



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Miguel Frutuoso Lucas

**ESTUDO DE CASOS CLÍNICOS DE TESTES DE
DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ E PÓS-NATAL**

VOLUME 1

**Dissertação no âmbito do Mestrado de Genética Clínica Laboratorial
orientada pela Professora Doutora Isabel Maria Marques Carreira e pela
Mestre Susana Isabel Canas Ferreira e apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de Coimbra**

Setembro de 2023

Agradecimentos

Agradeço a todos os que me acompanharam e ajudaram de uma maneira ou outra na realização deste trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Isabel Marques Carreira, minha orientadora e professora durante o mestrado, por me ter permitido estagiar no seu laboratório e me ter transmitido o seu conhecimento com entusiasmo contagiante ao longo do meu percurso nestes dois anos.

Agradeço à Professora Doutora Joana Barbosa de Melo por todo o apoio e conhecimento que me transmitiu no decorrer do mestrado.

Agradeço à minha coorientadora Susana Ferreira pela orientação e apoio ao longo do estágio. A sua experiência, incentivo, amizade e dedicação foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço a toda a equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Alexandra Mascarenhas, Ana Jardim, Carla Henriques, Cláudia Pais, Lúcia Simões, Luís Miguel Pires, Mariana Val, Marta Pinto, Nuno Lavoura, Patrícia Paiva e Pedro Veiga, por fazerem sentir parte da equipa e me acolherem com a vossa amizade, conhecimento e disponibilidade para ajudar no decurso de todo o estágio.

Agradeço aos meus colegas, Miriam Gabriela, Nathan DeWilde, Zé Tiago pelos momentos que passámos, apoio e amizades que construímos nesta jornada desafiante.

Agradeço à minha família e amigos especialmente aos meus pais que me sempre apoiaram incondicionalmente e incentivaram neste percurso, ajudando-me com todo o amor que me conseguiram dar o que foi essencial para ultrapassar vários obstáculos ao longo desta jornada.

Índice

Agradecimentos	II
Índice	III
Lista de figuras	V
Lista de tabelas	IX
Lista de abreviaturas	X
Resumo	XII
Abstract	XIII
Capítulo I- Introdução.....	1
1.1. Objetivo do estágio curricular	1
1.2. Descrição do laboratório	2
Capítulo II- História da citogenética e genética molecular.....	3
Capítulo III- Cromossomas e ciclo celular	7
3.1. O cromossoma	7
3.2. Ciclo celular.....	8
Capítulo IV- Anomalias cromossómicas.....	10
4.1. Anomalias cromossómicas numéricas.....	10
4.2. Anomalias cromossómicas estruturais	11
4.3. Dissomia uniparental	13
4.4. Mosaicismo	14
Capítulo V- Testes de rastreio e diagnóstico pré-natal.....	15
5.1. Testes de rastreio pré-natal.....	15
5.1.1. Testes de rastreio pré-natal no primeiro trimestre.....	15
5.1.2. Testes de rastreio pré-natal no segundo trimestre	15
5.1.3. Testes de rastreio pré-natal no terceiro trimestre	16
5.1.4. Testes de rastreio pré-natal não invasivo.....	16
5.2. Testes de diagnóstico genético pré-natal.....	16
5.2.1. Biópsia das vilosidades coriónicas	17
5.2.2. Amniocentese	18
5.2.3. Cordocentese	19
Capítulo VI- Citogenética convencional	19
6.1. Colheita e transporte de amostras	20
6.1.1. Amostras de tecido sólido	21
6.1.2. Amostras de líquido amniótico	21
6.1.3. Amostras de sangue periférico	21
6.2. Estabelecimento de cultura	21
6.2.1. Cultura de vilosidades coriónicas.....	22
6.2.2. Cultura de amniócitos.....	24
6.2.3. Cultura de sangue periférico.....	25

6.2.4. Cultura de fibroblastos	25
6.3. Manipulação	25
6.4. Espalhamento	27
6.5. Bandagem	28
6.5.1. Bandagem GTL	28
6.5.2. Bandagem CBG.....	30
6.5.3. Bandagem AgNOR.....	30
6.6. Análise das metafases ao microscópio	30
6.7. Nomenclatura	32
6.8. Criopreservação das culturas celulares	33
Capítulo VII- Citogenética molecular	34
7.1. <i>Fluorescent in-situ hybridization</i>	35
Capítulo VIII- Genética molecular e genómica	38
8.1. Extração e quantificação de DNA	39
8.2. <i>Quantitative fluorescent polymerase chain reaction</i>	40
8.2.1. Despiste de contaminação materna	43
8.3. Diagnóstico da síndrome de X-Frágil	44
8.4. <i>Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)</i>	47
8.5. <i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>	50
8.5.1. <i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>	52
Capítulo IX- Fase Pós-Analítica	53
Capítulo X- Análise de Casos Clínicos.....	55
10.1. Caso Clínico 1	56
10.2. Caso Clínico 2	58
10.3. Caso Clínico 3	59
10.4. Caso Clínico 4	60
10.5. Caso Clínico 5	62
10.6. Caso Clínico 6	66
10.7. Caso Clínico 7	69
10.8. Caso Clínico 8	74
Conclusão.....	75
Referências	77

Lista de figuras

Figura 1- Descoberta do complemento cromossómico humano.

Figura 2- Cariótipo bandado com a técnica de bandagem G utilizando o corante Giemsa.

Figura 3- Técnica de FISH em cromossomas humanos.

Figura 4- Componentes estruturais de cromossomas em metafase.

Figura 5- Representação esquemática das diferentes fases da mitose e da meiose.

Figura 6- Esquema exemplificativo de segregações possíveis de um par de cromossomas na meiose.

Figura 7- Alterações cromossómicas equilibradas.

Figura 8- Alterações cromossómicas desequilibradas.

Figura 9- Mecanismos de formação de dissomia uniparental.

Figura 10- Esquema da técnica de biópsia transcervical de vilosidades coriónicas.

Figura 11- Esquema da técnica de amniocentese.

Figura 12- Câmara de fluxo laminar.

Figura 13- Separação do material materno do material fetal de vilosidades coriónicas à lupa.

Figura 14- Estufas para crescimento das culturas celulares.

Figura 15- Avaliação do crescimento celular das culturas estabelecidas.

Figura 16- Cultura celular antes do tratamento de colcemida e depois do tratamento de colcemida.

Figura 17- Avaliação do espalhamento.

Figura 18- Procedimento de bandagem GTL.

Figura 19- Avaliação da qualidade da bandagem.

Figura 20- Idiograma do cromossoma 2 indicando a localização 2p11.2.

Figura 21- Efeitos dos diferentes tempos de congelamento na morfologia intracelular.

Figura 22- Sondas centroméricas para os cromossomas X, Y e 18 observadas por FISH.

Figura 23- Sondas de pintura cromossômica para os cromossomas 18 e 22 observadas por FISH.

Figura 24- Sondas de sequência única para o gene ***RAI1*** observadas por FISH.

Figura 25- Esquema do processo de extração de DNA usando colunas de sílica.

Figura 26- Eletroferograma de um QF-PCR de um indivíduo do sexo feminino com trissomia do cromossoma 18.

Figura 27- Eletroferograma do PCR convencional numa amostra do sexo masculino com uma pré-mutação do gene ***FMR1***.

Figura 28- Eletroferograma do TP-PCR numa amostra do sexo feminino com uma pré-mutação do gene ***FMR1***.

Figura 29- Protocolo da técnica de aCGH.

Figura 30- Representação esquemática de uma sonda de MLPA.

Figura 31- Protocolo da técnica de MLPA.

Figura 32- Protocolo da técnica de MS-MLPA.

Figura 33- Cariograma representativo de uma linha celular 47,XX,+15 do caso 1.

Figura 34- Cariograma representativo de uma linha celular 46,XX do caso 1.

Figura 35- Cariograma representativo do caso 1.

Figura 36- Cariograma representativo do caso 2.

Figura 37- Cariograma representativo do caso 3.

Figura 38- Resultado do aCGH do cromossoma 10 da criança do caso 4.

Figura 39- Genes englobados no CNV do cromossoma 10 da criança do caso 4.

Figura 40- Resultado do aCGH do cromossoma 10 dos progenitores da criança do caso 4.

Figura 41- Resultado do aCGH do cromossoma 10 do feto do caso 5.

Figura 42- Genes englobados no CNV do cromossoma 10 do feto do caso 5.

Figura 43- Resultado do aCGH do cromossoma 18 do feto do caso 5.

Figura 44- Genes englobados no CNV do cromossoma 18 do feto do caso 5.

Figura 45- Resultado dos cariótipos dos progenitores e feto do caso 5.

Figura 46- Resultado do aCGH do cromossoma 14 do feto do caso 6.

Figura 47- Genes englobados no CNV do cromossoma 14 do feto do caso 6.

Figura 48- Confirmação da deleção detetada no feto do caso 6 por MLPA.

Figura 49- Análise de MLPA aos progenitores do feto do caso 6.

Figura 50- Análise de MS-MLPA do feto do caso 6

Figura 51- Eletroferograma do PCR para a deteção do número de tripletos CGG no gene FMR1 do pai do caso 7.

Figura 52- Eletroferograma do TP-PCR para a deteção do número de tripletos CGG no gene FMR1 do pai do caso 7.

Figura 53- Eletroferograma do QF-PCR para o despiste das aneuploidias mais comuns no feto 1 do caso 7.

Figura 54- Eletroferograma do QF-PCR para o despiste das aneuploidias mais comuns no feto 2 do caso 7.

Figura 55- Eletroferograma do TP-PCR para a detecção do número de tripletos CGG no gene *FMR1* do feto 1 do caso 7.

Figura 56- Eletroferograma do TP-PCR para a detecção do número de tripletos CGG no gene *FMR1* do feto 2 do caso 7.

Figura 57- Locais de hibridização do kit de sondas FISH utilizadas no caso 8.

Figura 58- Observação de células em interfase após a técnica de FISH com o kit de sondas centroméricas para os cromossomas 18, X e Y do sistema FAST-FISH da *Cytocell-Aquarius*® no caso 8.

Lista de tabelas

Tabela 1- Grupos de cromossomas.

Tabela 2- Tempo de resposta máximo recomendado baseado no tempo de cultura de determinada amostra biológica.

Tabela 3- Tempo de resposta máximo recomendado baseado no tipo de teste requerido.

Tabela 4- Taxa de sucesso mínima baseado no tipo de amostra biológica.

Lista de abreviaturas

β-HCG livre- Subunidade β livre da hormona gonadotrófica coriónica

aCGH- *Array Comparative Genomic Hybridization*

ACSS- Administração Central do Sistema de Saúde

AFP- α-feto proteína

Bandagem CBG- Bandagem de regiões centroméricas e heterocromatina

cffDNA- *Cell-free fetal DNA*

CMA- *Chromosomal microarray*

CNV- *Copy number variant*

CPM- *Confined placental mosaicism*

CRA- *Chromosome resolution additive*

DMSO- Dimetilsulfóxido

dNTP- Desoxirribonucleotídeos fosfatados

ESGH- *European Board of Medical Genetics da European Society of Human Genetics*

FBS- Soro bovino fetal

FISH- *Fluorescence In Situ Hybridization*

FMR1- *Fragile X messenger ribonucleoprotein 1*

FMRP- *Fragile X messenger ribonucleoprotein*

FXPOI- *Fragile X-associated premature ovarian insufficiency*

FXS- Fragile X Syndrome

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

GenQA- *Genomics Quality Assessment*

hCG- Human Chorionic Gonadotropin

HCl- Ácido clorídrico

ISCN- *International System for Human Cytogenomic Nomenclature*

KCl- Cloreto de potássio

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

MLPA- *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*

MS-MLPA- *Methylation Specific MLPA*

MTX- Metotrexato

NaCl- Cloreto de sódio

NGS- *Next-generation sequencing*

NIPT- *Non-Invasive Prenatal Testing*

NOR- Bandagem de regiões organizadoras do nucléolo

PAPP-A- Proteína plasmática A associada à gravidez

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

PHA- Fitohemaglutinina

Q- Bandagem com quinacrina mostarda

QF-PCR- *Quantitative Fluorescence PCR*

Bandagem R- Bandagem reversa

SNP- *Single nucleotide polymorphism*

SSC- Citrato de sódio salino

STR- *Short tandem repeat*

TP-PCR- *Triple Repeat Primed PCR*

uE3- Estriol livre

UK NEQAS Consortium- *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

UPD- *Uniparental disomy*

UTR- *Untranslated region*

Resumo

As técnicas de diagnóstico genético têm um papel cada vez mais importante no que toca a atribuir uma causa genética a casos onde se verificam fenótipos anormais quer num contexto pré-natal quer num contexto pós-natal.

Com a célere evolução tecnológica vieram um grande leque de técnicas sofisticadas de diagnóstico genético que fornecem resultados mais adequados às especificidades de cada caso clínico. As diversas técnicas de diagnóstico genético podem ser divididas em duas categorias: a citogenética e a genética molecular.

