2)[2]/46,XY[10]	Pos #20 (12,5%) neg #5,7,8
12	22	MO	46,XX[20]	Neg #5,7,8,20
13	82	MO	46,XY[20]	Neg #5,7,8,20
14	83	MO	46,XX,del(5)(q12q33)[10]/46,XX[10]	Pos #5 (50%) neg #7,8,20
15	56	MO	46,XY,del(20)(q11.2)[12]/46,XY[8]	Pos #20 (77%) neg #5,7,8
16	75	MO	46,XX[20]	Neg #5,7,8,20
17	70	MO	46,XX[20]	Neg #5,7,8,20
18	85	MO	46,X,-Y,+8,del(11)(q23.3)[10]/46,XY[10]	Pos #8 (13%); neg #5,7,20
19	83	MO	45,XY,-7,t(11;21)(q13;q22)[15]/46,XY[5]	Pos #7 (81%); neg #5,8,20
20	56	SP	_____	Pos #20 (68,5%) neg #5,7,8

Na amostra nº 11 de um indivíduo do sexo masculino com 78 anos foi realizada uma cultura celular a partir da amostra de medula óssea que revelou, em 8 metafases, a perda do cromossoma Y e em 2 metafases a deleção de parte do braço longo do cromossoma 20. No total foram analisadas 20 metafases (Figura 22).



**Figura 22 | Amostra 11 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino. a) perda do cromossoma Y; b) del(20)(q11.2) representada com seta e esquema representativo do rearranjo com o cromossoma envolvido e respetivo ideograma. 45,X,-Y[8]/46,XY,del(20)(q11.2)[2]/46,XY[10].**

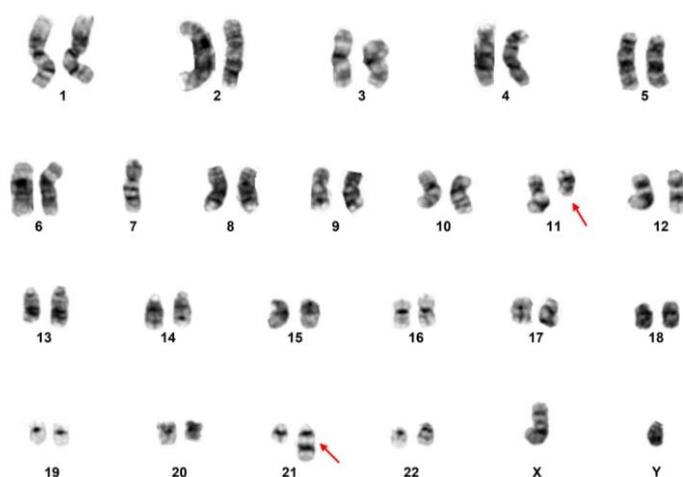
Nesta amostra foi aplicada a técnica de FISH com sondas de sequência única para os cromossomas 5q31 (*EGR1*), 7q31 (*MET*), 20q12 (D20S108) e centromérica para o cromossoma 8 (D8Z2). A análise por FISH revelou um padrão normal para os cromossomas 5, 7 e 8. No cromossoma 20 detetou um sinal em 12,5% dos núcleos analisados (Figura 23).



**Figura 23 | Amostra 11 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com a sonda de sequência única para o cromossoma 20. Foi detetado um sinal para 20q12 (vermelho) e dois sinais para a região controlo (verde). nuc ish(D20S108×1)[25/200],(EGR1,MET,D8Z2)×2[200].**

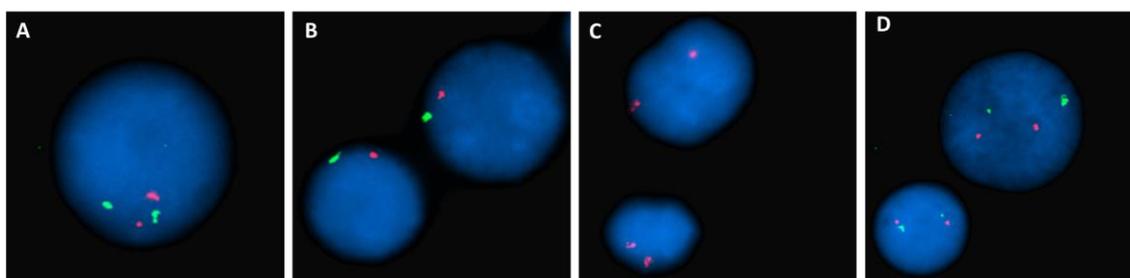
A perda do cromossoma Y está associada com o aumento da idade, no entanto é uma anomalia comum em doentes com SMD e, quando isolada, está associada a um prognóstico muito favorável. A del(20q) está descrita em 5% dos casos de SMD e está associada com um prognóstico menos favorável quando detetada posteriormente, apresentando uma maior progressão para LMA (51).

A amostra nº 19 pertence a um indivíduo do sexo masculino com 83 anos que foi internado com anemia grave, astenia e anorexia e o medulograma revelou 44% de blastos na medula óssea. Apresentava pancitopenia associada ao SMD e foi diagnosticado com LMA juntamente com alterações genéticas de alto risco. Foi realizada a análise por citogenética convencional numa cultura direta e sincronizada a partir da amostra de medula óssea. A análise do cariótipo revelou, em 15 metafases, monossomia do cromossoma 7 e uma translocação recíproca entre os braços longos do cromossoma 11 (q13) e o cromossoma 21 (q22) (Figura 24).



**Figura 24 | Amostra 19 - Cariótipo com bandas GTL, resultante de uma amostra do sexo masculino com monossomia do #7 e com a t(11;21) representada com setas. 45,XY,-7,t(11;21)(q13;q22)[15]/46,XY[5].**

Foi aplicada a técnica de FISH com sondas específicas para SMD. A análise por FISH confirmou, em 81% das células analisadas, a monossomia do cromossoma 7 (figura 25 B) e revelou um padrão normal para os cromossomas 5, 8 e 20 (Figura 25 A, C e D).



**Figura 25 | Amostra 19 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com sondas específicas para SMD. a) dois sinais para 5q31.2 (verde) e para a região controlo (vermelho); b) um sinal para 7q31 (vermelho) e a região controlo (verde); c) dois sinais para o centrómero 8 (vermelho); d) dois sinais para 20q12 (vermelho) e região controlo (verde). nuc ish(MET×1)[162/200],(EGR1,D8Z2,D20S108)×2[200].**

A monossomia do cromossoma 7 é a segunda alteração citogenética mais frequentemente detetada no SMD. A t(11;21)(q13;q22) está descrita na literatura em apenas três casos e, num caso, a translocação foi detetada num doente com leucemia aguda com evolução de SMD, à semelhança deste caso. O gene de fusão (*RUNX1-LRP16*), resultante desta translocação, foi identificado em estudos recentes, confirmando a relevância da sua investigação no mecanismo de leucemogénese, uma vez que o gene de fusão *RUNX1* está descrito como um dos genes mais frequentemente mutados associados à leucemia aguda (51, 53, 98-100).

### 2.3 | Leucemia Mielóide Aguda

Foram selecionadas 7 amostras com indicação clínica de LMA (bicitopenia, anemia, hepatoesplenomegalia, etc). Em todas estas foram realizadas culturas diretas, análise por citogenética convencional e FISH. Em 3 amostras foram detetadas anomalias associadas à LMA como a t(15;17), inv(16) e outras anomalias (amostras nº 21, 23, 27), nas restantes quatro não foram detetadas anomalias citogenéticas (Tabela 16).

**Tabela 16 | Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de leucemia mielóide aguda.**

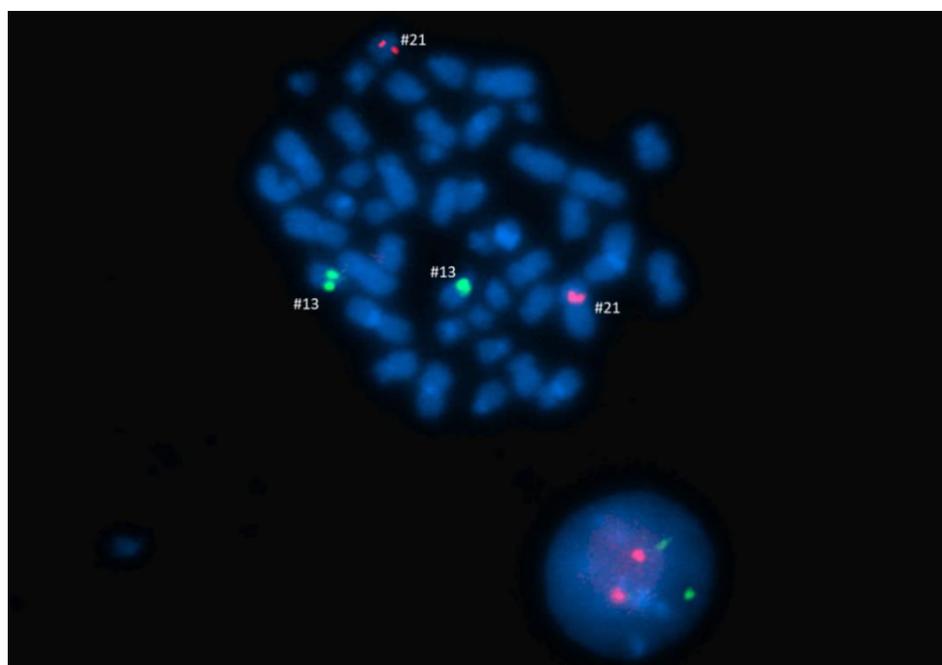
Caso	Idade	Tipo de amostra	Resultado CC	Resultado FISH
21	78	MO	46,XY,t(19;21)(q13.2;q22)[19]/46,XY[1]	Neg t(15;17),inv16
22	87	SP	46,XY[16]	Neg t(15;17),inv16
23	23	MO	46,XY,t(15;17)(q24;q21)[11]/46,XY[3]	Pos t(15;17) (82,5%) neg inv16
24	75	MO	46,XY[20]	Neg t(15;17),inv16
25	76	MO	46,XY[20]	Neg t(15;17),inv16
26	73	MO	46,XX[20]	Neg t(15;17),inv16
27	64	SP	46,XX,inv(16)(p13q22)[7]/46,XX[1]	Pos inv16 (20,5%) neg t(15;17)

No caso nº 21 de um indivíduo do sexo masculino com 78 anos, com a informação clínica de bicitopenia e hepatoesplenomegalia, a cultura celular a partir da amostra de medula óssea revelou, em 19 metafases, a translocação entre parte do braço longo do cromossoma 19 e parte do braço longo do cromossoma 21. No total foram analisadas 20 metafases (Figura 26).