A citogenética foca-se no estudo dos cromossomas, a sua estrutura e função de modo a possibilitar encontrar alterações cromossómicas possivelmente patogénicas. A citogenética convencional permite o estudo de todo o complemento cromossómico, porém tem uma resolução baixa demais para possibilitar a deteção de rearranjos cromossómicos sub-microscópicos.

Para a deteção destes rearranjos cromossómicos sub-microscópicos são necessárias técnicas com um maior poder de resolução, como a técnica de citogenética molecular FISH, que utiliza sondas específicas para a sequência genética em estudo, ou técnicas de genética molecular como aCGH, que utiliza painéis de sondas que cobrem grande parte do genoma capazes de detetar CNVs não detetáveis por citogenética convencional.

Existem outras técnicas de genética molecular como PCR, TP-PCR, QF-PCR, MLPA e MS-MLPA e todas são essenciais no estudo de casos clínicos de diagnóstico pré ou pós-natal tendo todas as suas vantagens e as suas desvantagens. Uma desvantagem que estas técnicas partilham é a incapacidade de detetar rearranjos cromossómicos equilibrados, uma vez que apenas detetam CNVs. A citogenética convencional é necessária para detetar estes rearranjos.

Deste modo as técnicas de citogenética e genética molecular são complementares e consoante as indicações clínicas de determinado caso é necessário determinar quais destas técnicas serão as mais eficientes para a obtenção de resultados relevantes para o diagnóstico do paciente.

O objetivo deste estágio foi relacionar o conhecimento teórico com o trabalho laboratorial e adquirir competências práticas e teóricas de modo a ganhar capacidade interpretativa que me permita determinar o melhor procedimento de estudo de um caso consoante as indicações clínicas, assim como, interpretar resultados e expô-los de forma perceptível para o paciente e clínico responsável, respeitando simultaneamente as normas de ética e as *guidelines* de comunicação de resultados.

Palavras-chave: Citogenética Convencional; Citogenética Molecular; Genética Molecular; Casos Clínicos; Diagnóstico Pré e Pós-natal

Abstract

Genetic diagnostic techniques are playing an increasingly important role in attributing a genetic cause to cases where abnormal phenotypes are observed, both in a prenatal and postnatal context. With the rapid technological advancement, a wide range of sophisticated genetic diagnostic techniques has emerged, providing more tailored results for the specifics of each clinical case. These various genetic diagnostic techniques can be divided into two categories: cytogenetics and molecular genetics.

Cytogenetics focuses on the study of chromosomes, their structure, and function, aiming to identify potentially pathogenic chromosomal alterations. Conventional cytogenetics allows for the study of the entire chromosomal complement, but it has a resolution that is too low to detect submicroscopic chromosomal rearrangements.

To detect these submicroscopic chromosomal rearrangements, techniques with higher resolution are needed, such as the *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) molecular cytogenetic technique, which uses specific probes for the genetic sequence under investigation, or molecular genetic techniques like aCGH, which employs probe panels covering a significant portion of the genome, capable of detecting CNVs not detectable by conventional cytogenetics.

Other molecular genetic techniques like PCR, TP-PCR, QF-PCR, MLPA, and MS-MLPA are also essential in studying clinical cases for prenatal or postnatal diagnosis, each having their advantages and disadvantages. A common disadvantage they all share is the inability to detect balanced chromosomal rearrangements, as they only detect CNVs. Conventional cytogenetics is necessary to identify these rearrangements.

Thus, cytogenetic and molecular genetic techniques are complementary, and depending on the clinical indications of a specific case, it's necessary to determine which of these techniques will be the most efficient in obtaining relevant diagnostic results for the patient.

The goal of this internship was to connect theoretical knowledge with laboratory work, acquiring practical and theoretical skills to develop interpretative capacity. This capacity allows for determining the best study procedure for a case based on its clinical indications, as well as interpreting and communicating results understandably to the patient and responsible clinician, while simultaneously respecting ethical norms and result communication guidelines.

Keywords: Conventional cytogenetics; Molecular Cytogenetics; Molecular Genetics; Clinical cases; Pre and Postnatal Diagnosis

Capítulo I- Introdução

1.1. Objetivo do estágio curricular

O estágio curricular, inserido no mestrado de Genética Clínica Laboratorial, teve como objetivo meter em prática os conhecimentos adquiridos no decorrer do prévio ano letivo do mestrado e ao mesmo tempo adquirir novos conhecimentos enquanto, simultaneamente, se obtém uma perspetiva do trabalho realizado num laboratório de diagnóstico genético e em como integrar uma equipa multidisciplinar de profissionais competentes adaptando-me concomitantemente à sua dinâmica de trabalho. O estágio é uma ferramenta essencial para aplicar os conhecimentos teóricos, adquiridos previamente, em prática em casos reais ao fomentar o espírito crítico ao discernir qual a estratégia mais adequada a cada caso consoante a sua respetiva indicação clínica, a aplicação eficiente da técnica adequada, a interpretação competente dos resultados e a elaboração dos respetivos relatórios dos casos de maneira clara, sucinta e completa. O culminar de todas as competências adquiridas neste estágio são essenciais para a minha futura integração num laboratório similar.

O estágio teve lugar no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC), com uma duração de aproximadamente 9 meses, dos quais os primeiros 4 meses foram dedicados à prática de técnicas, procedimentos laboratoriais e análise e resolução de casos clínicos na área de citogenética convencional e citogenética molecular, os seguintes 4 meses foram direcionados para a prática de técnicas, procedimentos laboratoriais e análise e resolução de casos clínicos na área de genética molecular, sendo que o último mês foi dedicado à cimentação de conhecimentos e procedimentos praticados no decurso deste estágio curricular.

Os objetivos principais do estágio curricular foram:

- Relacionar o conhecimento teórico adquirido nas unidades curriculares do mestrado com o trabalho laboratorial realizado;
- Adquirir competências práticas e teóricas necessárias para aplicar num enquadramento Genético Clínico Laboratorial profissional;
- Desenvolver o pensamento crítico de forma a conseguir discernir o melhor processo de estudo de cada caso clínico;
- Ganhar conhecimento dos dados necessários e como expô-los de maneira sucinta e perceptível para o paciente seguindo simultaneamente as regras de nomenclatura e de comunicação de resultado recomendadas pelo *International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN)*;
- Criar habilidades interpessoais transversais importantes para a harmonia num ambiente profissional.

1.2. Descrição do laboratório

O LCG-FMUC iniciou a sua atividade no início da década de 90 não só na área de diagnóstico genético pré e pós-natal como também, uma vez que faz parte de uma universidade, na área da investigação compreendendo várias áreas. A culminação dos fatores anteriormente referidos permite a este laboratório estabelecer colaborações distintas com unidades de investigação, hospitais e universidades quer portuguesas quer estrangeiras.

Este laboratório conta com uma equipa dinâmica, multidisciplinar, empreendedora e dedicada, coordenada pela Professora Doutora Isabel Marques Carreira e constituída por três docentes, nove técnicos superiores, reconhecidos pela Administração Central do Sistema de Saúde (ACSS), dos quais 7 são também reconhecidos como Especialistas Europeus em Genética Clínica Laboratorial, titulados pelo *European Board of Medical Genetics da European Society of Human Genetics (ESGH)*, uma técnica de diagnóstico e terapêutica e uma administrativa.

O LCG-FMUC, ao investir nas tecnologias mais recentes e avançadas e na formação técnica, tem implementado um leque extensivo de técnicas aplicadas no diagnóstico pré e pós-natal, nomeadamente: *Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT)*; *Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)*; Citogenética convencional com o estudo do cariótipo; Citogenética molecular com *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*; Diagnóstico do Síndrome de X-frágil por *Polymerase Chain Reaction (PCR)* e por *Triplet Repeat Primed PCR (TP-PCR)*; *Quantitative Fluorescence PCR (QF-PCR)*; *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)*; *Methylation Specific MLPA (MS-MLPA)*.

No LCG-FMUC existe um ênfase extensivo no que toca à gestão de qualidade em todas as suas vertentes pelo que se submete anualmente a diferentes controlos de qualidade externo do *Genomics Quality Assessment (GenQA)* e é membro do consórcio *United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS Consortium)*, tendo sempre obtido avaliações de excelente e é certificado pela norma ISO 9001:2015.

O laboratório está estruturado de forma que todos os diferentes tipos de técnicas efetuadas tenham um *workflow* eficiente obedecendo a todas as recomendações e normas em vigor.

Capítulo II- História da citogenética e genética molecular

O primeiro relato de observação de cromossomas ocorreu em 1842 quando o botânico suíço Karl Nägeli descobriu a existência de cromossomas quando observou umas estruturas filamentosas na divisão celular na formação de pólen da planta *Tradescantia*^[1]. Mais tarde, em 1865 Mendel desenvolveu com as suas experiências as 3 leis mendelianas da hereditariedade através da observação de características específicas da planta da ervilha (*Pisum sativum*). A lei da segregação, que afirma que os alelos de cada gene são segregados na meiose para que, em cada gâmeta apenas tenha um alelo de cada gene. A lei da dominância que dita que existem alelos dominantes e alelos recessivos sendo que organismos heterozigóticos com um alelo dominante irá manifestar o fenótipo desse alelo e o fenótipo do alelo recessivo não se irá expressar. A lei da segregação independente que diz que os alelos são independentes da segregação de outros alelos^[2].

Em 1870 Walther Flemming corou pela primeira vez estruturas filamentosas com anilina a qual as nomeou de cromatina^[3] que mais tarde associou a umas estruturas filiformes, estas foram nomeadas, em 1888, por Waldeyer-Hartz, colega de Flemming, de cromossomas^[4]. Mais tarde, em 1923 Theophilus Painter estimou a quantidade de cromossomas como 48 através de núcleos reconstruídos de cortes de testículos humanos em parafina e corados com hematoxilina de ferro, porém, em 1956 Tjio e Levan usaram culturas de fibroblastos pulmonares embrionários de humanos em fluido amniótico bovino e provaram, através da observação de metafases das células em cultura que células humanas têm 23 pares de cromossomas^[5] ([Figura 1](#)). Em 1959, Lejeune descobriu que síndrome de Down era resultante de um cromossoma 21 supranumerário após o estudo do cariótipo de 9 crianças com sintomas de síndrome de Down^[6] estabelecendo, pela primeira vez na história, a ligação entre uma anomalia cromossômica e uma patologia conhecida. Após esta descoberta, também em 1959, outras duas aneuploidias foram caracterizadas, a síndrome de Klinefelter, por Jacobs e Strong como tendo um complemento cromossômico 47,XXY^[7] e a síndrome de Turner foi caracterizada também no mesmo ano por Ford como tendo um complemento cromossômico 45,X^[8].

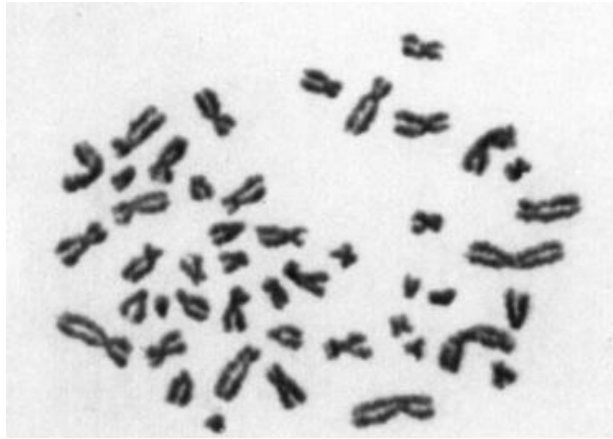


Figura 1- Descoberta do complemento cromossômico humano através da observação de metafases de fibroblastos pulmonares humanos. Fonte: Tjio, J.H. and Levan, A. (1956), "The chromosome number of man." *Hereditas*, 42: 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1956.tb03010.x>.

A descoberta do número correto de cromossomas por Tjio e Levan despertou novamente um interesse no desenvolvimento de novas técnicas de bandagem para a melhor classificação dos cromossomas e identificação de anomalias congénitas e em 1970 Casperson *et al.* publicaram um estudo utilizando a técnica de bandagem de quinacrina mostarda (Q) por eles inventada, usando um agente fluorescente que se liga ao DNA, a quinacrina mostarda, que permitiu-lhes identificar, através do padrão fluorescente criado, os 24 diferentes cromossomas a partir de metafases^[9]. Mais tarde, em 1971, foi desenvolvida a técnica de bandagem G por Drets e Shaw ao aplicarem um tratamento com corante de Giemsa, revelando uma bandagem altamente específica que se provaria útil a identificar rearranjos estruturais nos cromossomas^[10] (Figura 2). Para além da previamente mencionada bandagem G, nesse mesmo ano foram desenvolvidos os tipos de bandagem de centrómeros (Bandagem CBG), por Arrighi e Hsu, que cora as regiões centroméricas dos cromossomas^[11] e reverse (Bandagem R), por Dutrillaux e Lejeune, que cora os cromossomas de forma inversa à bandagem G, complementando-a^[12]. Mais tarde, em 1975 bandagem de regiões organizadoras do nucléolo (NOR) foi inventada por Goodpasture e Bloom^[13].

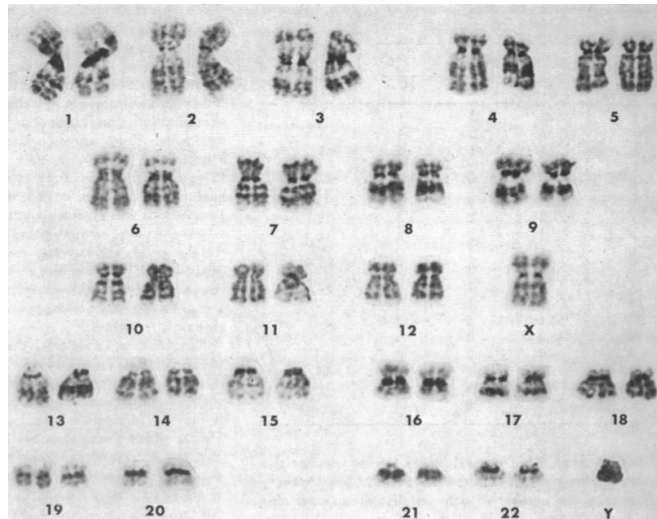


Figura 2- Cariótipo bandado com a técnica de bandagem G, utilizando o corante Giemsa permitindo a visualização dos padrões de bandas distintos dos diferentes cromossomas. Fonte: Drets, M. E., & Shaw, M. W. (1971). *Specific banding patterns of human chromosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9), 2073–2077. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.9.2073> .

As técnicas de bandagem foram um grande passo no que toca à identificação e caracterização de anomalias cromossômicas, porém estas tinham uma resolução limitada de 5-10Mb, dificultando a identificação de certas anomalias cromossômicas. Em 1980 FISH foi utilizado pela primeira vez usando sondas de RNA fluorescentes que hibridizaram com DNA *in situ* e eram detetadas após uma autoradiografia por Bauman, Wiegant, Borst e van Dujin^[14]. Em 1986 Pinkel e Gray desenvolveram FISH de interfase e metafase (Figura 3) para diagnóstico clínico o que impactou a área do diagnóstico sendo um marco importante facilitando a detecção de aneuploidias em mosaico e de alterações cromossômicas estruturais, permitindo detetar arranjos estruturais sub-microscópicos que não eram detetáveis por técnicas de citogenética convencional^[15].

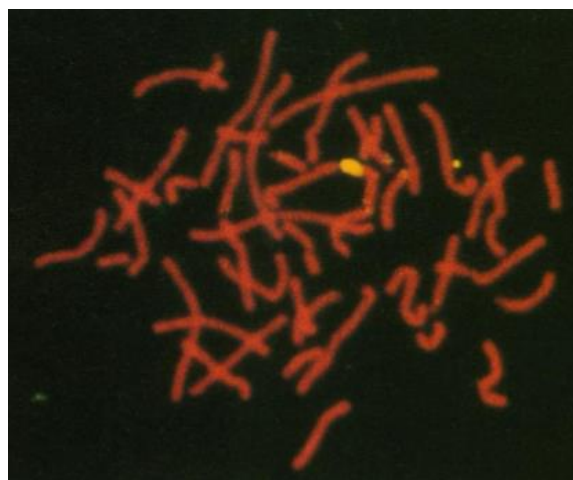


Figura 3- Técnica de FISH em cromossomas humanos com a sonda específica corada com fluoresceína para o cromossoma Y pY431A em linfócitos de humanos do sexo masculino. Adaptado de Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986). *Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), 2934–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934> .

A invenção da técnica *polymerase chain reaction* (PCR) em 1983 por Kary Mullis foi um dos maiores marcos da história da biologia molecular permitindo, através de vários ciclos de desnaturação, hibridização e extensão da cadeia de DNA com uma polimerase, multiplicar exponencialmente de forma específica a sequência alvo com o auxílio de *primers* específicos, esta técnica é indispensável em biologia molecular uma vez que permite gerar milhões de sequências de DNA através de pouco material permitindo a realização de estudos necessários^[16]. Em 1992 Kallioniemi desenvolveu a técnica de *array comparative genomic hybridization* (aCGH) que produz um mapa de *copy number variants* (CNVs) em várias localizações cromossômicas em todo o genoma ao hibridizar essas regiões com fluorocromos e analisar a *ratio* de intensidade de cada um numa região cromossômica específica^[17]. A técnica de *Quantitative fluorescent polymerase chain reaction* foi descrita em 1993 por Mansfield onde, ao acoplar os marcadores polimórficos de *short tandem repeats* (STRs) com PCR, possibilitou a detecção das aneuploidias mais comuns através da análise quantitativa da fluorescência emitida pelos *primers* específicos para as regiões com STRs, sendo esta uma alternativa mais rápida e menos dispendiosa que a detecção por citogenética convencional ou por FISH^[18]. Em 2002 Schouten desenvolveu o método de *multiplex ligation dependent probe amplification* que permitia analisar 40 sequências de DNA diferentes em simultâneo com pouca quantidade de DNA ao amplificar sondas específicas para essas mesmas sequências e comparando-as com sequências de referência permitindo detetar CNVs^[19].

Next-generation sequencing (NGS) é uma tecnologia recente que revolucionou o mundo da genômica, com a primeira tecnologia introduzida em 2005, esta técnica de NGS permitiu a sequenciação de genomas a um ritmo superior e com um custo menor do que era previamente possível e com a sua contínua evolução, esta tecnologia provou ser uma ferramenta poderosa para a genética clínica moderna^[20]. Em 2011 *non-invasive prenatal testing* foi introduzido em contexto clínico em Hong Kong, este método de rastreio provou ser bastante sensível com uma taxa de falsos positivos bastante baixa quando comparada com a taxa de falsos positivos de outros testes de rastreio como o rastreio ecográfico ou rastreio usando marcadores bioquímicos. Porém este é apenas um teste de rastreio uma vez que analisa o *cell-free fetal DNA* (cffDNA) que não deriva diretamente das células do feto, mas sim de células de trofoblasto da placenta que após serem fragmentadas libertam também DNA fetal fragmentado para a circulação materna. Este teste de rastreio é muito importante uma vez que, o facto de não haver risco de aborto ao realizar o teste juntamente com a alta sensibilidade do mesmo é uma boa opção para grávidas que optam por não passar o risco de um teste de diagnóstico invasivo^[21].

Capítulo III- Cromossomas e ciclo celular

3.1. O cromossoma

O DNA presente numa célula humana é incrivelmente extenso tendo cerca de 2 metros quando completamente distendido, para estar compactado numa estrutura tão pequena como o núcleo celular, o DNA precisa de ser altamente compactado. Este nível de compactação é originado através de vários níveis de condensação: O primeiro nível é a hélice dupla de DNA, o segundo nível é a hélice dupla de DNA enrolada duas vezes num octâmero de histonas formando um nucleossoma que são ligados por um segmento de histonas e depois enrolados novamente formando um solenoide sendo este o terceiro nível de condensação. Estes solenoides vão ser armazenados em domínios de DNA e estes vão ser novamente enrolados formando então os cromossomas^[22].

Um cromossoma é constituído por dois cromatídeos irmãos, cada um contendo um braço longo (q), um braço curto (p) e telómeros nas terminações de cada braço. O cromossoma contém também um centrómero entre os braços curtos e os braços longos e para além disso, nos cromossomas acrocêntricos existem regiões organizadoras do nucléolo que estão localizadas em *stalks* satélite nos cromossomas acrocêntricos^[22] (Figura 4).

O cromossoma é identificado segundo o seu tamanho, posição do centrómero podendo ser metacêntrico, sub-metacêntrico ou acrocêntrico, e o padrão de bandas. A identificação dos cromossomas permite a definição do cariótipo, que é característico de cada espécie. A identificação dos cromossomas e o estudo do seu padrão de bandas permite a deteção de possíveis alterações numéricas ou estruturais presentes nos cromossomas de um paciente^[22].

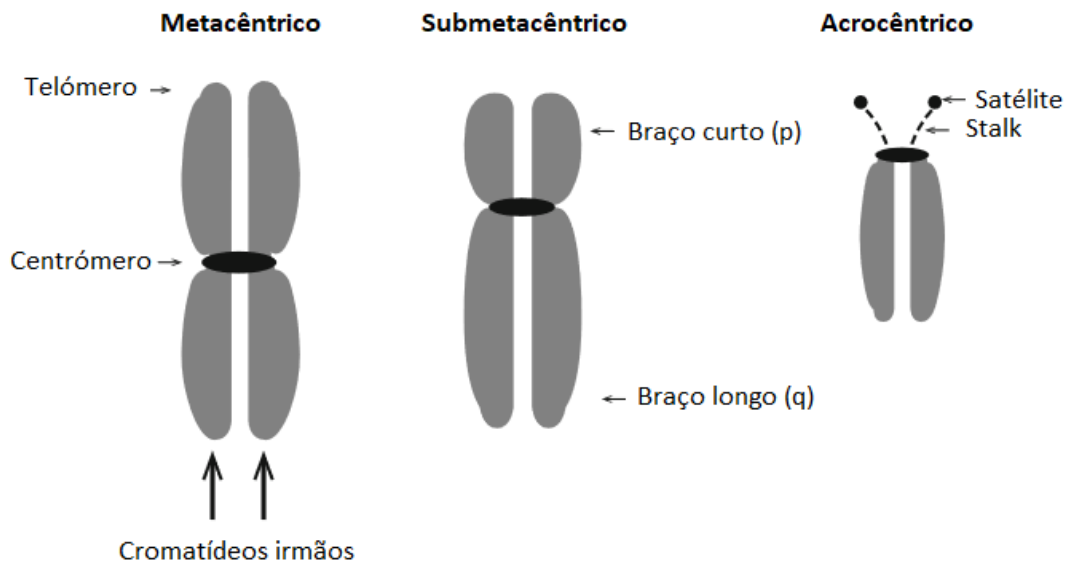


Figura 4- Componentes estruturais de cromossomas em metáfase e sua classificação consoante a posição do centrômero. Adaptado de Gersen, S. L., & Keagle, M. B. (2013). *The principles of clinical cytogenetics*. Springer.

3.2. Ciclo celular

A realização do estudo Citogenético Convencional (estudo do cariótipo) permite a identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais (tanto desequilibradas como equilibradas) com um limite de resolução de cerca de 5-10Mb. Para estudar o cariótipo são necessárias células em divisão, nomeadamente em metáfase (etapa do ciclo celular em que os cromossomas atingem o grau de condensação mais elevado) [\[22\]](#).

Existem dois tipos de divisão celular, a mitose e a meiose. A mitose é uma etapa do ciclo celular e é um processo onde células eucarióticas se dividem em duas células nucleadas após a interfase, onde ocorre a replicação de DNA. A mitose consiste em várias etapas onde a célula organiza os seus constituintes para a divisão celular na citocinese, isto é alcançado com o auxílio de um fuso mitótico. Este é formado por constituintes do citoesqueleto como microtúbulos e outras proteínas, ao qual se ligam aos cromossomas na prometáfase (após a sua condensação na prófase) e os organiza simetricamente num plano equatorial para que na próxima etapa, a anáfase, o fuso mitótico separe os cromátídeos irmãos para polos opostos da célula. Na próxima fase, a telófase, são formados dois núcleos distintos que, através da citocinese, se separarão para formar duas células diploides distintas [\[23\]](#) (Figura 5).

A meiose é o processo de divisão celular, que faz parte do ciclo celular e que ocorre na formação dos gametas. Isto é atingido através de duas divisões celulares, a meiose I e a meiose II. Na prófase da meiose I ocorre o *crossing-over* dos cromossomas homólogos trocando fragmentos de DNA entre cromátídeos não irmãos. Os cromossomas são depois alinhados no plano equatorial através do fuso acromático e

posteriormente, os cromossomas homólogos são deslocados para polos opostos da célula, separando-se. De seguida, na telófase, há a formação de dois núcleos com metade do número de cromossomas. No início da meiose II os cromossomas têm dois cromátídeos irmãos, estes cromossomas são condensados na prófase II e são alinhados, na metafase II, no plano equatorial através do fuso acromático. Os cromátídeos irmãos são depois separados para polos opostos da célula anáfase II. Na telófase II, são formadas membranas nucleares à volta de cada conjunto de cromossomas em cada polo da célula que, após a citocinese, se irão formar em novas células haploides. Neste ciclo celular ocorre a formação de quatro células haploides, os gâmetas, a partir de uma célula diploide^[24] (Figura 5).