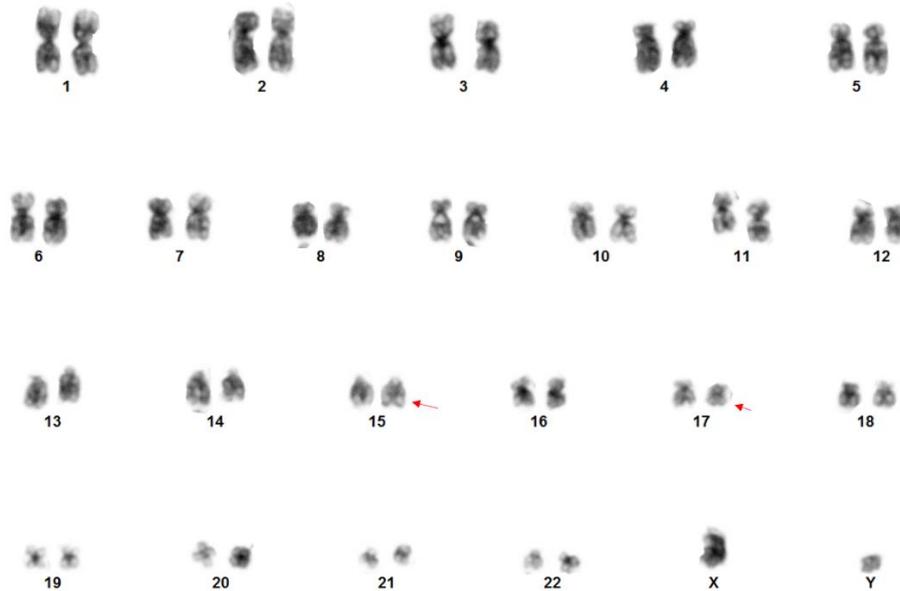
**Figura 26 | Amostra 21 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a t(19;21) representada com setas e esquema representativo do rearranjo com os cromossomos envolvidos e respectivos ideogramas. 46,XY,t(19;21)(q13.2;q22)[19]/46,XY[1].**

Foi aplicada a técnica de FISH com a sonda para a inversão/translocação do cromossoma no cromossoma 16 (*CBFB*) e com a sonda para a t(15;17)(*PML;RARA*). O FISH foi negativo para as anomalias pesquisadas. Foi ainda realizado a técnica de FISH com a sonda do cromossoma 21 envolvendo os pontos de quebra do cromossoma 21 da t(19;21) detetada por citogenética convencional (Figura 27).



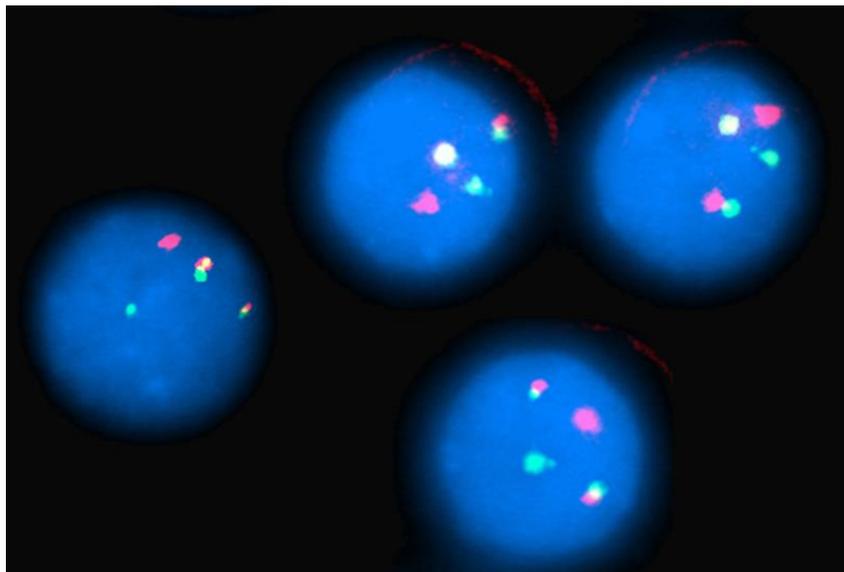
**Figura 27 | Amostra 21 - Técnica de FISH em metafase e núcleo interfásico com a sonda para o cromossoma 21. Foram detetados dois sinais para 21q22 (vermelho) e dois sinais para o cromossoma 13 (verde). nuc ish(D13S1574;D21S1444)×2[200].**

A análise por citogenética convencional da amostra nº 23 de um indivíduo do sexo masculino com 23 anos revelou, em 11 metafases, a translocação entre os cromossomas 15 e 17 (figura 28).



**Figura 28 | Amostra 23 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a t(15;17) representada com setas. 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[11]/46,XY[3].**

A técnica de FISH foi efetuada para o painel de sondas de LMA: sonda para a inversão/translocação do cromossoma no cromossoma 16 (*CBFB*) e sonda para a t(15;17)(*PML;RARA*). O FISH foi positivo para a t(15;17) tendo sido observados 82,5% dos núcleos com dois sinais de fusão, representativos da t(15;17) (Figura 29)



**Figura 29 | Amostra 23 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com a sonda para a t(15;17)(*PML;RARA*). Foram detetados dois sinais de fusão representativos da t(15;17). nuc ish(*PML;RARA*)x3(*PMLconRARA*)x2[165/200].**

A t(15;17)(q24;q21) é uma alteração citogenética comum na LMA que resulta no gene de fusão *PML-RARA* e está associada com um bom prognóstico, quando isolada (60, 64).

A t(19;21)(q13.2;q22) está descrita na literatura em apenas 2 casos, um caso de um indivíduo do sexo masculino com 74 anos diagnosticado com pancitopenia e LMA que esteve exposto a radiação de alto nível proveniente de explosões nucleares durante ou após a Segunda Guerra Mundial e outro caso de LMA com t(19;21)(q13;q22) e eosinofilia de um indivíduo com 58 anos admitido com anemia e temporariamente classificado com síndrome mielodisplásico de significado incerto (101, 102).

Anomalias citogenéticas detetadas em 21q22 podem envolver o gene *RUNX1* e estão associadas com a hematopoiese. As translocações cromossômicas envolvendo este gene estão bem documentadas e têm sido associadas a vários tipos de leucemia, nomeadamente leucemia mielóide aguda (60).

A translocação detetada, na amostra 21, envolve os mesmos pontos de quebra que estão descritos na literatura, com diagnóstico de LMA. Este caso em particular evidencia a importância da análise por citogenética convencional em combinação com a técnica de FISH na deteção de anomalias cromossômicas pouco descritas uma vez que a técnica de FISH teve um resultado negativo para o painel de sondas comumente utilizado na LMA.

### **3 | Neoplasias linfóides**

Neste trabalho foram selecionadas 26 amostras com suspeita de neoplasia linfóide, entre elas, 10 amostras de leucemia linfática crónica, 10 amostras de mieloma múltiplo e 6 amostras com suspeita de linfoma folicular.

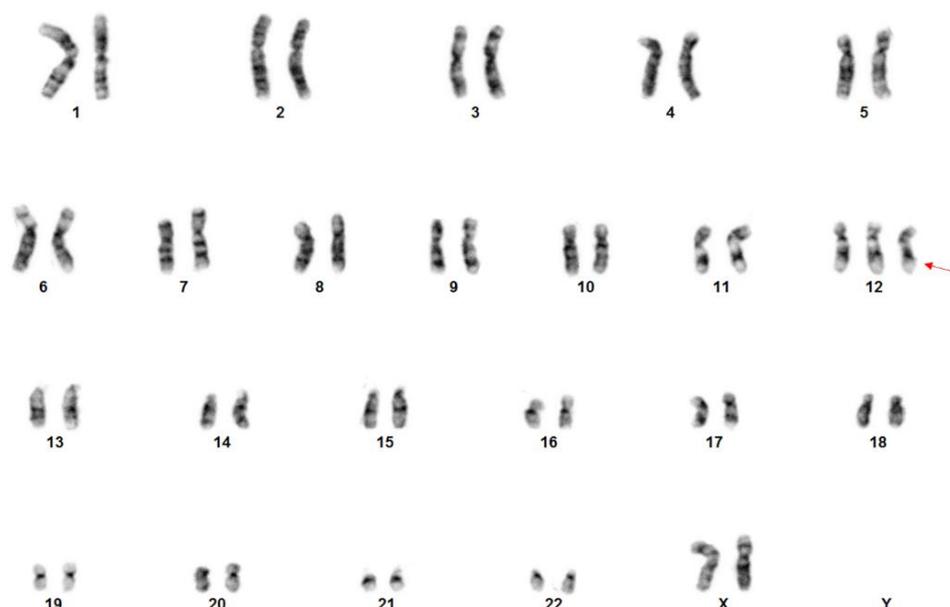
#### **3.1 | Leucemia Linfática Crónica**

Foram selecionadas 10 amostras com indicação clínica de LLC. Na totalidade destas amostras foram feitas culturas com estimuladores, em 2 amostras foi feita a análise por citogenética convencional e a técnica de FISH foi efetuada em todas as amostras. Em 6 amostras foram detetadas anomalias associadas à LLC como a trissomia do cromossoma 12 (em mosaico no caso 28), deleção nos cromossomas 11, 13 e 17 (todos por FISH, casos nº 28, 30, 31, 33, 35 e 36), nos restantes 4 casos não foram detetadas anomalias no cariótipo e no FISH (Tabela 17).