A meiose em termos de reprodução é um processo importante uma vez que facilita a redução das células para um estado haploide permitindo a herança de metade do complemento cromossómico de cada progenitor ao acaso, que conjugado com o fenómeno de *crossing-over* aumenta em grande escala a variabilidade genética de um indivíduo^[25]. Erros no processo da meiose são responsáveis por grande parte de alterações cromossómicas, principalmente erros de não-disjunção e erros de *crossing-over* que podem provocar anomalias cromossómicas.

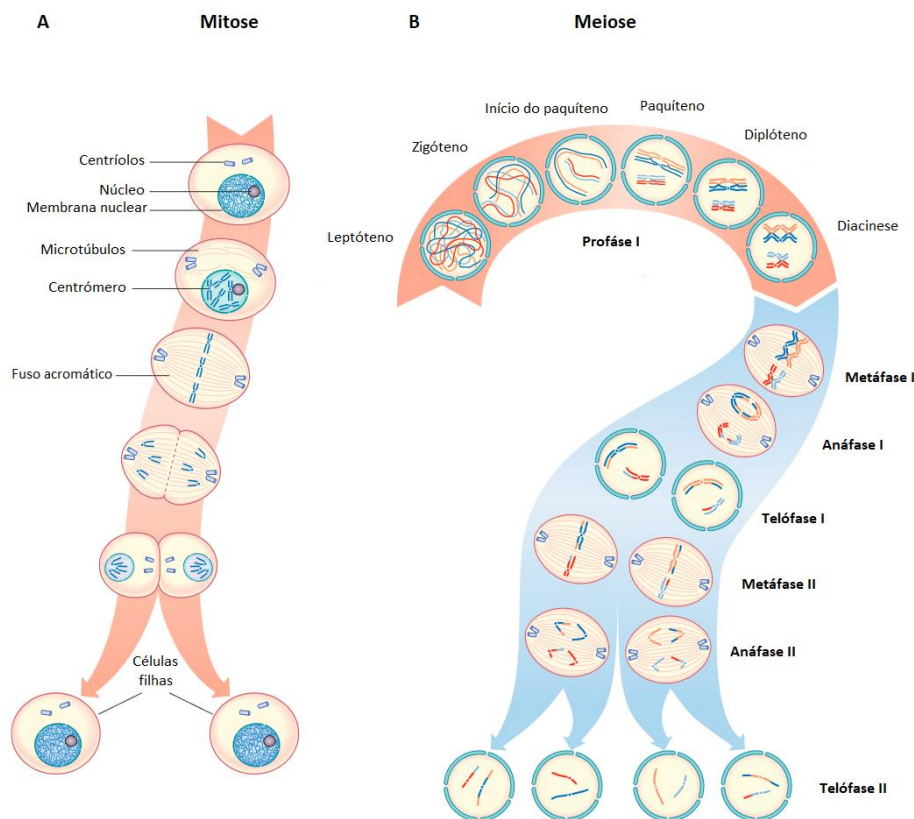


Figura 5- Representação esquemática das diferentes fases da (A) mitose e da (B) meiose. Adaptado de Turnpenny, P. D., Ellard, S., & Cleaver, R. (2022). *Emery's elements of medical genetics and Genomics*. Elsevier.

Capítulo IV- Anomalias cromossômicas

Anomalias cromossômicas são uma causa significativa de abortos espontâneos, infertilidade, anomalias congênitas e déficit intelectual e podem ocorrer tanto nos autossomas como nos cromossomas sexuais. Estas anomalias cromossômicas podem ser classificadas em anomalias cromossômicas numéricas e anomalias cromossômicas estruturais e podem ser constitucionais (surtem nos gâmetas ou células embrionárias) ou adquiridas (surtem em células somáticas)^[26].

4.1. Anomalias cromossômicas numéricas

Estes tipos de anomalias cromossômicas podem ser divididos em aneuploidias e euploidias:

Aneuploidias são as anomalias cromossômicas mais frequentes em humanos e envolvem erros na segregação de cromossomas na meiose ou mitose o que leva à produção de células com um cromossoma supranumerário ou com um cromossoma em falta. Existem dois mecanismos que causam erros de segregação cromossômica na divisão celular mitótica e meiótica. A não-disjunção meiótica ([Figura 6](#)) ou mitótica (mecanismo principal dos erros de segregação de cromossomas) que pode produzir células monossômicas ou trissômicas e *anaphase lag* que produz células monossômicas. É estimado que cerca de 5% das gravidezes são aneuploidias e na maior parte dos casos, uma aneuploidia constitui um desequilíbrio genético demasiado significativo para que haja um nado-vivo, porém existem exceções como trissomia 13 (síndrome de Patau), trissomia 18 (síndrome de Edwards), trissomia 21 (síndrome de Down) e aneuploidias dos cromossomas sexuais. As trissomias associadas aos autossomas que produzem fetos viáveis estão associadas aos 3 pares de autossomas (13, 18, 21) com menos genes, presumindo-se que trissomias associadas a autossomas com mais genes são letais. As trissomias autossômicas estão associadas com déficit intelectual, atraso de crescimento e anomalias congênitas, sendo que as trissomias 13 e 18 têm uma expectativa de vida muito menor que a trissomia 21 uma vez que os fenótipos destas são muito mais graves^[27]. Aneuploidias nos cromossomas sexuais estão associadas a fenótipos menos severos que as aneuploidias nos autossomas, uma vez que o mecanismo de inativação do cromossoma X e a quantidade reduzida de genes do cromossoma Y contribuem para minimizar as consequências clínicas do desequilíbrio cromossômico. Indivíduos com aneuploidias dos cromossomas sexuais têm fenótipos variáveis, mas comumente, estão associados vários casos de infertilidade, desenvolvimento anormal e um coeficiente de inteligência ligeiramente abaixo da média^[27].

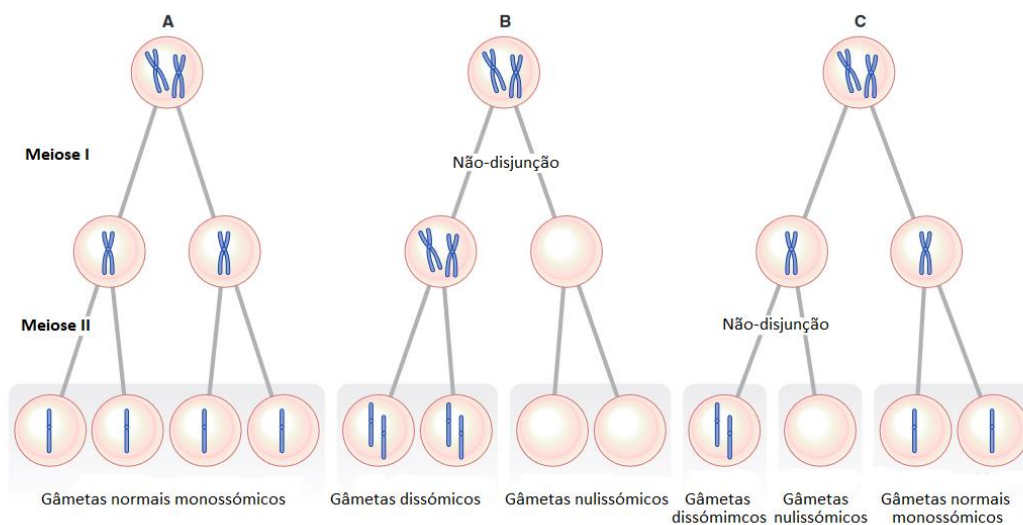


Figura 6- Esquema exemplificativo da segregação de um par de cromossomas na meiose com (A) segregação normal, (B) não-disjunção na meiose I, (C) não-disjunção na meiose II. Adaptado de Turnpenny, P. D., Ellard, S., & Cleaver, R. (2022). *Emery's elements of medical genetics and Genomics*. Elsevier.

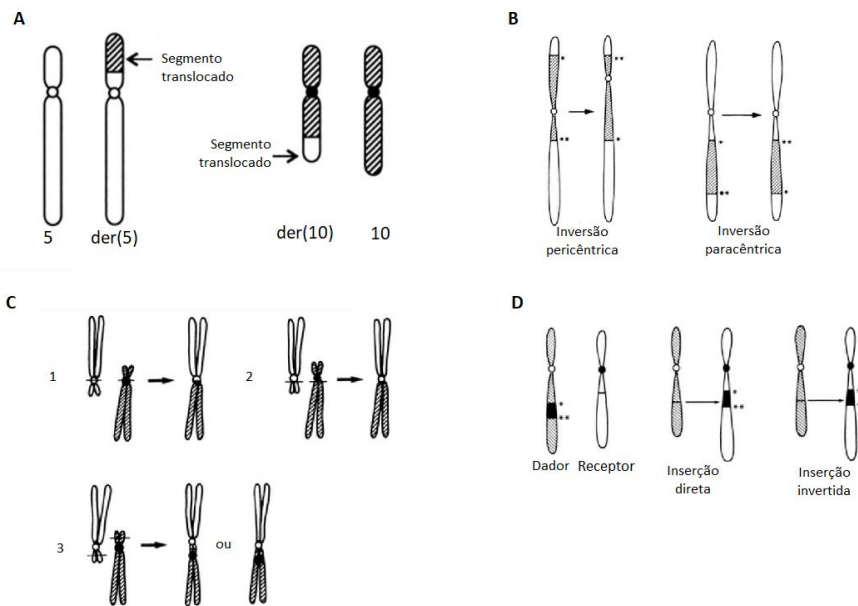
Euploidias acontecem quando células têm um múltiplo do número haploide de cromossomas (2n), por exemplo, uma triploidia terá 69 cromossomas. Raramente há nascimento de um nado vivo com esta condição e nos raros casos em que este fenómeno aconteceu, morreram todos pouco tempo após o seu nascimento. Triploidias e tetraploidias são os tipos mais comuns de euploidias e as triploidias podem ser causadas pela falha da divisão meiótica na formação de um ócito ou espermatozoide ou por dispermia, quando um ócito é fertilizado por dois espermatozoides [25].

4.2. Anomalias cromossômicas estruturais

Alterações cromossômicas estruturais resultam de quebras no cromossoma e posteriores reuniões dos segmentos que sofreram a quebra numa disposição diferente e dividem-se em rearranjos equilibrados e desequilibrados. Em alterações cromossômicas equilibradas o complemento cromossômico total não é alterado, ou seja, não existe perda ou ganho de material genético e por isso em grande parte das circunstâncias não têm implicações fenotípicas para o portador, porém quando o ponto de quebra desses rearranjos ocorre num gene funcional importante, o que pode ter consequências no funcionamento desse gene, torna esse rearranjo equilibrado patológico. Nas alterações cromossômicas desequilibradas o complemento cromossômico contém uma quantidade diferente do conteúdo genético criando desequilíbrios na carga genética o que muitas das vezes tem efeitos patológicos.

As alterações cromossômicas equilibradas englobam inserções, translocações e inversões (Figura 7) e apesar destas não terem, na sua maioria, consequências para portadores, a sua descendência tem um risco acrescido de herdar este rearranjo de forma desequilibrada o que pode ter consequências fenotípicas graves uma vez que os

padrões de segregação dos cromossomas podem provocar recombinações cromossômicas geneticamente desequilibradas no embrião [22].



As alterações cromossômicas desequilibradas englobam deleções, duplicações, isocromossomas, cromossomas marcadores, cromossomas em anel e cromossomas dicêntricos (Figura 8). Estas alterações resultam na maior parte dos casos em um

Figura 7- Alterações cromossômicas equilibradas. (A) Translocação recíproca. (B) Inversão. (C) Translocação robertsoniana e diferentes mecanismos de formação: (1) fusão de centrômeros; (2) quebra no braço curto e braço longo; (3) quebra em ambos os braços curtos dando origem a cromossomas dicêntricos ou, após a supressão de um centrômero, um cromossoma monocêntrico. (D) Inserção. Adaptado de Gardner, M. K., & Amor. (2018). *Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University.

fenótipo anormal devido a duplicação ou deleção de uma região do cromossoma que engloba um ou mais genes funcionais, dando origem a monossomia parcial no caso de deleção ou trissomia parcial no caso de duplicação [27].

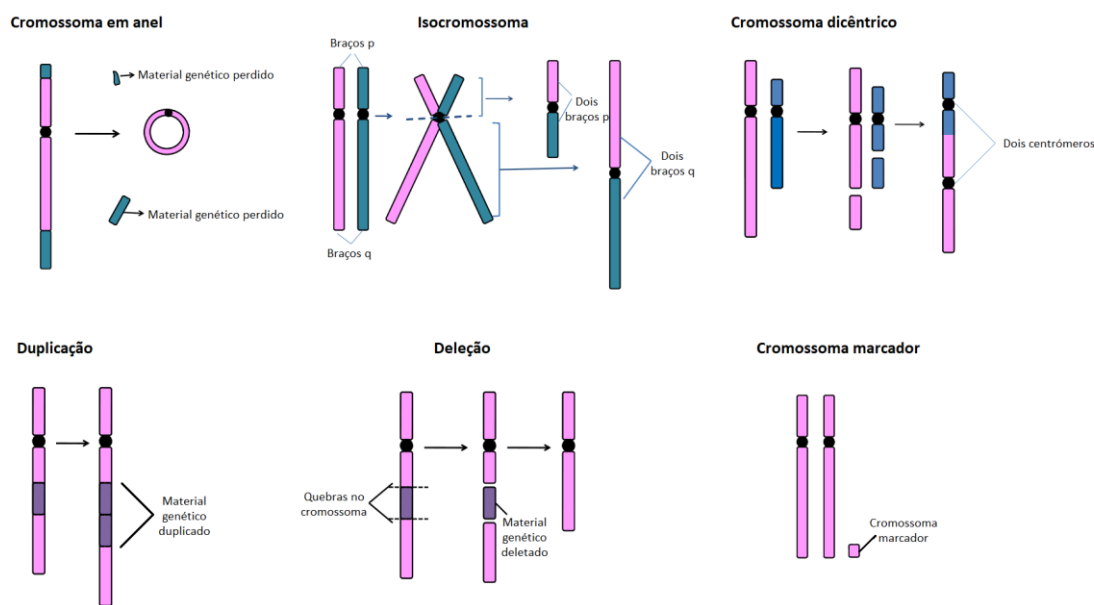


Figura 8- Alterações cromossômicas desequilibradas. Adaptado de Chowdhury, M. R., Dubey, S. (2013). *Role of Cytogenetics and Molecular Genetics in Human Health and Medicine. In Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation* (pp. 451–472). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00024-9>

4.3. Dissomia uniparental

Dissomia uniparental (UPD) ocorre quando um feto herda ambos os cromossomas homólogos de um só progenitor, se o feto herdar duas cópias do mesmo cromossoma homólogo de um progenitor denomina-se de isodissomia uniparental e se o feto herdar cromossomas homólogos diferentes de um só progenitor, denomina-se heterodissomia uniparental. Existem quatro mecanismos conhecidos que podem originar UPD: *Complementation*, *Trisomic rescue*, *Monosomic rescue* e *Mitotic error and rescue* (Figura 9) [28].

Complementation é o mecanismo mais simples, mas também mais raro, pois resulta de um erro meiótico em cada um dos progenitores com formação de um gâmeta dissômico num dos progenitores e nulissômico no outro progenitor que após a fertilização originará um zigoto dissômico com heterodissomia parental de origem do progenitor que produziu o gâmeta dissômico [28].

Trisomic rescue é o mecanismo mais comum em casos de UPD, este processo acontece quando uma célula trissômica (devido a uma não-disjunção meiótica) descarta um cromossoma supranumerário ao acaso no início da fase pós-zigótica, originando uma célula dissômica em que ambos os cromossomas do par pertencem ao mesmo progenitor, constituindo uma heterodissomia uniparental [28].

Monosomic rescue, resulta, também, de um erro de não-disjunção meiótico que produz um gâmeta nulissômico num dos progenitores que após a fertilização irá dar

origem a um zigoto monossômico, isto é corrigido numa mitose pós-zigótica onde o cromossoma será replicado dando origem a uma isodissomia uniparental [28].

Mitotic error and rescue, resulta de um erro mitótico que ocorre num zigoto inicialmente normal que dá origem a uma célula monossômica ou trissômica. A célula trissômica ocorre devido a uma replicação de um dos cromossomas, este erro é posteriormente corrigido numa mitose onde ocorre a perda do cromossoma que não foi replicado. No caso de uma célula monossômica que ocorre devido a perda de um cromossoma durante a mitose, numa mitose subsequente ocorre a replicação do cromossoma que não foi perdido [28].

Existem 6 autossomas associados com fenótipos patológicos através de dissomia uniparental através de fenómenos de *imprinting*, um processo que altera a expressão de genes através de metilação da sequência de DNA ou das histonas, os cromossomas 6, 7, 11, 14, 15 e 20, que dependendo do cromossoma e se foi de origem materna ou paterna, dissomia uniparental pode ter consequências patológicas [29].

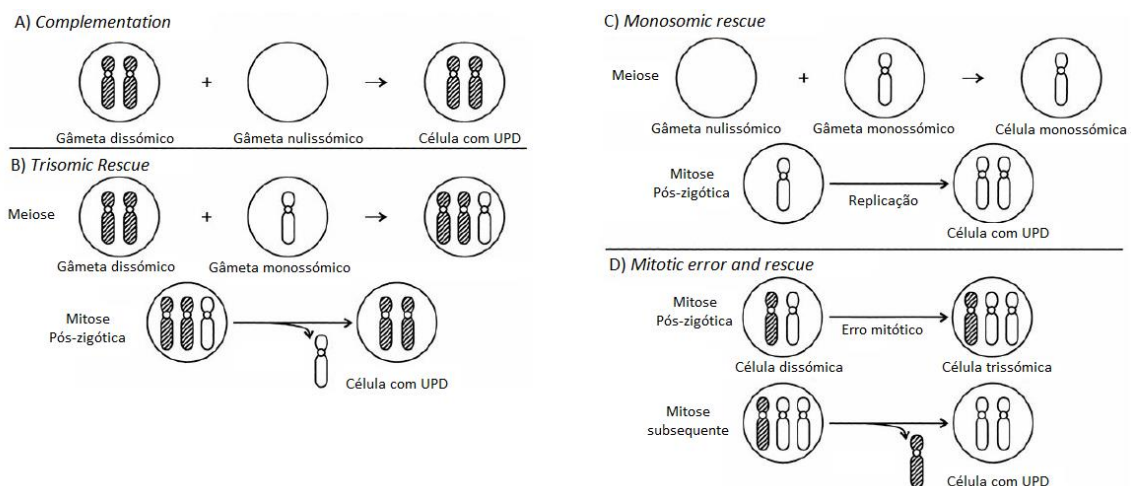


Figura 9- Mecanismos de formação de dissomia uniparental: (A) *Complementation*, onde um progenitor produz um gameta dissômico e um gameta monossômico; (B) *Trisomic rescue* quando ocorre não-disjunção meiótica num progenitor, produzindo um gameta dissômico, e subsequentemente ocorre a perda de um cromossoma homólogo do outro progenitor; (C) *Monosomic rescue*, quando ocorre não-disjunção meiótica num progenitor, produzindo um gameta nulissômico, e subsequentemente ocorre a duplicação do cromossoma homólogo do outro progenitor; (D) *Mitotic error and rescue*, onde ocorre um erro mitótico que pode gerar uma célula trissômica ou monossômica e é corrigido na mitose subsequente. Adaptado de: Amor, D. J., M., G. R. J., & Sutherland, G. R. (2018). *Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University Press.

4.4. Mosaicismo

Mosaicismo é definido quando, num indivíduo ou tecido existem mais que uma linha celular derivada de apenas um zigoto. Este fenómeno acontece quando, na fase mitótica, ocorre um erro cromossômico, dando origem a outra linha celular diferente da original. O nível de mosaicismo e consequente impacto fenotípico depende do quando acontece na fase mitótica (quanto mais precoce, maior o nível de mosaicismo e

maior o seu impacto no fenótipo)^[25]. Existem 3 tipos de mosaicismo: o mosaicismo somático, que ocorre apenas nas células somáticas, não afetando a linha germinativa e consequentemente não pode ser transmitido à descendência, o mosaicismo gonadal, que ocorre apenas nas células germinativas presentes nas gónadas, este tipo de mosaicismo pode ser transmitido, como alteração cromossômica para o feto, e o mosaicismo misto acontecendo em ambas as células somáticas e germinativas^[30].

Mosaicismo pode ainda ser confinado à placenta (CPM), este acontece quando existe anomalias cromossômicas no tecido extraembrionário, mas não no feto. Este tipo de mosaicismo é detetado em cerca de 1-2% de vilosidades coriônicas em diagnóstico pré-natal e não é possível distinguir se é CPM ou uma alteração cromossômica fetal. Para confirmar o resultado é recomendado fazer amniocentese para poder analisar o líquido amniótico e excluir a hipótese de CPM^[31].

Capítulo V- Testes de rastreio e diagnóstico pré-natal

5.1. Testes de rastreio pré-natal

O rastreio pré-natal consiste num conjunto de testes que permitem identificar um feto com um risco elevado de anomalias cromossômicas, defeitos do tubo neural e outras anomalias congénitas. A maioria destes testes não-invasivos estão disponíveis a todas as grávidas (com a exceção de NIPT) e no caso de o risco de uma das anomalias previamente mencionadas ser elevado é oferecido testes de DPN para confirmar a presença ou ausência de possíveis alterações genéticas no feto.

5.1.1. Testes de rastreio pré-natal no primeiro trimestre

No primeiro trimestre da concepção há a possibilidade de fazer o rastreio combinado do 1º trimestre que consiste num rastreio bioquímico e um rastreio ecográfico. No rastreio bioquímico, sangue é colhido da mãe entre as 9 e as 10 semanas de gestação e avalia-se os parâmetros de proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A) e subunidade β livre da hormona gonadotrófica coriônica (β -HCG livre) na circulação materna. Em fetos com trissomia 21, os níveis séricos de β -HCG livre estão aumentados enquanto em outras trissomias estão abaixo do normal. Os níveis de PAPP-A estão diminuídos em todas as trissomias^[32]. No rastreio combinado do segundo trimestre estes valores são combinados com o rastreio ecográfico do primeiro trimestre onde se procura marcadores comuns de aneuploidia como a translucência da nuca cujos valores são normalmente aumentados no caso da trissomia 13, 18 e 21^[33].

5.1.2. Testes de rastreio pré-natal no segundo trimestre

No segundo trimestre da gravidez existe a possibilidade de fazer a ecografia morfológica entre as 20-23 semanas de gestação, que avalia o crescimento fetal,

medindo o perímetro cefálico, perímetro abdominal e comprimento do fémur, avalia também possíveis malformações, problemas da placenta e líquido amniótico, a avaliação do colo uterino que é um valor preditivo de um parto precoce e a avaliação da fluxometria das artérias uterinas que é um valor preditivo de restrição do crescimento intrauterino e hipertensão gestacional materna^[33]. Existe também a possibilidade de fazer um rastreio bioquímico que mede os níveis da α -feto proteína (AFP), estriol livre (uE3), gonadotrofina coriônica (hCG) e inibina A que são indicadores de possíveis aneuploidias e defeitos de tubo neural^[32].

5.1.3. Testes de rastreio pré-natal no terceiro trimestre

No terceiro trimestre da gravidez é possível fazer a ecografia de avaliação do crescimento fetal que tem como objetivo detetar malformações de crescimento de aparecimento tardio, avaliar se o crescimento fetal é adequado para a idade do feto, avaliar a apresentação fetal para determinar se pode ocorrer um parto normal ou se há a necessidade de um parto por cesariana e a avaliação morfológica de órgão como o cérebro e os rins^[33].

5.1.4. Testes de rastreio pré-natal não invasivo

Rastreio pré-natal não invasivo é feito ao analisar o cffDNA presente no sangue materno para determinar a probabilidade de presença de uma aneuploidia ou anomalias específicas em certos cromossomas sendo altamente preciso e com valores muito baixos de falsos positivos. Este pode ser efetuado a partir das 5 a 7 semanas, mas a fração de cffDNA presente no sangue materno será mais significativa e mais informativa a partir das 10 semanas de gestação uma vez que a quantidade de cffDNA aumenta ao longo da gestação. Além disso, NIPT tem a capacidade de fazer testes de paternidade, de determinar o sexo fetal em momentos mais precoces quando comparados com outros testes e em certos laboratórios também é possível tipo sanguíneo *rhesus* fetal^[34].

Os testes de rastreio são de elevada importância uma vez que ao calcular o risco de anomalias no feto permite estratificar esse mesmo risco numa consulta de aconselhamento genético, ajudando a grávida a tomar uma decisão informada quanto à conduta da gravidez, podendo realizar exames específicos de vigilância e diagnóstico invasivos, preparar-se para a possível patologia após o nascimento da criança e ou até mesmo dar término à gravidez.

5.2. Testes de diagnóstico genético pré-natal

O diagnóstico pré-natal é efetuado quando existe a suspeita de uma probabilidade acrescida de existência de alteração cromossômica na gravidez evidenciada por uma indicação clínica. O diagnóstico pré-natal é o conjunto de testes de

diagnóstico genéticos efetuados que permite aos pacientes saber, dentro dos limites específicos dos testes de diagnóstico efetuados, se a gravidez é afetada por alguma condição genética. Apesar destes testes de diagnóstico serem recomendados para gravidezes de risco é importante haver uma consulta de aconselhamento genético prévia uma vez que os testes diagnósticos são invasivos e por isso existe o risco de perda fetal, um fator que pode influenciar a decisão da gestante.

Os testes de diagnóstico pré-natal são recomendados e oferecidos a gravidezes de risco, que é o caso aquando nos testes de rastreio se detetam um risco elevado para anomalias genéticas como aneuploidias, malformações fetais detetadas em ecografias, histórico familiar com doenças genéticas, filho anterior com cromossomopatia, progenitores portadores de uma alteração cromossómica ou condição genética transmissível ao feto que poderá afetar o seu fenótipo.