**Tabela 17 | Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de leucemia linfática crônica.**

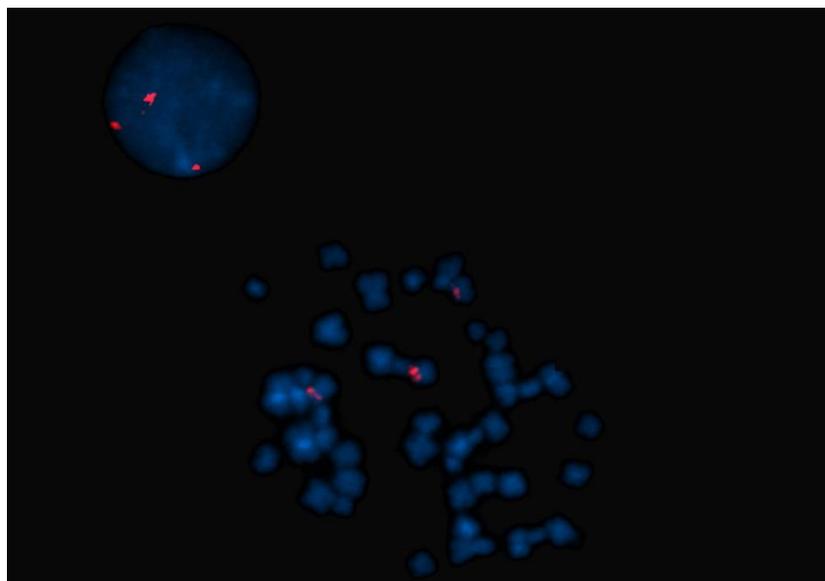
Caso	Idade	Tipo de amostra	Resultado CC	Resultado FISH
28	57	MO	47,XX,+12[15]/46,XX[5]	Pos #12 (53,5%) neg #11,13,17
29	80	SP	_____	Neg #11,12,13,17
30	73	SP	_____	Pos #17 (93%), #13 (63%); neg #11,12
31	68	SP	_____	Pos #13 (91.5%) neg #11,12,17
32	88	SP	_____	Neg #11,12,13,17
33	76	MO	_____	Pos #12 (39%); neg #11,13,17
34	55	SP	46,XX[20]	Neg #11,12,13,17
35	63	SP	_____	Pos #13 (14%); neg #11,12,17
36	65	SP	_____	Pos #17 (70%) neg #11,12,13
37	88	SP	_____	Neg #11,12,13,17

A amostra nº28 de um indivíduo do sexo feminino com 57 anos, apresentava a informação clínica de suspeita de LLC para início de tratamento de quimioterapia. A análise por citogenética convencional revelou, em 15 metafases, a trissomia do cromossoma 12 estando associada a um prognóstico intermédio. No total foram analisadas 20 metafases (Figura 30).



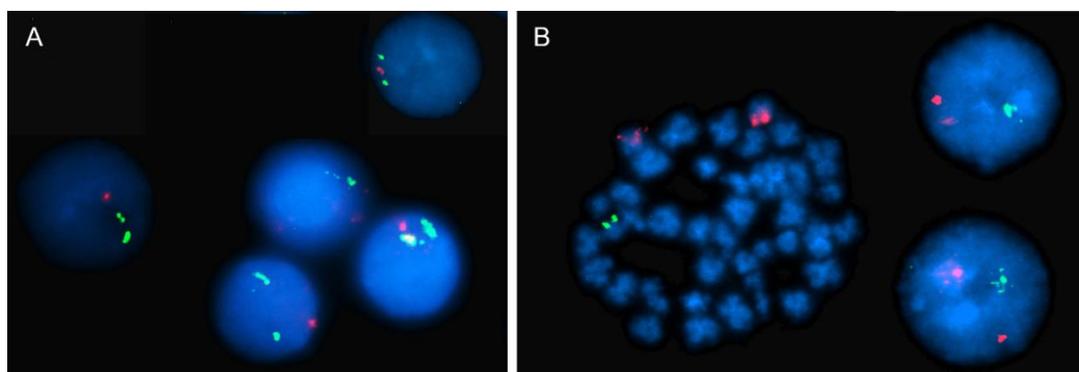
**Figura 30 | Amostra 28 - Cariótipo com bandas GTL, de uma amostra do sexo feminino com trissomia do cromossoma 12, representada com setas. 47,XX,+12[15]/46,XX[5].**

Foi aplicada a técnica de FISH com as sondas de sequência única para a região *ATM* (11q22.3), *RB1* (13q14) e *TP53* (17p13.1) e para a região centromérica do cromossoma 12 (D12Z3). Observaram-se 53,5% dos núcleos com três sinais para a sonda do cromossoma 12 (Figura 31). Para as restantes sondas não foram detetadas anomalias citogenéticas tendo sido obtido um resultado normal. Foram observados 200 núcleos por sonda.



**Figura 31 | Amostra 28 - Técnica de FISH em metafase e núcleo interfásico com a sonda para o cromossoma 12.** Foram detetados três sinais para a sonda centromérica do cromossoma 12 (vermelho).  
nuc ish(D12Z3X3)[107/200],(ATM, RB1, TP53)X2[200].

Na amostra nº30 pertencente a um indivíduo do sexo masculino com 73 anos, com a informação clínica de suspeita de LLC, foi realizada uma cultura com estimuladores. Observou-se, em 93% dos núcleos interfásicos analisados, apenas um sinal para o cromossoma 17 e em 63% dos núcleos, igualmente, 1 sinal para o cromossoma 13. As sondas para os cromossomas 11 e 12 revelaram um resultado normal. Foram observados 200 núcleos por sonda (Figura 32).



**Figura 32 | Amostra 30 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos e metafase com sondas específicas para LLC.** a) um sinal para 13q14 (vermelho) e dois sinais para a região controlo (verde); b) um sinal para 17p13.1 (verde) e dois sinais para 11q22.3, (vermelho).  
nuc ish(RB1x1)[126/200],(TP53x1)[186/200],(ATM,D12Z3)X2[200].

A deleção do braço longo do cromossoma 13, del(13q14) é a alteração citogenética mais comum detetada em LLC e, isoladamente, está associada a um bom prognóstico. Apesar da baixa amostragem, das 6 amostras com resultado positivo para LLC, 3 amostras apresentam um resultado positivo para esta deleção, corroborando com os resultados encontrados na literatura (67, 73).

A deleção do cromossoma 17, del(17p13.1), compromete o gene supressor tumor *TP53* e esta anomalia está associada a um prognóstico desfavorável e é detetada até 30% dos casos com LLC (77). Do mesmo modo esta anomalia citogenética foi detetada em 2 das 6 amostras positivas para LLC.

### 3.2 | Mieloma múltiplo

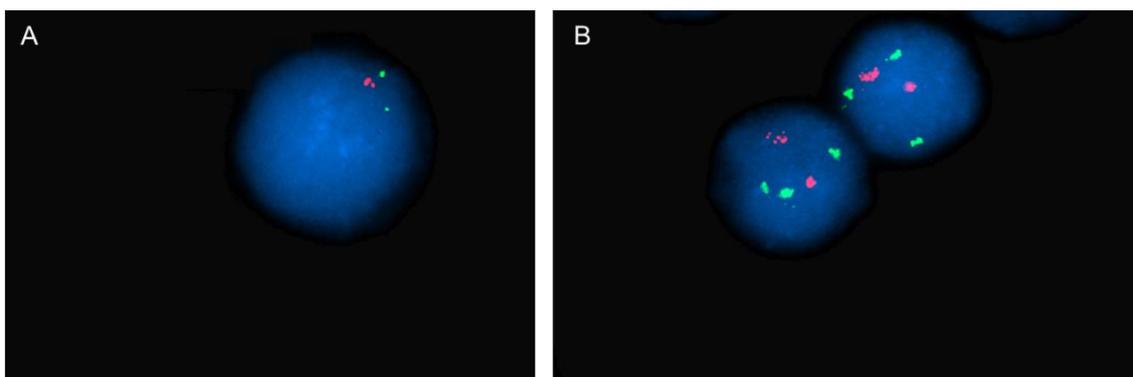
Foram selecionadas 10 amostras com indicação clínica de MM. Na totalidade destas amostras foram efetuadas culturas diretas, em 8 amostras foi feita a análise por citogenética convencional e a técnica de FISH foi efetuada nas 10 amostras. Em 5 amostras foram detetadas anomalias associadas à LLC como a deleção dos cromossomas 13 e 17, translocação (4;14) e translocação (11;14) (casos nº 39, 42, 43 e 47), nos restantes casos não foram detetadas anomalias citogenéticas (Tabela 18).

**Tabela 18 | Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de mieloma múltiplo.**

Caso	Idade	Tipo de amostra	Resultado CC	Resultado FISH
38	81	MO	46,XX[20]	Neg #13,17,t(4;14),t(11;14)
39	69	MO	46,XX[20]	Pos #13 (28.5%), #11 (40.5%) neg #17,t(4;14)
40	79	MO	46,XY[20]	Neg #13,17,t(4;14),t(11;14)
41	64	MO	46,XX[20]	Neg #13,17,t(4;14),t(11;14)
42	80	SP	_____	Pos t(11;14)(17,5%) neg #13,17,t(4;14)
43	54	MO	46,XY,del(13)(q14)[2]/46,XY[18]	Pos #13 (46,5%)
44	84	MO	46,XX[20]	Neg #13,17,t(4;14),t(11;14)
45	75	MO	46,XY[20]	Pos #13 (26%), #11 (23%); neg #17,t(4;14)
46	67	MO	46,XX[20]	Neg #13,17,t(4;14),t(11;14)
47	71	SP	_____	Pos t(11;14) (28,5%), 3 sinais #14 (24,5%), pos #13 (60%), pos #17 ( 37,5%)

A cultura celular na amostra n<sup>o</sup>39 de um indivíduo do sexo feminino com suspeita de MM revelou, nas 20 metafases, um cariótipo normal. No entanto, foram observadas 3 poliploidias de fraca qualidade em que foi possível observar 3 cromossomas 11.

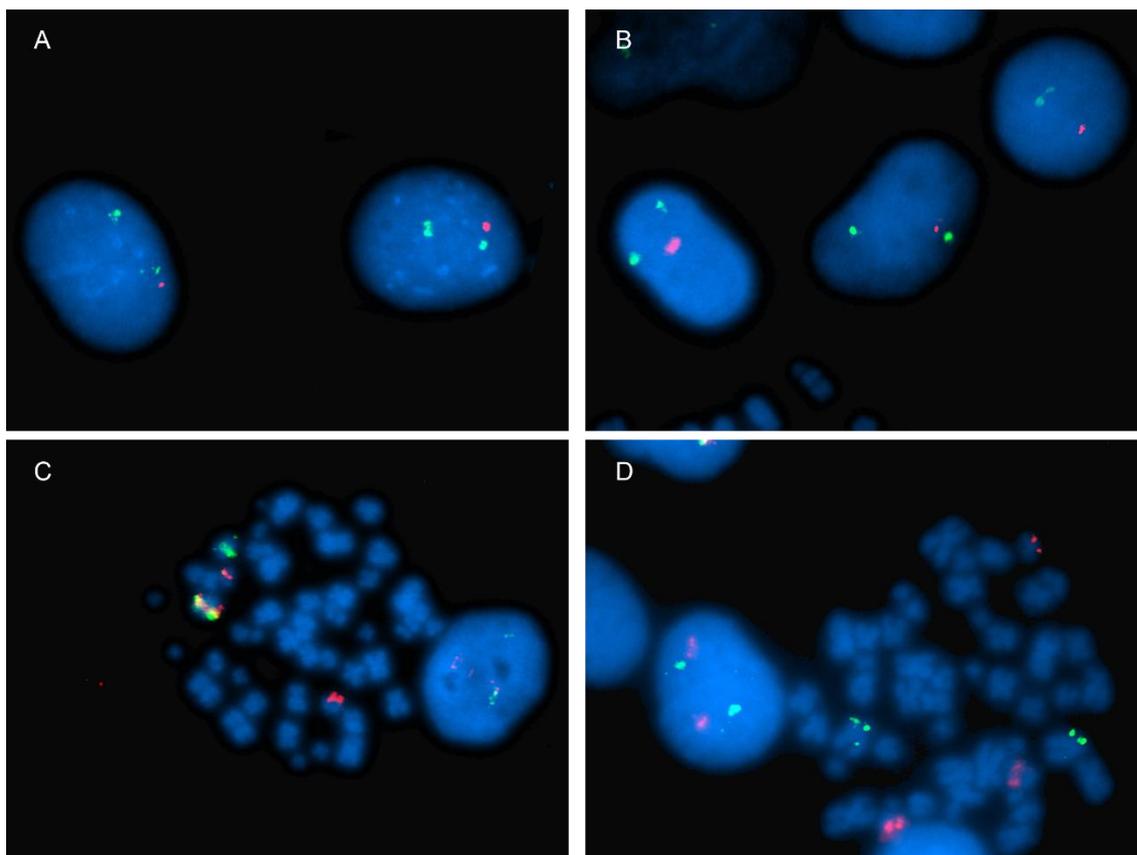
Foi aplicada a técnica de FISH com as sondas de sequência única para os cromossomas 13 (*RB1*), 17 (*TP53*), para a t(4;14)(*FGFR3*;*IGH*) e t(11;14)(*CCND1*;*IGH*). Observaram-se 28,5% dos núcleos com deleção da região 13q14 (*RB1*) (figura 33A) e 42,5% dos núcleos apresentavam três sinais para o cromossoma 11 com a sonda da t(11;14) (figura 33B) (Figura 33).



**Figura 33 | Amostra 39 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com sondas específicas para MM.** a) um sinal para 13q14 (vermelho) e dois sinais para a região controlo (verde); b) três sinais para o cromossoma 11 (verde) e dois sinais para o cromossoma 14 (vermelho).  
nuc ish(CCND1x3;IGHx2)[81/200],(RB1x1)[57/200],(FGFR3,IGH,TP53x2)[200]

Nesta amostra, à semelhança do que ocorreu na amostra n<sup>o</sup>45, a técnica de FISH detetou alterações citogenéticas não encontradas pela citogenética convencional, nomeadamente a trissomia do cromossoma 11 e a deleção do cromossoma 13. Esta deleção pode não ter sido visualizada no cariótipo devido à fraca qualidade das metafases e a deleção ser pequena. Observaram-se também neste caso 3 poliploidias, que podem explicar a trissomia do cromossoma 11. Este caso comprova a complementação entre CC e técnica de FISH no estudo genético para prever respostas ao tratamento e prognóstico em indivíduos com suspeita de diagnóstico de MM.

Na amostra n<sup>o</sup>47 foi realizada a técnica de FISH onde se observou em 60% dos núcleos a deleção da região 13q14 (*RB1*) (Figura 34A) e a deleção do cromossoma 17 (*TP53*) em 37,5% dos núcleos (Figura 34B). Adicionalmente foram observados 28,5% dos núcleos com um sinal de fusão para a t(11;14), com a presença de três sinais para o cromossoma 14 (Figura 34C). A presença de núcleos com três sinais para a sonda *IGH* foi confirmada com a sonda da t(4;14) em 24,5% dos núcleos observados (Figura 34D).



**Figura 34 | Amostra 47 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos e metafases com sondas específicas para MM. a)** um sinal para 13q14 (vermelho) e dois sinais para a região controlo (verde); **b)** um sinal para o cromossoma 17 (vermelho) e dois sinais para a região controlo (verde); **c)** metafase com um sinal de fusão para a t(11;14), com três sinais para o cromossoma 14 (vermelho) e dois sinais para o cromossoma 11 (verde); **d)** metafase com três sinais para o cromossoma 14 (vermelho) e dois sinais para o cromossoma 4 (verde).  
nuc ish(FGFR3x2;IGHx3)[49/200],(CCND1 con IGHx1)[121/200],(TP53x1)[75/200].

A deleção parcial do cromossoma 13 está descrita em 50% dos casos com MM e a trissomia do cromossoma 11 está associada ao aparecimento do tumor e envolve o gene *CCND1* cuja sobre expressão está associada a um prognóstico desfavorável e é detetada em 25 a 50% dos casos de MM. A deleção do braço curto do cromossoma 17 está relacionada com a perda do gene supressor tumoral *TP53* estando associada a um prognóstico desfavorável e a t(11;14), quando isolada, está associada a um prognóstico favorável (79, 80, 83, 85, 87, 103).

A amostra 47 apresenta um cariótipo complexo uma vez que apresenta mais de 3 anomalias citogenéticas, estando correlacionada com instabilidade cromossômica e a um prognóstico desfavorável (104).

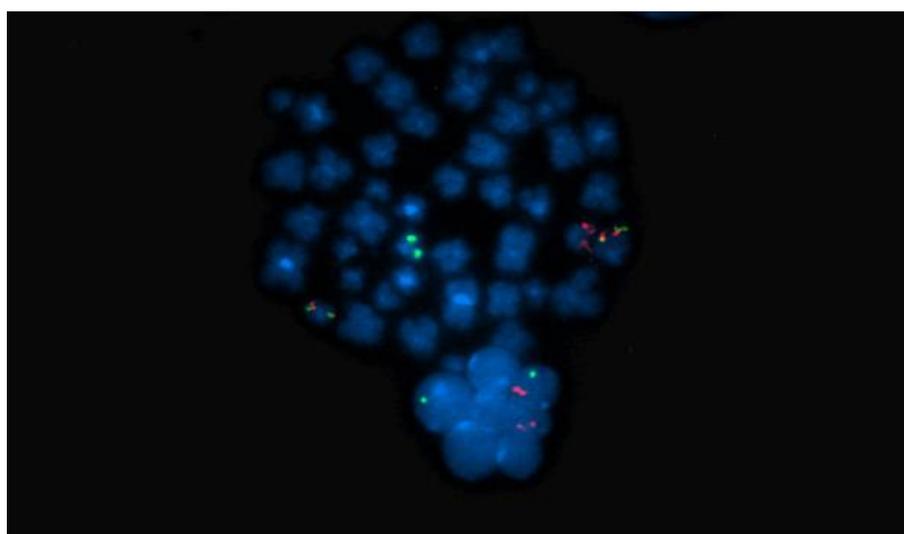
### 3.3 | Linfoma Folicular

Foram selecionadas 6 amostras com indicação clínica de Linfoma não Hodgkin *de novo* e suspeita de Linfoma Folicular. Em 3 amostras foi feita a análise por citogenética convencional e a técnica de FISH foi efetuada nas 6 amostras. Em 3 amostras foram detetadas anomalias associadas ao LF como a translocação (14;18) e a deleção do cromossoma 6 (casos nº 49, 52 e 53), nos restantes casos não foram detetadas alterações citogenéticas (Tabela 19).

**Tabela 19 | Resultados da análise citogenética nos casos com indicação clínica de linfoma folicular**

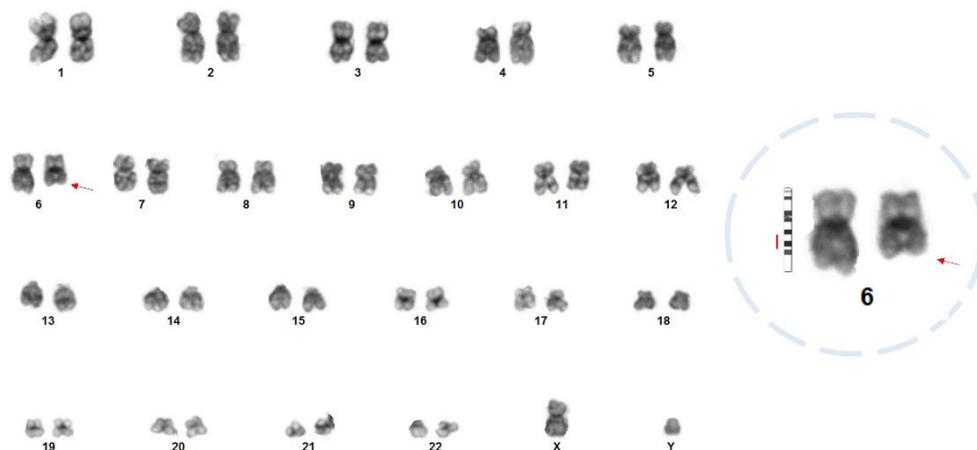
Caso	Idade	Tipo de amostra	Resultado CC	Resultado FISH
48	60	MO	46,XX[20]	Neg t(14;18)
49	70	SP	_____	Pos t(14;18) (19%)
50	82	MO	46,XY[20]	Neg t(14;18)
51	60	SP	_____	Neg t(14;18)
52	85	MO	46,XY,del(6)(q21q25)[5]/46,XY[15]	Pos #6 (32%)
53	85	SP	_____	Pos t(14;18) (20,5%)

Na amostra nº49 de uma senhora com 70 anos foi aplicada a técnica de FISH com a sonda para a t(14;18)(IGH;BCL2). Observou-se, em 19% dos núcleos, dois sinais de fusão, significando a presença da translocação entre os cromossomas 14 e 18 (Figura 35).