5.2.1. Biópsia das vilosidades coriônicas

A biópsia das vilosidades coriônicas é realizada das 10 às 13 semanas de gestação sendo a sua principal vantagem um diagnóstico genético mais precoce o que reduz a ansiedade da gestante e dá a opção à mesma de terminar a gestação ainda no primeiro trimestre no caso de detetar uma anomalia, que é um processo menos complicado quanto mais cedo for efetuado^[35].

Para realizar a técnica há a possibilidade de usar duas vias diferentes dependendo da preferência do obstetra que efetuará a operação e da posição da placenta, a via transabdominal e a via transceval, ambas as vias visam recolher uma amostra de tecido placentário, as vilosidades coriônicas, com o auxílio de uma seringa ou cateter e ultrassonografia para orientar a seringa ou cateter (Figura 10). Este procedimento tem certas complicações uma vez que é uma técnica invasiva, com possível hemorragia, infeções e rutura de membranas. Estes fatores referidos são responsáveis para que a perda fetal desta técnica seja de 0,7-2%^[36].

Uma das desvantagens desta metodologia é a possibilidade de encontrar um mosaicismo confinado à placenta que ocorre em 1-2% dos casos causando uma discrepância entre o complemento cromossómico do feto e da placenta uma vez que não se consegue determinar se o mosaicismo é pertencente ao sendo necessário para confirmar a presença ou ausência de mosaicismo no feto uma amniocentese^[35]. Outra desvantagem desta técnica é o risco aumentado de contaminação materna nestas amostras.

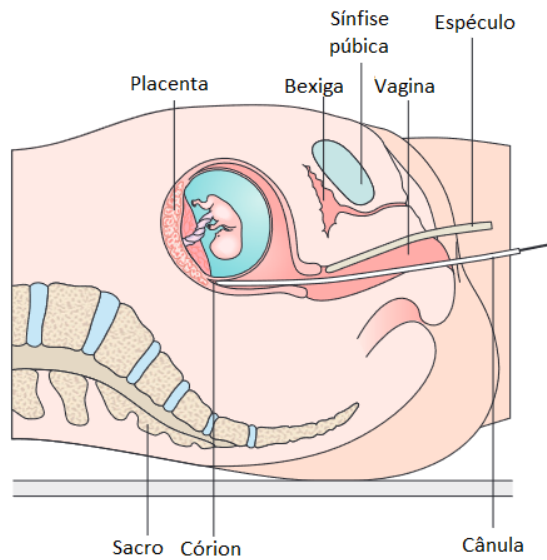


Figura 10- Esquema da técnica de biópsia transcervical de vilosidades coriônicas. Adaptado de Turnpenny, P. D., Ellard, S., & Cleaver, R. (2022). *Emery's elements of medical genetics and Genomics*. Elsevier.

5.2.2. Amniocentese

A amniocentese pode ser realizada a partir das 15 semanas de gestação e até ao término da mesma sendo mais comum ser feita entre as 15 e 20 semanas de gestação. Esta técnica retira líquido amniótico, que consiste em células exfoliadas do feto, transudatos, urina fetal e secreções pulmonares, da cavidade uterina com o auxílio de uma agulha. A colheita é feita transabdominalmente com o auxílio de ultrassonografia ([Figura 11](#)). Este procedimento tem um risco médio de perda fetal de 0,13%, consideravelmente mais baixo que a biópsia de vilosidades coriônicas^[36].

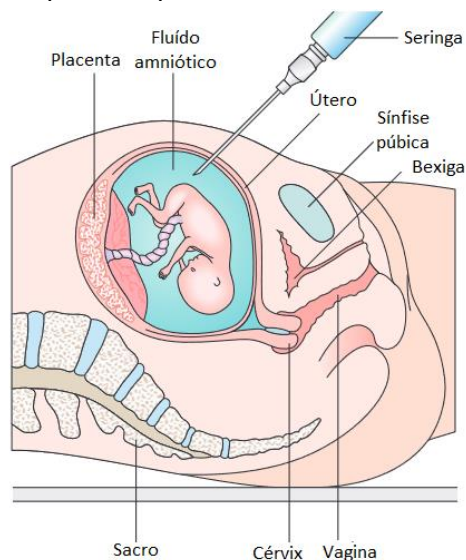


Figura 11- Esquema da técnica de amniocentese. Adaptado de Turnpenny, P. D., Ellard, S., & Cleaver, R. (2022). *Emery's elements of medical genetics and Genomics*. Elsevier.

5.2.3. Cordocentese

A cordocentese pode ser realizada a partir das 18 semanas embora, normalmente, seja efetuada por volta das 20-22 semanas. Antes deste período o cordão umbilical tem um tamanho muito reduzido dificultando o procedimento. A recolha de sangue fetal é feita usando uma agulha na origem placentária do cordão umbilical com o auxílio de uma ultrassonografia. A técnica tem um risco mais elevado de perda fetal quando comparado com a amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas com um risco de cerca de 1,9%, uma vez que tem várias complicações associadas como a visibilidade limitada da veia umbilical através da ecografia, a posição da placenta e os movimentos do feto podem interferir com o procedimento aumentando o risco de hemorragias e a necessidade de perfusões adicionais no cordão. Atualmente a cordocentese, normalmente, apenas é feita numa gestação em estádios tardios quando são detetadas malformações fetais, quando a amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas tiveram resultados inconclusivos ou para clarificar mosaicismos cromossómicos presentes em vilosidades coriônicas e líquido amniótico [\[37\]\[38\]](#).

Capítulo VI- Citogenética convencional

A citogenética convencional permite o estudo dos cromossomas com uma resolução limite de cerca de 5-10Mb. Esta metodologia requer células em divisão para que seja possível estudar os cromossomas em metafase, sendo este o estado onde se encontram mais condensados e mais distinguíveis entre eles. Para obter cromossomas em metafase são necessários tecidos que contenham células que se dividem espontaneamente ou que podem ser sujeitos a culturas celulares para obter células em proliferação.

Para a realização de testes de diagnóstico pré-natal usando citogenética convencional é necessário estabelecer culturas celulares de células fetais, estas podem ser obtidas através de líquido amniótico, vilosidades coriônicas e sangue do cordão umbilical. A citogenética convencional também permite a realização de testes de diagnóstico pós-natal usando culturas de sangue periférico ou de fibroblastos provenientes de biópsias de pele. Existem diferentes cenários em que testes genéticos são usados para procurar respostas a certas indicações clínicas como atraso de desenvolvimento, défice intelectual, características dismórficas, malformações múltiplas, defeitos cardíacos, estatura baixa, genitais ambíguos entre outros. Para além destes fatores, o teste genético pós-natal pode ser uma ferramenta valiosa para famílias em que houve casos de abortos espontâneos, morte neonatal, problemas de fertilidade, histórico familiar de rearranjo cromossómico ou a existência de um indivíduo com défice cognitivo cuja sua origem é possivelmente cromossómica e não é possível efetuar o estudo do mesmo. A técnica de citogenética convencional para descobrir se existe alguma anomalia genética por detrás destes problemas uma vez que a anomalia

genética pode ser equilibrada nos progenitores e não ter manifestações fenotípicas, porém esta pode ser passada de forma desequilibrada a gerações futuras possivelmente provocando graves anomalias genéticas. Deste modo constitui uma ferramenta essencial para diagnóstico de anomalias genéticas e na avaliação de risco de transmissão de anomalias genéticas à descendência tendo um papel significativo em decisões de como proceder com uma gravidez [\[39\]](#).

A citogenética convencional, ao contrário das técnicas de genética molecular, tem uma resolução limitada impedindo a identificação de alterações genéticas ao nível molecular como duplicações, deleções ou mutações pontuais que são responsáveis por muitas anomalias genéticas. Outra desvantagem é a capacidade limitada de detetar mosaicismos, uma vez que se baseia na análise visual de células, é impossível analisar por completo todas as células podendo não detetar células de complemento cromossómico anormal que estão presentes em baixa proporção. Esta técnica também necessita de culturas celulares que precisam de tempo para originar células proliferativas suficientes para o estabelecimento de lâminas para análise ao microscópio, que conjugado com o tempo da análise das mesmas resulta num tempo de espera alongado para o paciente até obter o resultado, se a situação clínica for urgente outras alternativas poderão ter de ser utilizadas.

No entanto, a citogenética convencional tem várias vantagens em relação a outras técnicas de diagnóstico genético como pode analisar por completo o complemento cromossómico de um indivíduo permitindo a identificação de anomalias cromossómicas de grande escala. É uma técnica com um baixo custo de aplicação quando comparada com outras técnicas de análise genética de grande escala como NGS ou WGS. Permite identificar rearranjos cromossómicos equilibrados não detetáveis por técnicas de genética molecular, rearranjos estes que estão associados a vários problemas mencionados anteriormente.

Assim é importante notar que a citogenética convencional e a genética molecular são muitas vezes utilizadas conjuntamente de forma a realizar um diagnóstico genético mais compreensivo.

6.1. Colheita e transporte de amostras

É um requisito absoluto ter células vivas com capacidade proliferativa para efetuar estudos citogenéticos, um dos fatores que influencia as células da amostra e a sua capacidade de crescer e multiplicar é a maneira como ela é coletada e subsequentemente transportada sendo que diferentes tipos de amostras necessitam de diferentes métodos de colheita e transporte para não influenciar a capacidade proliferativa das células [\[22\]](#).

6.1.1. Amostras de tecido sólido

Tecidos sólidos como biópsias das vilosidades coriônicas e biópsias da pele devem ser colhidas e transportadas em recipientes estéreis com meio de cultura fornecido pelo laboratório. O transporte destas amostras é feito temperatura ambiente permitindo o estabelecimento imediato da cultura aquando da chegada ao laboratório^[22].

6.1.2. Amostras de líquido amniótico

Uma amostra de líquido amniótico deve conter 1mL de líquido amniótico por cada semana de gestação e estas devem ser obtidas em condições estéreis para um recipiente estéril apto para estabelecimento de cultura celular. O transporte deve ser feito no menor espaço de tempo possível e a temperatura ambiente^[22].

6.1.3. Amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico devem ser coletadas usando seringas estéreis e armazenadas em tubos de heparina de sódio sem preservantes. As culturas de sangue periférico podem ser iniciadas até 5 dias após a colheita, mas para obter melhores resultados possíveis, estas devem ser iniciadas até 24h após a colheita. Até ao processamento das amostras, estas não devem ser sujeitas a temperaturas extremas devendo estar, até ao seu processamento a temperatura ambiente ou refrigeradas a uma temperatura não abaixo dos 4°C^[22].

6.2. Estabelecimento de cultura

Todos os tipos de amostras que são usados para análise citogenética convencional, são postos num meio de cultura aquoso de modo a que as células proliferem e se consiga obter células suficientes para efetuar todos os estudos que possam possivelmente ser necessários.

Existem meios de cultura diferentes que serão mais apropriados para certo tipo de estudos e de células, porém todos estes são uma solução equilibrada de sais com vários aditivos^[22]:

- **Glicose.**
- **Solução tampão** para manter um pH estável.
- **L-glutamina**, um aminoácido essencial para crescimento celular.
- **Soro bovino fetal (FBS)** que contém vários fatores de crescimento celular e deve ter uma concentração de 10-30% no meio final de cultura visto que concentrações fora destes limites influenciam negativamente o sucesso da cultura.

- **Antibióticos** para inibirem o crescimento de possíveis microrganismos contaminantes da cultura. Isto porque, na cultura estão presentes vários nutrientes e fatores de crescimento que podem potenciar a proliferação de microrganismos, por isso são usados antibióticos como medida preventiva. É sempre imperativo ter condições estéreis e ter cuidado para não expor as culturas a possíveis contaminantes externos. No caso de haver a contaminação de amostras deve-se analisar no laboratório de microbiologia de modo a identificar o antibiótico indicado para remover o contaminante.
- **Estimulantes mitóticos (mitógenos)** são necessários em algumas culturas de células que não se dividem espontaneamente, como os linfócitos. Por isso mitógenos como fitohemaglutinina(PHA) são necessários para estabelecer a cultura destas células.

Para além do uso de antibióticos e se fazer o estabelecimento da cultura dentro de uma câmara com fluxo laminar em condições estéreis ([Figura 12](#)), são efetuadas duas culturas diferentes da mesma amostra por diferentes técnicos em câmaras de fluxo laminar diferentes, com meios de igual composição, mas armazenados em diferentes recipientes e que são postos em cultura em estufas de incubação diferentes com os mesmos parâmetros de temperatura, humidade e dióxido de carbono^[40].