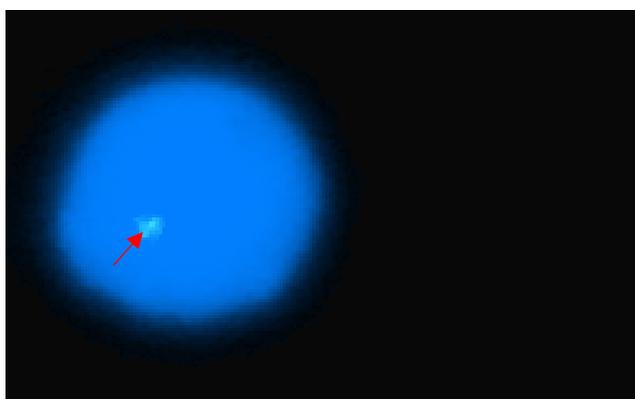
**Figura 35 | Amostra 49 - Técnica de FISH em metafase com a sonda para a translocação (14;18).** A translocação é evidenciada pela fusão dos dois sinais.  
nuc ish(IGH;BCL2)x3(IGHconBCL2x2)[38/200].

A análise por citogenética convencional na amostra nº52, de um senhor com 85 anos e com a informação clínica de macroglobulinemia de Waldestron e linfoma folicular revelou, em 5 metafases, a deleção de parte do braço longo do cromossoma 6 (banda q211 a q25) (Figura 36).



**Figura 36 | Amostra 52 - Cariótipo com bandas GTL de uma amostra do sexo masculino com a del(6)(q21q25)** representada com setas e esquema representativo do rearranjo com o cromossoma envolvido e respetivo ideograma. 46,XY,del(6)(q21q25)[5]/46,XY[15]

Foi aplicada a técnica de FISH com a sonda para 6q23 que confirmou a deleção em 32% dos núcleos analisados (Figura 37).



**Figura 37 | Amostra 52 - Técnica de FISH em núcleos interfásicos com a sonda para a deleção do cromossoma 6.** A deleção é evidenciada pela presença de apenas um sinal, representado com a seta. nuc ish(MYBx1)[16/50].

A t(14;18) está presente em 85% dos casos dos indivíduos com LF de acordo com a literatura (89). A macroglobulinemia de Waldestron é uma doença linfoproliferativa de células B caracterizada pela acumulação de células monoclonais na medula óssea e nos tecidos linfáticos periféricos e representa aproximadamente 2% de todas as neoplasias hematológicas, estando associada com uma idade mais avançada. Nenhum gene suscetível foi ainda identificado, mas alguns *loci* suscetíveis foram mapeados no cromossoma 6p21.3 e aproximadamente metade dos doentes apresentam a deleção 6q nas células tumorais (89, 105).

## **Capítulo 5 | Conclusão**



O Laboratório de Genética do CHTMAD é um laboratório certificado pela ISO 9001:2015 que dá resposta a amostras para diagnóstico pré-natal, pós-natal, hemato-oncologia e tumores sólidos na área da citogenética convencional, citogenética molecular e genética molecular.

Sendo um Laboratório que recebe muitos e diferentes tipos de amostras provenientes de vários hospitais do Distrito, as diferentes técnicas realizadas no Laboratório encontram-se bem definidas e estabelecidas. A análise em citogenética convencional e molecular em amostras de hemato-oncologia é crucial no diagnóstico, orientação clínica, decisão terapêutica e avaliação do prognóstico.

A análise por citogenética convencional é considerada fulcral em todas as leucemias recém-diagnosticadas, devido à sua utilidade no diagnóstico, classificação e prognóstico. A análise do cariótipo permite a deteção de anomalias que não são detetadas pela técnica de FISH uma vez que são usados painéis de sondas específicos para cada tipo de leucemia dirigidas às alterações citogenéticas mais recorrentes dessa leucemia. Especificamente, na amostra 9, com suspeita de LMC, foi detetada pela citogenética convencional a  $t(9;22;16)$ , apenas descrita em mais um caso na literatura, na qual o FISH foi positivo para a  $t(9;22)$  e auxiliou na identificação dos cromossomas e rearranjos quando foi realizada a hibridação numa metafase previamente captada. Também na amostra 21 foi detetada a  $t(19;21)$ , associada na literatura a LMA, apenas por citogenética convencional uma vez que a análise FISH para o painel de sondas dirigido às alterações mais comuns na LMA foi negativa. Deste modo, a análise citogenética pela organização e classificação das metafases em cariogramas é de extrema relevância no diagnóstico de doentes com neoplasias hematológicas.

Da mesma forma, a técnica de FISH superou algumas das desvantagens da citogenética convencional, como o baixo índice mitótico e a resolução de bandas de baixa qualidade apresentando uma maior rapidez na emissão de resultados. Em neoplasias hematológicas, o FISH é usado como uma ferramenta indispensável para a deteção de rearranjos estruturais, como translocações, inversões, inserções e microdeleções, tendo aumentado a eficiência e a precisão da análise do cariótipo. Nas amostras 39 e 45, de indivíduos com mieloma múltiplo a análise por FISH revelou alterações citogenéticas que não foram detetadas por citogenética convencional.

A bandagem G tem sido a técnica mais usada na rotina do Laboratório para a deteção e caracterização de alterações genómicas estruturais e numéricas no diagnóstico clínico em cancro. Em amostras de oncologia a análise por genética molecular e FISH é crucial na orientação terapêutica.

Assim, a análise por citogenética convencional juntamente com a técnica de FISH revelaram um salto quantitativo no diagnóstico, sendo fundamentais no estudo genético de doentes com anomalias citogenéticas pouco descritas, na predição de respostas ao tratamento e no prognóstico e na deteção de alterações cromossómicas relevantes e pouco descritas no diagnóstico de doenças hemato-oncológicas.

O desenvolvimento de técnicas de sequenciação de nova geração (NGS) tem vindo a tornar-se numa ferramenta importante nas avaliações laboratoriais de neoplasias hematológicas. O NGS consiste na primeira metodologia na qual se tornou possível a deteção de substituições de bases, pequenas inserções e deleções, bem como alterações no número de cópias ao nível de um exão ou gene inteiro sendo esta metodologia aplicada para analisar a composição genética de tumores e de doenças hemato-oncológicas.

Esta técnica é crucial para a sequenciação de alto rendimento de grandes e pequenas regiões genómicas na deteção de mutações associadas à terapia recorrendo a painéis de genes específicos. Dependendo da doença, os dados mutacionais podem ser usados para facilitar o diagnóstico, informar o prognóstico, orientar a seleção da terapia ou monitorizar a doença. A integração destes dados em perfis morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos atuais de neoplasias hematológicas vai permitir uma melhor compreensão da leucomogénese, avaliar a estratificação de risco ou identificar potenciais alvos terapêuticos e fornecerá maior precisão no diagnóstico dos doentes.

Todos os objetivos propostos foram alcançados tendo sido realizada a análise por citogenética convencional e molecular em, aproximadamente, 200 amostras de hemato-oncologia com o objetivo da obtenção de experiência em genética clínica laboratorial, nomeadamente diagnóstico citogenético hemato-oncológico pela aplicação de técnicas de citogenética convencional e molecular em amostras de sangue periférico e medula óssea nomeadamente: culturas celulares, manipulação, espalhamento, e análise por citogenética convencional e FISH.

No decorrer deste estágio adquiri conhecimentos teóricos e práticos e competências na área da Genética Clínica Laboratorial tendo integrado a rotina do Laboratório de Citogenética do CHTMAD. Foi-me dada a oportunidade de levar 3 trabalhos a congressos sob a forma de poster, num dos quais nos foi atribuída uma menção honrosa. Assim, com este estágio adquiri competências pessoais, humanistas e profissionais que me tornaram numa pessoa mais capaz, numa profissional mais responsável e rigorosa agradecendo, mais uma vez, a toda a equipa pela disponibilidade, apoio e inspiração.

## **Capítulo 6 | Referências Bibliográficas**



1. Hsu Tc. Mammalian chromosomes in vitro: I. The Karyotype of Man. *Journal of Heredity*. 1952;43(4):167-72.
2. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. 1956;42(1-2):16.
3. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(10):769-78.
4. ISCN. An International System for Human Cytogenetics Nomenclature. Basel: Karger. 2009.
5. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962;8:65-6.
6. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-3.
7. Wan TS. Cancer cytogenetics: methodology revisited. *Ann Lab Med*. 2014;34(6):413-25.
8. Gardner RJMS, G. R. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. New York: Oxford University Press. 2004;3rd Ed.
9. Arsham MS, & Shaffer, L. G. ISCN: the universal language of cytogenetics. Em M. S. Arsham, M. J. Barch, & H. J. Lawce (Eds.), *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (pp.359-428). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc 2017.
10. Slovak ML, Theisen, A. & Shaffer, L. G. Human Chromosome Nomenclature: An Overview and Definition of Terms. In: Gersen, S. & Keagle, M. (eds.) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 3, 23-49 ed.: Springer 2013.
11. Keagle MB. DNA, Chromosomes, and Cell Division. In: Gersen, S. & Keagle M. (eds.) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 3 ed.: Springer, 9-21. 2013.
12. McGowan-Jordan JHR, Moore S, editors. . *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. Basel:Karger. 2020.
13. J. LH. Chromosome stains. Em M. S. Arsham, M. J. Barch, & H. J. Lawce (Eds.), *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (pp. 213-300). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.2017.
14. Liehr T. *Molecular Cytogenetics in the Era of Chromosomics and Cytogenomic Approaches*. 2021;12.
15. Nussbaum RL, R.R. McInnes, and H.F. Willard. *Thompson & Thompson genetics in medicine*. 2016.
16. Zhang C, Cerveira E, Rens W, Yang F, Lee C. Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Approaches for Simultaneous Analysis of the Entire Human Genome. *Current protocols in human genetics*. 2018;99(1):e70.
17. Sanford HJLJS. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, 717–831. Chapter 16. 2004.
18. Chrzanowska NM, J. Kowalewski, and M.A. Lewandowska, . *Use of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors*. *Molecules*. 2020.
19. Liehr T. *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) – Application Guide*. 2nd ed. Berlin., Germany: Springer.2017.
20. Wippold FJ, 2nd, Perry A. Neuropathology for the neuroradiologist: fluorescence in situ hybridization. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2007;28(3):406-10.
21. Tietsche de Moraes Hungria V, Chiattono C, Pavlovsky M, Abenzoza LM, Agreda GP, Armenta J, et al. Epidemiology of Hematologic Malignancies in Real-World Settings: Findings From the Hemato-Oncology Latin America Observational Registry Study. *Journal of global oncology*. 2019;5:1-19.
22. Harris J, P. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: International Agency for Research on Cancer International Agency for Research on Cancer (IARC)*. 2017;39(3).
23. Mohile SG, Dale W, Somerfield MR, Hurria A. *Practical Assessment and Management of Vulnerabilities in Older Patients Receiving Chemotherapy: ASCO*

Guideline for Geriatric Oncology Summary. *Journal of oncology practice*. 2018;14(7):442-6.

24. Bron D, Ades L, Fulop T, Goede V, Stauder R, Elderly Task Force in Hematology ES. Aging and blood disorders: new perspectives, new challenges. *Haematologica*. 2015;100(4):415-7.

25. Adelman ER, Figueroa ME. Human hematopoiesis: aging and leukemogenic risk. *Current opinion in hematology*. 2021;28(1):57-63.

26. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* (London, England). 2017;390(10100):1151-210.

27. Cook MB, McGlynn KA, Devesa SS, Freedman ND, Anderson WF. Sex disparities in cancer mortality and survival. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2011;20(8):1629-37.

28. Ben-Batalla I, Vargas-Delgado ME, Meier L, Loges S. Sexual dimorphism in solid and hematological malignancies. *Seminars in immunopathology*. 2019;41(2):251-63.

29. Shahrazi S, Khodadi E, Saba F, Shahjahani M, Saki N. Sex chromosome changes in leukemia: cytogenetics and molecular aspects. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*. 2018;23(3):139-47.

30. Dzierzak E, Bigas A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell stem cell*. 2018;22(5):639-51.

31. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2019;20(5):303-20.

32. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development* (Cambridge, England). 2013;140(12):2463-7.

33. Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. 2018;553(7689):418-26.

34. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.

35. Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, Lindoerfer D, Burgstaller S, Sertic D, et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia*. 2015;29(6):1336-43.

36. Höglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Annals of hematology*. 2015;94 Suppl 2:S241-7.

37. Liesveld JL, Lichtman MA. Chronic Myelogenous Leukemia and Related Disorders. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, et al., editors. *Williams Hematology*, 9e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015.

38. Yeung DTO, HTcmlIHV, Higgs DR, Keeling DM, Mehta AB, editors. . *Chronic myeloid leukaemia*. Postgraduate Haematology 7th ed: John Wiley & Sons, p 419-37. 2016.

39. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-56.

40. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American journal of hematology*. 2020;95(6):691-709.

41. Hidalgo-López JE, Kanagal-Shamanna R, Quesada AE, Gong Z, Wang W, Hu S, et al. Bone marrow core biopsy in 508 consecutive patients with chronic myeloid leukemia: Assessment of potential value. *Cancer*. 2018;124(19):3849-55.

42. Chronic myelogenous leukemia: Mayo Foundation for Medical Education and Research; [Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chronic-myelogenousleukemia/symptoms-causes/syc-20352417>. 2021.

43. Hehlmann R. Chronic Myeloid Leukemia. *Hematologic Malignancies*. 2016.

44. Švabek ŽT, Josipović M, Horvat I, Zadro R, Davidović-Mrsić S. The incidence of atypical patterns of BCR-ABL1 rearrangement and molecular-cytogenetic response to

tyrosine kinase inhibitor therapy in newly diagnosed cases with chronic myeloid leukemia (CML). *Blood Res.* 2018;53(2):152-9.

45. Cazzola M. Myelodysplastic Syndromes. *The New England journal of medicine.* 2020;383(14):1358-74.

46. Malcovati L, Nimer SD. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Staging. *Cancer Control.* 2008;15(4\_suppl):4-13.

47. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-405.

48. Zini G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Ann Lab Med.* 2017;37(6):465-74.

49. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Bennett JM, Borate U, Brunner AM, et al. NCCN Guidelines® Insights: Myelodysplastic Syndromes, Version 3.2022. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* 2022;20(2):106-17.

50. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(8):820-9.

51. Haferlach T. The Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndrome. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology.* 2019;86(1):24-9.

52. Fuchs O. Important genes in the pathogenesis of 5q- syndrome and their connection with ribosomal stress and the innate immune system pathway. *Leukemia research and treatment.* 2012;2012:179402.

53. Gupta R, Harankhedkar S, Rahman K, Singh MK, Chandra D, Mittal N, et al. Prevalence of Chromosome 7 Abnormalities in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: A Single Center Study and Brief Literature Review. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2018;34(4):602-11.

54. Hoffbrand AV, PCEHTGK. *Color atlas of clinical hematology : molecular and cellular basis of disease* 2019.

55. Zahid MF, Malik UA, Sohail M, Hassan IN, Ali S, Shaukat MHS. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017;11(3):231-9.

56. Ravindran A, He R, Ketterling RP, Jawad MD, Chen D, Oliveira JL, et al. The significance of genetic mutations and their prognostic impact on patients with incidental finding of isolated del(20q) in bone marrow without morphologic evidence of a myeloid neoplasm. *Blood Cancer Journal.* 2020;10(1):7.

57. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood reviews.* 2019;36:70-87.

58. Burd A, Levine RL, Ruppert AS, Mims AS, Borate U, Stein EM, et al. Precision medicine treatment in acute myeloid leukemia using prospective genomic profiling: feasibility and preliminary efficacy of the Beat AML Master Trial. *Nature medicine.* 2020;26(12):1852-8.

59. Institute NC (2018) Cancer stat facts: leukemia-acute myeloid leukemia (AML). Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.

60. Christoph Röllig GJO. *Hematologic Malignancies: Acute Myeloid Leukemia.* Springer Nature. 2021.

61. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2008;93(7):976-82.

62. Espirito Santo A, Chacim S, Ferreira I, Leite L, Moreira C, Pereira D, et al. Southwestern Oncology Group pretreatment risk criteria as predictive or prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Mol Clin Oncol.* 2017;6(3):384-8.

- 63.** Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V, Gómez-Guijosa MÁ, Cortes-Penagos C. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017;11(4):328-39.
- 64.** PDQ Adult Treatment Editorial Board Acute Myeloid Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2022.
- 65.** Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446-56.
- 66.** Sharma S, Rai KR. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. *Cancer.* 2019;125(9):1432-40.
- 67.** Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American journal of hematology.* 2019;94(11):1266-87.
- 68.** Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood.* 2019;133(11):1205-16.
- 69.** Eichhorst B, Al-Sawaf O, Hallek M. Initial Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia. In: Hallek M, Eichhorst B, Catovsky D, editors. *Chronic Lymphocytic Leukemia.* Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 79-96.
- 70.** Quintero-Rivera F, Nooraie F, Rao PN. Frequency of 5'IGH deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics.* 2009;190(1):33-9.
- 71.** Boddu P, Ferrajoli A. Prognostic Factors in the Era of Targeted Therapies in CLL. *Current Hematologic Malignancy Reports.* 2018;13.
- 72.** Delgado J, Villamor N, López-Guillermo A, Campo E. Genetic evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2016;29(1):67-78.
- 73.** Yi S, Li H, Li Z, Xiong W, Liu H, Liu W, et al. The prognostic significance of 13q deletions of different sizes in patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a retrospective study. *International journal of hematology.* 2017;106(3):418-25.
- 74.** Strati P, Abruzzo LV, Wierda WG, O'Brien S, Ferrajoli A, Keating MJ. Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia.* 2015;15(7):420-7.
- 75.** Puiggros A, Delgado J, Rodriguez-Vicente A, Collado R, Aventín A, Luño E, et al. Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *British journal of haematology.* 2013;163(1):47-54.
- 76.** Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews Cancer.* 2016;16(3):145-62.
- 77.** Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2010;28(29):4473-9.
- 78.** Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2015;29(4):877-85.
- 79.** Padala SA, Barsouk A, Barsouk A, Rawla P, Vakiti A, Kolhe R, et al. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Medical sciences (Basel, Switzerland).* 2021;9(1).
- 80.** Rajkumar SV. Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematological oncology.* 2019;37 Suppl 1(Suppl 1):62-5.
- 81.** Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2020;70(1):7-30.

- 82.** Turesson I, Kovalchik SA, Pfeiffer RM, Kristinsson SY, Goldin LR, Drayson MT, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood*. 2014;123(3):338-45.
- 83.** Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017;14(2):100-13.
- 84.** Walker BA, Wardell CP, Murison A, Boyle EM, Begum DB, Dahir NM, et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nature communications*. 2015;6:6997.
- 85.** Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016;127(24):2955-62.
- 86.** Brigle K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in oncology nursing*. 2017;33(3):225-36.
- 87.** Schürch CM, Rasche L, Frauenfeld L, Weinhold N, Fend F. A review on tumor heterogeneity and evolution in multiple myeloma: pathological, radiological, molecular genetics, and clinical integration. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2020;476(3):337-51.
- 88.** Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
- 89.** Freedman A, Jacobsen E. Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management. *American journal of hematology*. 2020;95(3):316-27.
- 90.** Schwaenen C, Viardot A, Berger H, Barth TF, Bentink S, Döhner H, et al. Microarray-based genomic profiling reveals novel genomic aberrations in follicular lymphoma which associate with patient survival and gene expression status. *Genes, chromosomes & cancer*. 2009;48(1):39-54.
- 91.** Mikhail FM. 9 - Chromosomal Basis of Inheritance\*. In: Pyeritz RE, Korf BR, Grody WW, editors. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)*: Academic Press; 2019. p. 237-65.
- 92.** Hastings R HR, Betts D, Porter S, Haferlach C, Dastugue N, et al. Guidelines and quality assurance for acquired cytogenetics. *European cytogeneticists association newsletter No.31*. 2013.
- 93.** Morris CM. Chronic myeloid leukemia: cytogenetic methods and applications for diagnosis and treatment. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;730:33-61.
- 94.** Asif M, Hussain A, Wali A, Ahmad N, Sajjad N, Amir M, et al. A rare case of three-way complex variant translocation in chronic myeloid leukemia t(6;9;22)(p21;q34;q11): A case report. *Biomed Rep*. 2017;7(4):377-9.
- 95.** Manabe M, Yoshii Y, Mukai S, Sakamoto E, Kanashima H, Inoue T, et al. A Rare t(9;22;16)(q34;q11;q24) Translocation in Chronic Myeloid Leukemia for Which Imatinib Mesylate Was Effective: A Case Report. *Leukemia research and treatment*. 2011;2011:592519.
- 96.** Shu Y, Yang W, Zhang X, Xu X. Recurrent chronic myeloid leukemia with t(9;22;16)(q34;q11;p13) treated by nilotinib: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(42):e12875-e.
- 97.** Al Achkar W, Wafa A, Mkrtychyan H, Moassass F, Liehr T. A rare case of chronic myeloid leukemia with secondary chromosomal changes including partial trisomy 17q21 to 17qter and partial monosomy of 16p13.3. *Molecular cytogenetics*. 2010;3:6.
- 98.** Dai H, Xue Y, Pan J, Wu Y, Wang Y, Shen J, et al. Two novel translocations disrupt the RUNX1 gene in acute myeloid leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2007;177(2):120-4.
- 99.** Imagama S, Abe A, Suzuki M, Hayakawa F, Katsumi A, Emi N, et al. LRP16 is fused to RUNX1 in monocytic leukemia cell line with t(11;21)(q13;q22). *European journal of haematology*. 2007;79(1):25-31.