Figura 12- Câmara de fluxo laminar onde o estabelecimento e a manutenção das culturas é efetuado. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

6.2.1. Cultura de vilosidades coriônicas

Para estabelecer uma cultura de vilosidades coriônicas, estas precisam de ser primeiramente dissecadas uma vez que as amostras vêm com material residual materno. É imperativo fazer a separação do material materno do material fetal

(aparência mais translúcida) [\(Figura 13\)](#) para evitar contaminação materna da amostra que impossibilitaria um resultado fidedigno de qualquer teste genético. Este procedimento é feito à lupa com pinças estéreis numa caixa de petri estéril com PBS de modo a lavar a amostra. No caso de o feto ser do sexo feminino, ao fazer-se a separação das vilosidades, coloca-se uma pequena quantidade das vilosidades num microtubo de 2mL para posteriormente se fazer um despiste de contaminação materna por comparação de tamanho de *short tandem repeats* (STR) entre o feto e a progenitora garantindo que o teste genético está a ser efetuado exclusivamente ao feto [\[41\]](#).

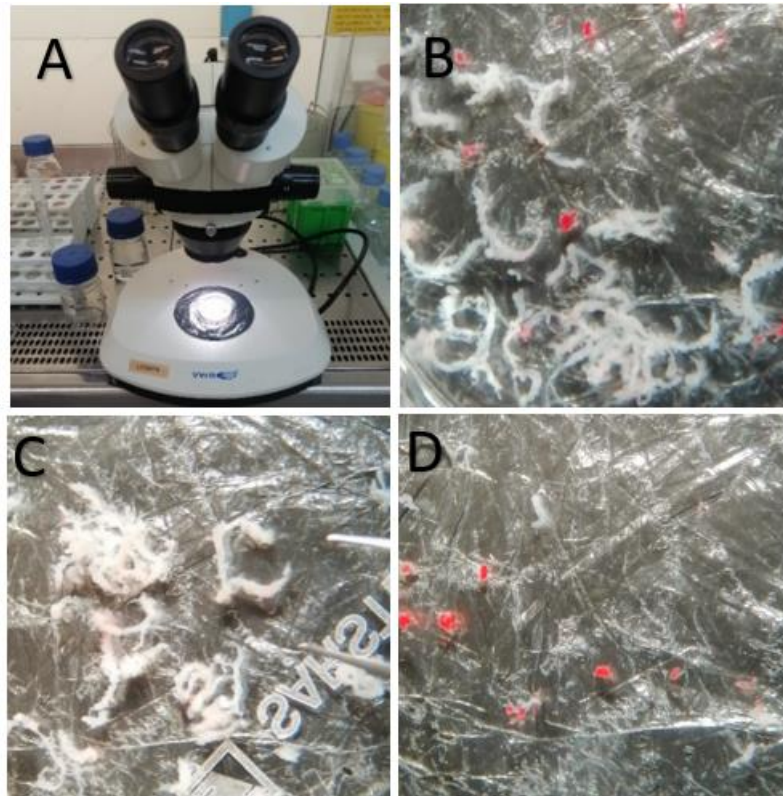


Figura 13- Separação do material materno do material fetal à lupa. (A) Lupa utilizada para a separação do material materno do material fetal das vilosidades coriônicas; (B) Vilosidades coriônicas antes do material fetal ser separado do material materno; (C) Material fetal separado; (D) Material materno separado. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Após a separação do material materno do material fetal, este é introduzido num tubo estéril para ser digerido enzimaticamente, primeiro é utilizado tripsina durante 1 hora a 37°C e centrifugada para retirar a solução de tripsina e adicionar uma solução de colagenase durante 30 minutos a 37°C e após este período é feito novamente uma centrifugação descartando a solução de colagenase, pipetando depois as vilosidades coriônicas para 2 caixas-T com meio de cultura adequado e deixa-se as caixas a incubar em estufas separadas [\(Figura 14\)](#), fechadas com temperatura, humidade e níveis de CO₂ controlados. Após 2 a 3 dias, os crescimentos das células de cada respetiva cultura são avaliados num microscópio invertido [\(Figura 15\)](#) avaliando se é necessário fazer a troca do meio de cultura, esta avaliação deve ser efetuada todos os dias subsequentemente. Após 5 a 7 dias, as culturas devem ter células suficientes para a manipulação,

dependendo do crescimento celular e da atividade mitótica (avaliado pelo número e tamanho das colónias e número de células em divisão) [41].



Figura 14- Estufas de temperatura, humidade e CO2 controlado, para crescimento das culturas. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

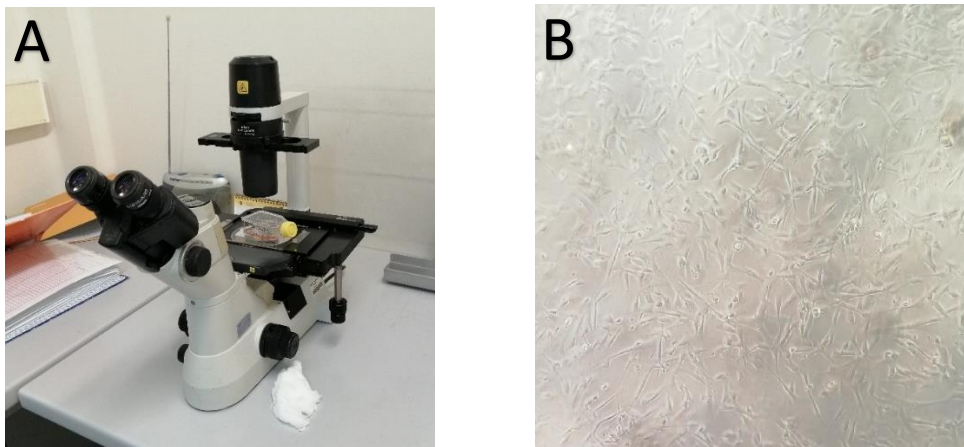


Figura 15- Avaliação do crescimento celular das culturas estabelecidas no microscópio invertido. A) Microscópio invertido; B) Cultura com crescimento celular suficiente para manipulação. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

6.2.2. Cultura de amniócitos

Para fazer cultura de amniócitos, os líquidos amnióticos são avaliados, verificando a sua cor, que deve ser ligeiramente amarelado e se tem presença de sangue. Depois é adicionado o meio de cultura aos frascos-T que contêm o líquido amniótico. Os frascos são então inseridos em estufas de incubação com temperatura, níveis de humidade e de CO2 controlados para otimizar o crescimento celular onde é deixado 4-6 dias. Para manter a cultura é necessário mudar o meio pelo menos uma vez por semana que é feito aspirando o meio com uma pipeta e depois adicionando meio novo. Para verificar se as células estão prontas para a manipulação, os frascos-T são

periodicamente observados num microscópio invertido para verificar se a cultura tem a confluência necessária para dar início ao processo de manipulação^[41].

6.2.3. Cultura de sangue periférico

Amostras do sangue periférico têm uma grande quantidade de células que podem ser usadas para diagnóstico clínico ou para estudar a estrutura e organização dos cromossomas. As células que se pretendem observar são os linfócitos T. Para estimular o crescimento de linfócitos T e criar uma cultura destas células, o sangue periférico, que é coletado para tubos de heparina de sódio (anticoagulante), é transferido (cerca de 10 gotas) para tubos de 15mL e adicionado a meio com PHA, um estimulador mitótico. O sangue é depois incubado numa estufa a 37°C durante 48 ou 72 horas em tubos inclinados 45º para promover trocas gasosas. Como a cultura de linfócitos é uma cultura em suspensão, não se pode observar o seu crescimento. Para garantir um número suficiente de células em divisão, é feita uma sincronização do ciclo celular. A sincronização celular é feita antes da manipulação usando metotrexato (MTX) que bloqueia a replicação de DNA, ao inibir a síntese de timidina, na fase S do ciclo celular e após 16-18 horas (mais tempo levaria à morte celular devido à elevada toxicidade do MTX) é utilizado timidina para retomar o ciclo celular garantindo que o maior número de células esteja na mesma etapa do ciclo celular^[41].

6.2.4. Cultura de fibroblastos

Para fazer cultura de fibroblastos, amostras de biópsias de pele são colocadas em placas de petri e são cortadas em finos pedaços e inseridas em caixas com soro fetal permitindo a sua adesão à caixa de cultura. A caixa é virada ao contrário e adiciona-se meio de cultura sem estar em contacto com os fragmentos de pele cortados e são deixadas numa estufa de incubação com temperatura, níveis de humidade e de CO2 controlados para otimizar o crescimento celular. Após algumas horas, a caixa é invertida permitindo o meio contactar com os pedaços de pele onde são deixados cerca de 8 dias para proliferarem. Depois a confluência celular é avaliada várias vezes por semana até esta ter células em divisão suficientes para iniciar a manipulação^[41].

6.3. Manipulação

A manipulação é uma técnica idêntica para todos os tipos de amostras biológicas com pequenas variações. Esta técnica é iniciada quando existe confluência suficiente na cultura celular. Antes da manipulação é adicionado *chromosome resolution additive* (CRA) às culturas de líquidos amnióticos, vilosidades coriônicas e fibroblastos, um composto químico que previne a contração dos cromossomas e suscita o alongamento dos mesmos ao enfraquecer a ligação química que existe na estrutura compacta do

cromossoma. Isto é feito para aumentar a resolução dos cromossomas e facilitar a observação de bandas individuais dos cromossomas^[22].

Depois deste passo, para começar a manipulação, adiciona-se colcemida, um inibidor mitótico que atua ligando-se à tubulina, obstruindo a formação do fuso mitótico ao inibir o movimento dos microtúbulos. A ação deste composto previne a separação dos cromátídeos irmãos na anáfase deixando apenas células em metafase (Figura 16).. O tempo de exposição à colcemida tem de ser controlado uma vez que uma exposição demasiado longa resulta numa maior quantidade de cromossomas em metafase, porém, uma vez que os cromossomas condensam enquanto progridem pela metafase, também ficarão mais curtos, por isso é necessário haver um meio termo e no LGC-FMUC o tempo estipulado que ao longo dos tempos tem dado os melhores resultados são 3 horas de exposição^[22].

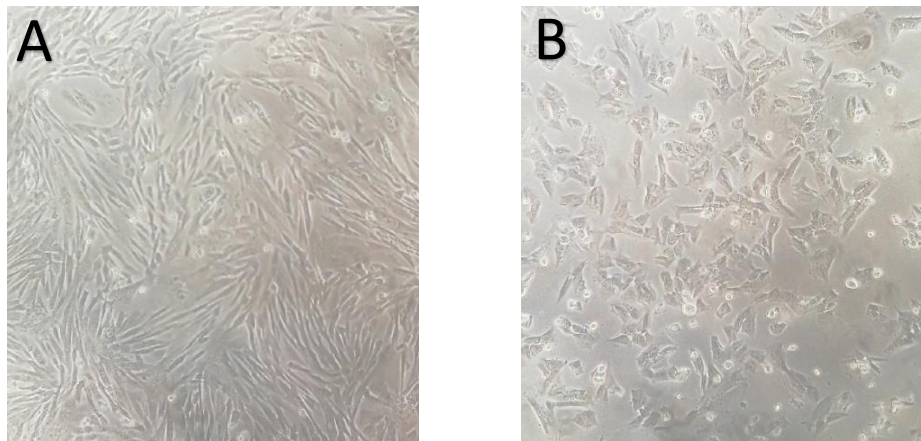


Figura 16- Cultura celular (A) antes do tratamento de colcemida e (B) depois do tratamento de colcemida observando-se uma maior quantidade de células em divisão. Imagem cedida pelo LGC-FMUC.

Após o tratamento com colcemida, o meio é retirado e é adicionada tripsina para libertar as células das paredes da caixa de incubação. As células são transferidas para um tubo de centrifugação e são centrifugadas para depois receberem o tratamento hipotónico. Este tratamento consiste em adicionar uma solução hipotónica de cloreto de potássio (KCl) às células, o que vai permitir que a água entre nas células por osmose, o que as vai tornar mais túrgidas e assim dispersar os cromossomas na lâmina. O tempo de exposição à solução hipotónica é crucial uma vez que demasiado tempo causará o rebentamento das células e o oposto resultará numa dispersão insuficiente dos cromossomas causando sobreposição entre estes e dificultando a sua visualização^[22]. No LGC-FMUC faz-se uma exposição à solução hipotónica durante 20 minutos numa incubadora a 37°C.

De seguida ao tratamento hipotónico segue-se a fixação dos cromossomas, este processo tem a função de parar o efeito da solução hipotónica assim como fixar as células no seu estado túrgido, remover água e preservar a estrutura dos cromossomas^[22]. Para realizar a fixação são adicionadas aos tubos soluções de fixação primeiramente é feita uma pré-fixação com uma solução constituída por metanol e

ácido acético numa proporção de 6 partes de metanol:1 parte de ácido acético, que tem a função de garantir que os cromossomas têm a melhor morfologia possível. De seguida procede-se com fixações usando soluções de fixação, também com várias proporções de metanol e de ácido acético (6 partes de metanol:1 parte de ácido acético; 3 partes de metanol:1 parte de ácido acético; 1 parte de metanol:1 parte de ácido acético). Se estivermos a fixar sangue periférico as condições da fixação serão diferentes, não se faz pré-fixação, a solução de fixação deve ter sempre a proporção de 3 partes de metanol:1 parte de ácido acético e a primeira fixação deve ser feita enquanto o tubo está a ser agitado num vortex, o que vai impedir que o sangue fique coagulado e ao mesmo tempo vai promover a lise da membrana celular dos eritrócitos. Após cada fixação, os tubos devem ser centrifugados e o sobrenadante deve ser descartado^[41].