- 100.** Poiré X, Labopin M, Polge E, Volin L, Finke J, Ganser A, et al. The impact of concomitant cytogenetic abnormalities on acute myeloid leukemia with monosomy 7 or deletion 7q after HLA-matched allogeneic stem cell transplantation. *American journal of hematology*. 2020;95(3):282-94.
- 101.** Hromas R, Shopnick R, Jumean HG, Bowers C, Varella-Garcia M, Richkind K. A novel syndrome of radiation-associated acute myeloid leukemia involving AML1 gene translocations. *Blood*. 2000;95(12):4011-3.
- 102.** Kubota Y, Kamachi K, Wakayama K, Kitamura H, Yoshihara M, Hisatomi T, et al. Acute myeloid leukemia with t(19;21)(q13;q22) and marked eosinophilia. *Annals of hematology*. 2019;98(1):221-2.
- 103.** Sewify EM, Afifi OA, Mosad E, Zaki AH, El Gammal SA. Cyclin D1 amplification in multiple myeloma is associated with multidrug resistance expression. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2014;14(3):215-22.
- 104.** Greslikova H, Zaoralova R, Filkova H, Nemecek P, Oltova A, Kupska R, et al. Negative prognostic significance of two or more cytogenetic abnormalities in multiple myeloma patients treated with autologous stem cell transplantation. *Neoplasma*. 2010;57(2):111-7.
- 105.** Sekiguchi N, Nomoto J, Nagata A, Kiyota M, Fukuda I, Yamada K, et al. Gene Expression Profile Signature of Aggressive Waldenström Macroglobulinemia with Chromosome 6q Deletion. *BioMed Research International*. 2018;2018:6728128.
- 106.** Alonso CM, Llop M, Sargas C, Pedrola L, Panadero J, Hervás D, et al. Clinical Utility of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia Diagnostics. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2019;21(2):228-40.
- 107.** Ramkissoon LA, Montgomery ND. Applications of next-generation sequencing in hematologic malignancies. *Human immunology*. 2021;82(11):859-70.

## Capítulo 7 | Anexos



## **Anexo I – Protocolo de Linfócitos não cultivados**

### **Soluções:**

- ✓ Solução de cloreto de potássio (0,075M): dissolver num balão volumétrico de 1 litro 5,6g de cloreto de potássio em 1L de água destilada e reservar no frigorífico a 4°C;
- ✓ Colcemide na concentração final de 10 µg/mL;
- ✓ Fixador na proporção 3:1 – metanol:ácido acético, preparado de fresco.

### **Tubos LNC:**

- 1) Na câmara de fluxo laminar previamente desinfetada, homogeneizar a amostra e com uma seringa de 1mL adicionar entre 0,5 a 1mL a um tubo esterilizado, previamente identificado;
- 2) Na hotte e sob agitação do vortex, adicionar lentamente a solução hipotónica previamente aquecida;
- 3) Incubar no banho-maria a 37°C durante 15 min;
- 4) Centrifugar a 2000 rpm (rotações por minuto) durante 4 minutos;
- 5) Rejeitar o sobrenadante;
- 6) Na hotte e sob agitação do vortex, adicionar lentamente o fixador;
- 7) Centrifugar a 2000 rpm durante 4 minutos;
- 8) Rejeitar o sobrenadante;
- 9) Repetir a adição do fixador mais três vezes
- 10) Decantar totalmente o sobrenadante
- 11) Proceder ao espalhamento.

### **Espalhamento:**

- 1) Ressuspender o sedimento;
- 2) Colocar 1 gota de 2 µL de suspensão celular num local identificado na lâmina
- 3) Secar a lâmina numa placa de aquecimento a uma temperatura de 60°C e identificar devidamente a mesma;
- 4) Deixar a lâmina envelhecer 15 minutos na placa até efetuar a técnica de FISH.

## Anexo II – Protocolo de culturas diretas e sincronizadas

### Soluções:

- ✓ Meio k-max previamente dividido em alíquotas de 5mL;
- ✓ Meio de cultura específico para sangues *RPMI1640*: frasco de 100 mL congelado e dividido em alíquotas de 5 mL;
- ✓ Meio de cultura *RPMI1640*: dividir em alíquotas de 45 mL um frasco de 500 mL em forma líquida, adicionar 5 mL L-glutamina, 0.5 mL de penicilina/estreptomicina, 0.5 mL de kanamicina;
  - L-glutamina, 200 mM: em forma sólida, reconstituída com 10 mL de água destilada e dividida em alíquotas de 5 mL;
  - Penicilina/estreptomicina, 10000 U/10000 µg/ml: dividir em alíquotas de 0.5 mL um frasco de 20 mL congelado;
  - Kanamicina, 10 mg/mL: dividir em alíquotas de 0.5 mL um frasco de 20 mL congelado;
- ✓ Meio de cultura *RPMI1640* completo: adicionar 7 mL de soro de vitelo fetal (SVF) inativado a 45 mL de meio RPMI e dividir em alíquotas de 5 mL;
- ✓ Metotrexato: num tubo esterilizado dissolver 5 mg de metotrexato em 2 mL de água estéril (solução A). Seguidamente, efetuar as seguintes diluições: Solução B – 0.1 mL da solução A a 9.9 mL de água destilada e Solução C – 1 mL da solução B a 9 mL de água destilada;
- ✓ Timidina, 0.3 µg/mL: num tubo esterilizado dissolver 2.4 mg de timidina em 5 mL de meio de cultura completo (preparar no próprio dia);
- ✓ Solução de cloreto de potássio (0,075M): dissolver num balão volumétrico de 1 litro 5,6g de cloreto de potássio em 1L de água destilada e reservar no frigorífico a 4°C;
- ✓ Solução de cloreto de potássio (0.06M): dissolver num balão volumétrico de 1 litro, 4.48 g em 1L de água destilada e reservar no frigorífico a 4°C;
- ✓ Colcemide na concentração final de 10 µg/mL;
- ✓ Fixador na proporção 3:1 – metanol:ácido acético, preparado de fresco.

### **Tubos C e D:**

- 1) Na câmara de fluxo laminar previamente desinfetada, homogeneizar a amostra e com uma seringa de 1mL adicionar 6 gotas de SP ou 3 a 6 gotas de MO, dependendo da viscosidade da mesma, aos tubos com meio k-max, previamente identificados;
- 2) Com uma seringa de 1 mL, adicionar 3 gotas de colcemide apenas ao tubo C;
- 3) Fechar os tubos e homogeneizar cuidadosamente;
- 4) Abrir ligeiramente os tubos e incubar na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com uma inclinação de 30°;
- 5) Após 45 min e com uma seringa de 1 mL adicionar 3 gotas de colcemide apenas ao tubo D;
- 6) Incubar 30 min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, mantendo a inclinação de 30°;
- 7) Colocar a centrifugar a 2000 rpm durante 4 min;
- 8) Rejeitar o sobrenadante;
- 9) Na *hotte* e sob agitação do vórtex, adicionar lentamente a solução hipotónica previamente aquecida.
- 10) Incubar no banho-maria a 37°C durante 15 min;
- 11) Centrifugar a 2000 rpm durante 4 min;
- 12) Rejeitar o sobrenadante;
- 13) Na *hotte* e sob agitação do vórtex adicionar lentamente o fixador;
- 14) Centrifugar a 2000 rpm durante 4 min;
- 15) Rejeitar o sobrenadante;
- 16) Repetir a adição do fixador por mais duas vezes;
- 17) Decantar totalmente o sobrenadante;
- 18) Proceder ao espalhamento.

### **Tubo S (cultura sincronizada):**

- 1) Na câmara de fluxo laminar previamente desinfetada, homogeneizar a amostra e com uma seringa de 1mL adicionar 6 gotas de SP ou 3 a 6 gotas de MO, dependendo da viscosidade da mesma, ao tubo com meio *RPMI1640* previamente identificado;
- 2) Fechar o tubo e homogeneizar levemente;
- 3) Abrir ligeiramente o tubo e incubar na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com uma inclinação de 30°;
- 4) Adicionar às 16h 2 gotas de MTX (solução C) com uma seringa de 1 mL;

- 5) Incubar 17 horas na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com uma inclinação de 30°.
- 6) Centrifugar os tubos a 2000 rpm durante 4 min;
- 7) Preparar a timidina;
- 8) Na *hotte* decantar o sobrenadante;
- 9) Na câmara de fluxo laminar adicionar 5 mL de meio de cultura *RPMI1640* completo ao tubo S;
- 10) Adicionar ao tubo S 1 gota de timidina com a seringa de 1 mL;
- 11) Incubar na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com uma inclinação de 30°;
- 12) Após 5 horas, adicionar, ao tubo, 2 gotas de colcemide com a seringa de 1 mL;
- 13) Incubar na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, mantendo a inclinação de 30°;
- 14) Centrifugar a 2000 rpm durante 4 min;
- 15) Rejeitar o sobrenadante;
- 16) Na *hotte* e sob agitação do vórtex, adicionar lentamente a solução hipotônica;
- 17) Incubar no banho-maria a 37°C durante 20 min;
- 18) Centrifugar a 2000 rpm durante 4 min;
- 19) Rejeitar o sobrenadante;
- 20) Na *hotte* e sob agitação do vórtex adicionar lentamente o fixador;
- 21) Centrifugar a 2000 rpm durante 4 min;
- 22) Rejeitar o sobrenadante;
- 23) Repetir a adição do fixador mais duas vezes;
- 24) Decantar totalmente o sobrenadante;
- 25) Proceder ao espalhamento.

**Espalhamento:**

- 1) Ressuspender o sedimento;
- 2) Colocar 2 gotas de 10 µL de suspensão celular em 2 locais diferentes da lâmina
- 3) Secar as lâminas sobre uma placa de aquecimento a uma temperatura de 60°C, até a lâmina estar seca e, assim que possível, identificar devidamente as mesmas;
- 4) Colocar as lâminas na estufa a 60°C, até à realização da bandagem (normalmente, no dia seguinte).

## Anexo III – Protocolo de culturas com estimuladores

### Soluções:

- ✓ Meio k-max previamente dividido em alíquotas de 5mL;
- ✓ Solução de trabalho: TPA, 5 µg/mL: adicionar uma alíquota de TPA (50 µg/mL) a 0.9 mL de meio de cultura completo;
  - TPA, 50 µg/mL: num *falcon* de 50 mL esterilizado dissolver 1 mg de TPA em 20 mL de etanol absoluto e dividir em alíquotas de 10 mL;
- ✓ DSP30, 2 µM: num tubo esterilizado dissolver o conteúdo do vial em 5 mL de água destilada e dividir em alíquotas de 120 µL;
- ✓ Solução de trabalho: IL2, 0.2 µg/mL: num tubo esterilizado diluir uma alíquota de IL2 (5 µg/mL) em 6 mL de meio completo e dividir em alíquotas de 0.5 mL
  - IL2, 5 µg/mL: dividir em alíquotas de 250 µL vial com 1 mL.
- ✓ Solução de cloreto de potássio (0,075M): dissolver num balão volumétrico de 1 litro 5,6g de cloreto de potássio em 1L de água destilada e reservar no frigorífico a 4°C;
- ✓ Colcemide na concentração final de 10 µg/mL;
- ✓ Fixador na proporção 3:1 – metanol:ácido acético, preparado de fresco.

### Tubo ID e T:

- 1) Na câmara de fluxo laminar, com a micropipeta adicionar 500 µL de IL2 e 100 µL de DSP30 ao tubo ID; ao tubo T adicionar 75 µL de TPA;
- 2) Homogeneizar a amostra e com uma seringa de 1 mL adicionar 6 gotas de SP ou 3 a 6 gotas de MO, dependendo da viscosidade da mesma, aos tubos com meio k-max, previamente identificados;
- 3) Fechar o tubo e homogeneizar cuidadosamente;
- 4) Abrir ligeiramente os tubos e incubar 72 horas na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com uma inclinação de 30°;
- 5) Adicionar a cada tubo 2 gotas de colcemide com a seringa de 1 mL;
- 6) Fechar os tubos e homogeneizar cuidadosamente;
- 7) Abrir ligeiramente os tubos e incubar 17 horas na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com uma inclinação de 30°;
- 8) Centrifugar a 2000 rpm durante 4 minutos;
- 9) Rejeitar o sobrenadante;

- 10) Na *hotte* e sob agitação do vórtex adicionar lentamente a solução hipotónica;
- 11) Incubar no banho-maria a 37°C 15 minutos;
- 12) Centrifugar a 2000 rpm 4 minutos;
- 13) Rejeitar o sobrenadante;
- 14) Na *hotte* e sob agitação do vórtex, adicionar lentamente o fixador;
- 15) Centrifugar a 2000 rpm 4 minutos;
- 16) Rejeitar o sobrenadante;
- 17) Repetir a adição do fixador mais duas vezes;
- 18) Decantar totalmente o sobrenadante;
- 19) Proceder ao espalhamento.

### **Espalhamento**

- 1) Ressuspender o sedimento;
- 2) Colocar 2 gotas de 10 µL de suspensão celular em 2 locais diferentes da lâmina
- 3) Secar as lâminas sobre uma placa de aquecimento a uma temperatura de 60°C, até a lâmina estar seca e, assim que possível, identificar devidamente as mesmas;
- 4) Colocar as lâminas na estufa a 60°C, até à realização da bandagem (normalmente, no dia seguinte).

## **Anexo IV – Protocolo da bandagem GTL**

### **Soluções**

- ✓ Solução salina – Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,9%: dissolver 9 g de NaCl em 1 litro de água destilada;
- ✓ Solução de trabalho de tripsina: num *coplin* adicionar 60 mL de solução salina e 0.5 mL de tripsina;
  - Solução de Tripsina: num balão volumétrico de 100 mL, dissolver 1.25 g de tripsina em água destilada e distribuir em alíquotas de 2 mL;
- ✓ Solução Gurr: dissolver uma pastilha de tampão Gurr em 1 litro de água destilada e ajustar o pH a 6,8;
- ✓ Corante *Leishman* de trabalho: filtrar o corante, envolver o *coplin* com papel de alumínio e adicionar ao *coplin* 40 mL de solução Gurr e 8 mL de corante de *Leishman* filtrado (solução mãe);
  - Corante *Leishman* (solução mãe): num balão volumétrico de 500 mL, envolvido com papel de alumínio, dissolver 0.6 g de corante *Leishman* em 400 mL de metanol. Na *hotte* colocar o balão na placa de agitação durante 48 horas e deixar repousar durante, pelo menos, 15 dias;

### **Preparação dos reagentes:**

- ✓ **Coplin 1:** Solução de tripsina de trabalho;
- ✓ **Coplin 2:** Solução salina;
- ✓ **Coplin 3:** Solução Gurr;
- ✓ **Coplin 4:** Corante *Leishman* de trabalho;
- ✓ **Coplin 5:** Solução Gurr;
- ✓ **Coplin 6:** Água destilada;

*Nota:* os coplins 1, 2, 3, 5 e 6 devem ser colocados no banho-maria a 37°C.

### **Procedimento:**

- 1) Colocar a lâmina no coplin 1 de acordo com o tempo de exposição à tripsina;
- 2) Lavar a lâmina no coplin 2;
- 3) Lavar a lâmina no coplin 3;
- 4) Colocar a lâmina no coplin 4 durante 6 min;
- 5) Lavar a lâmina no coplin 5;

- 6)** Lavar a lâmina no coplin 6;
- 7)** Secar a lâmina num guardanapo cuidadosamente para não danificar a preparação;
- 8)** Observar ao microscópio ótico, captar as imagens de metafases e proceder à sua análise.

## **Anexo V – Protocolo da Técnica de FISH**

### **Sondas Zytovision**

#### **Soluções:**

- ✓ **Zytovision I** (0,4× Citrato de sódio salino (SSC) / 0,3% Igepal) – Coplin 1
- ✓ **Zytovision II** – Coplin 2

#### **Espalhamento e envelhecimento da lâmina:**

- 1) Espalhar 2 µL de suspensão celular na lâmina
- 2) Colocar a lâmina na placa a 60°C por, pelo menos, 15 min.

#### **Preparação da sonda:**

- 1) Retirar a sonda do frigorífico 15 min antes da sua utilização e colocar à temperatura ambiente
- 2) Vortexar a sonda e fazer um *spin down*.

#### **Codesnaturação da amostra/sonda:**

- 1) Aplicar 3 µL de sonda na área marcada da suspensão celular, cobrir com uma lamela e selar com a cola;
- 2) Desnaturar a sonda e a amostra por colocação na placa de aquecimento a 75°C durante 10 minutos.

#### **Hibridação:**

Incubar a lâmina numa caixa húmida na estufa a 37°C durante a noite.

### **Lavagem:**

- 1) Retirar, cuidadosamente a cola e a lamela;
- 2) Colocar a lâmina no coplin 1 durante 2 minutos (banho-maria a 72°C);
- 3) Transferir a lâmina para o coplin 2 durante 1 min.

### **Contraste:**

- 1) Deixar a lâmina secar durante 2 min no escuro;
- 2) Aplicar 4 µL de DAPI;
- 3) Cobrir com uma lamela, retirar cuidadosamente, o excesso de DAPI e as bolhas que se possam ter formado;
- 4) Guardar a lâmina numa caixa de alumínio no frigorífico a 4°C durante, pelo menos, 15 minutos;
- 5) Observar os resultados e efetuar contagem de sinais num microscópio de epifluorescência.

### **Sondas *Leica***

#### **Soluções:**

- ✓ **Leica I** (2x Citrato de sódio salino (SSC) / 0,1% Igepal) – Coplin 1
- ✓ **Leica II** – (0,4x SSC / 0,3% Igepal) – Coplin 2
- ✓ **Leica III** – (2x SSC / 0,1% Igepal) – Coplin 3
- ✓ **Álcool a 70%** – Coplin 4
- ✓ **Álcool a 85%** (misturar 44 mL de álcool a 96% com 4 mL de água destilada) – Coplin 5
- ✓ **Álcool a 100%** – Coplin 6

#### **Espalhamento e envelhecimento da lâmina:**

- 1) Espalhar 2 µL de suspensão celular na lâmina
- 2) Colocar a lâmina na placa a 60°C por, pelo menos, 15 min.

### **Preparação da sonda:**

- 1) Retirar a sonda do frigorífico 15 min antes da sua utilização e colocar à temperatura ambiente
- 2) Vortexar a sonda e fazer um *spin down*.

### **Codesnaturação da amostra/sonda:**

- 1) Aplicar 3  $\mu\text{L}$  de sonda na área marcada da suspensão celular, cobrir com uma lamela e selar com a cola;
- 2) Desnaturar a sonda e a amostra por colocação na placa de aquecimento a 80°C durante 5 minutos.

### **Hibridação:**

Incubar a lâmina numa caixa húmida na estufa a 37°C *overnight*.

### **Lavagem:**

- 1) Retirar, cuidadosamente a cola e a lamela;
- 2) Colocar a lâmina no coplin 1 durante 2 minutos;
- 3) Transferir a lâmina para o coplin 2 durante 2 min (banho-maria a 72°C);
- 4) Colocar a lâmina no coplin 3 durante 1 minuto;
- 5) Colocar nos coplins 4, 5 e, posteriormente, 6 durante 30 segundos.

### **Contraste:**

- 1) Deixar a lâmina secar durante 2 min no escuro;
- 2) Aplicar 4  $\mu\text{L}$  de DAPI;
- 3) Cobrir com uma lamela, retirar cuidadosamente, o excesso de DAPI e as bolhas que se possam ter formado;
- 4) Guardar a lâmina numa caixa de alumínio no frigorífico a 4°C durante, pelo menos, 15 minutos;