6.4. Espalhamento

Após a fixação, o último passo antes da bandagem é o espalhamento das células nas lâminas, uma etapa crucial uma vez que este passo é determinante da qualidade das metafases que serão observadas. As características principais de um espalhamento bem efetuado são um número suficiente de metafases devidamente espaçadas na lâmina com a menor sobreposição possível dos cromossomas e sem citoplasma visível^[22].

O espalhamento é um procedimento simples que consiste em pipetar duas gotas da suspensão celular que contem a solução de fixador e a amostra em estudo numa lâmina. Porém a sua qualidade é dependente da velocidade de evaporação do fixador, pois a tensão superficial do fixador aplica uma pressão nas células que as esmaga e à medida que o fixador se evapora, as membranas celulares são esticadas tornando as células cada vez mais planas e dispersando mais os cromossomas. Assim, a velocidade de evaporação do fixador tem grande influencia na qualidade do espalhamento e esta é influenciada por fatores externos como volume da gota de solução fixadora e amostra usado na lâmina, temperatura e humidade (menor volume da gota da suspensão celular, maior temperatura e baixa humidade resultará numa evaporação mais rápida e vice-versa), devido a este facto o espalhamento é efetuado numa câmara de temperatura e humidade controlada para que a variabilidade destes fatores seja a menor possível e assim produzindo o maior número de lâminas com espalhamento de boa qualidade possível. Após o espalhamento, a lâmina deve ser observada num microscópio de contraste de fase para avaliar a qualidade das metafases obtidas ([Figura 17](#)) e averiguar, se necessário, que ajustes se poderão fazer para melhorar as metafases obtidas (diluir ou concentrar a amostra ou aumentar o volume da amostra pipetada para a lâmina)^[22].

Após o espalhamento as lâminas devem ser identificadas com o tipo biológico da amostra, a identificação interna do número do caso, a linha de tratamento da amostra, a data de manipulação, a data de espalhamento e número da lâmina espalhada desse caso. Após a identificação a lâmina deve ser envelhecida numa estufa a 60°C durante a noite ou 90°C durante 1 hora antes de proceder com a bandagem^[22].

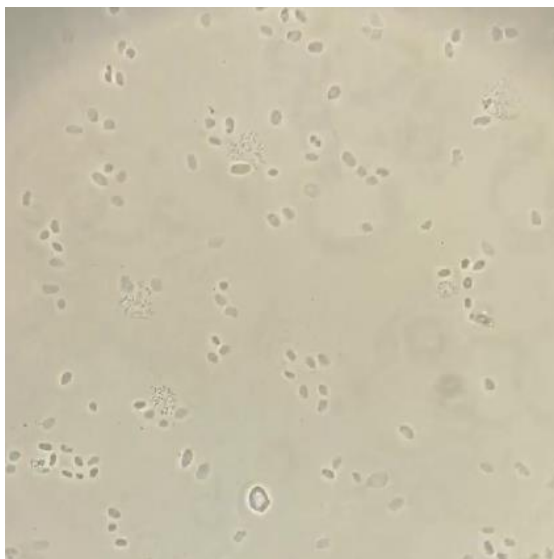


Figura 17- Avaliação do espalhamento no microscópio de contraste de fase. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

6.5. Bandagem

Para analisar os cromossomas é preciso conseguir identificar os cromossomas, ou seja, precisamos de conseguir ver o seu tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas, com estas condições reunidas é então possível detetar alterações numéricas e estruturais com um limite de resolução de cerca de 5-10 Mb. Isto é alcançado utilizando técnicas de bandagem mencionadas no [capítulo 2](#). No decorrer deste estágio foram observadas a técnica de bandagem GTL e a técnica complementar de bandagem CBG, porém é usada também a técnica complementar de bandagem AgNOR.

6.5.1. Bandagem GTL

A técnica de bandagem G é a técnica de bandagem mais usada em laboratórios de citogenética devido à permanência das bandas produzidas e a facilidade de captura de imagem das mesmas, sendo estas observáveis ao microscópio de campo claro. No LCG-FMUC quando a técnica de bandagem G é utilizada, utiliza-se o método GTL (bandagem G usando corante *leishman*).

Para fazer esta bandagem é necessário preparar 6 *coplins* numa sequência onde se vão imergir as lâminas que se pretendem aplicar a bandagem ([Figura 18](#)). No primeiro *coplin* a lâmina é submersa numa solução de tripsina diluída em cloreto de sódio (NaCl) de modo a digerir parcialmente os cromossomas permitindo ver o padrão de bandas que possibilita a sua identificação, sendo as bandas mais escuras ricas em regiões de heterocromatina e as bandas mais claras ricas em eucromatina^[22]. Este primeiro passo tem de ser ajustado uma vez que uma digestão em tripsina durante demasiado tempo resultará em cromossomas com bandas pouco intensas limitando a sua visibilidade e a sua morfologia será afetada havendo também a possibilidade de detetar corante à volta do cromossoma enquanto uma digestão demasiado rápida resultará em cromossomas sem bandas visíveis^[41]. De seguida a lâmina é sujeita a lavagens para remover a tripsina

sendo imersa rapidamente no segundo *coplin* que contém uma solução de NaCl e logo depois no terceiro *coplin* que contém uma solução de tampão *Gurr*. A lâmina é depois imersa no quarto *coplin* que contém corante *Leishman* durante alguns minutos (tempo ajustável como o passo da tripsinização de modo a obter bandas de melhor qualidade possível) o que irá conferir o padrão de bandas aos cromossomas. Após coradas, as lâminas são transferidas rapidamente para o quinto e logo de seguida para o sexto *coplin* que contém tampão *Gurr* e água destilada respetivamente, removendo o excesso de corante.



Figura 18- Procedimento de bandagem GTL: (1) Tratamento com tripsina; (2) Lavagem com solução de NaCl; (3) Lavagem com tampão *Gurr*; (4) Coloração dos cromossomas com corante de *Leishman*; (5) Lavagem com tampão *Gurr*; (6) Lavagem com água destilada. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Após a bandagem as lâminas são observadas num microscópio de campo claro, permitindo observar a morfologia dos cromossomas e a qualidade das bandas ([Figura 19](#)) para averiguar se é necessário alterar algum dos tempos de tripsinização ou de tratamento com corante.

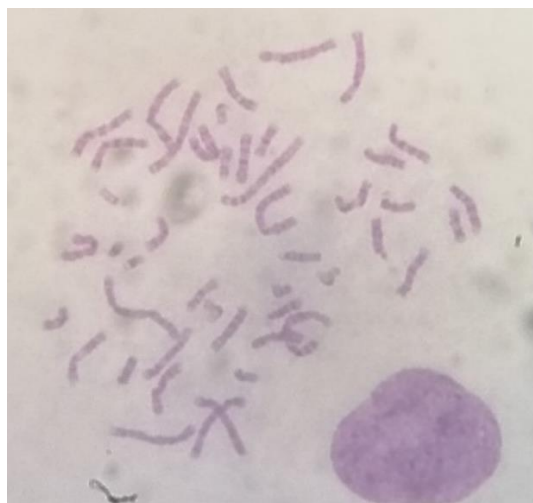


Figura 19- Avaliação da qualidade da bandagem efetuada em microscópio de campo claro. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Depois de coradas as lâminas são armazenadas num suporte a temperatura ambiente até à sua análise ao microscópio de campo claro.

6.5.2. Bandagem CBG

A técnica de bandagem C cora seletivamente as regiões de heterocromatina que estão próximas dos centrómeros, as áreas polimórficas dos cromossomas 1, 9 e 16, assim como o segmento distal do braço longo do cromossoma Y. As bandas coradas por esta técnica contêm sequências repetitivas de DNA (DNA satélite) e é útil para identificar a presença de cromossomas dicêntricos e cromossomas marcadores^[22].

O procedimento para realizar este método inicia-se ao imergir a lâmina, previamente envelhecida, e é depois introduzida numa solução de ácido clorídrico (HCl) durante alguns minutos de modo a despurinar o DNA. De seguida a lâmina é transferida para o próximo *coplin* e é lavada em água destilada. A lâmina é depois imersa no próximo *coplin* que contém uma solução alcalina de hidróxido de bário durante 1 minuto que vai desnaturar o DNA. O excesso de solução de hidróxido de bário é lavado num *coplin* com água destilada e é posteriormente imersa num *coplin* que contém solução salina de 2x citrato de sódio (SSC) onde é incubada a 60°C durante cerca de 40 minutos, o que removerá as regiões de DNA exceto as regiões de DNA satélite repetitivo. A lâmina é lavada mais uma vez num *coplin* com água destilada e depois é imersa num *coplin* com corante *Giemsa* durante cerca de 10 minutos e depois a lâmina é novamente transferida para um *coplin* com água destilada para lavar o excesso de corante^{[22][40]}.

As lâminas bandadas com a técnica de bandagem C são depois deixadas a temperatura ambiente para secar ou são limpas e depois podem ser imediatamente observadas ao microscópio de campo claro.

6.5.3. Bandagem AgNOR

A técnica de bandagem AgNOR permite a identificação das regiões organizadoras do nucléolo situadas nas extremidades dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 que contêm genes responsáveis pela síntese de RNA ribossomal, sendo assim útil para detetar rearranjos envolvendo estes cromossomas e para auxiliar a caracterização de cromossomas marcadores^[22].

6.6. Análise das metafases ao microscópio

Após a bandagem das lâminas, estas são analisadas ao microscópio. Para encontrar metafases começa-se por ver na objetiva de 10x, procurando metafases com cromossomas longos, distendidos, com um padrão de bandas adequado e que não estejam sobrepostos. Quando uma metafase com estas características é encontrada, aumenta-se a ampliação ao mudar da objetiva de 10x para a objetiva de imersão que tem uma ampliação de 100x. Se com esta ampliação a metafase tiver as características ideais, anotam-se as coordenadas da metafase na folha de análise para que no caso de

ser necessário, visitar esta metafase. De seguida anota-se se esta metafase é utilizada para fazer a contagem do número de cromossomas ou para análise do cariótipo.

O estudo do cariótipo é feito analisando a estrutura (ou seja, o padrão de bandas) de todos os cromossomas. O número de metafases a analisar estabelecido pelas *guidelines internacionais (General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics de European Cytogenetics Association)* é de 12-15 metafases, este número foi estabelecido de modo a que seja possível analisar o mínimo de 2 células comparando os cromossomas homólogos (incluindo o cromossoma X e Y) banda a banda, e no caso de haver sobreposições entre os cromossomas, os pares de cromossomas envolvidos na sobreposição devem ser analisados noutra metafase onde estes não se encontrem sobrepostos para garantir que não existe um rearranjo estrutural ocultado pela sobreposição. Quando é identificado um possível mosaicismo, é necessário fazer a análise de metafases adicionais, podendo esse estudo adicional ser moderado ou exaustivo. Um estudo adicional moderado (análise de 30 metafases) é efetuado quando é detetado um rearranjo cromossómico equilibrado em múltiplas metafases, uma monossomia detetada em múltiplas metafases, um cromossoma sexual supranumerário detetado numa ou mais metafases ou trissomia dos autossomas 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17 ou 19 detetada numa ou mais metafases. Um estudo adicional exaustivo (análise de 50 metafases) é efetuado quando é detetado um cromossoma marcador em múltiplas metafases, um rearranjo cromossómico desequilibrado em múltiplas metafases ou trissomia dos autossomas 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21 ou 22 detetada numa ou mais metafases. As metafases são capturadas no *software Cytovision®* de modo a construir cariogramas, que em conjunto com a observação ao microscópio se utiliza para a realização da análise das metafases. As capturas devem ser de metafases com as características mencionadas previamente, sendo o padrão de resolução dos cromossomas um dos fatores mais cruciais, ou seja, que as bandas sejam nítidas, com um padrão de bandas adequado ao motivo do estudo citogenético e com bandas que não estejam sobrepostas. Para identificar se existe algum rearranjo nos cromossomas e onde se situam os pontos de quebra que deram origem ao mesmo, as bandas dos cromossomas estudados são comparadas com ideogramas presentes no ISCN com a mesma resolução das bandas dos cromossomas em estudo.

Antes de se elaborar o relatório, outro técnico efetua a revisão do caso para confirmar o diagnóstico, isto é feito analisando os cariogramas efetuados previamente e verificar se o resultado obtido por ambos os técnicos são coincidentes. Sendo o resultado do cariótipo confirmado por ambos os técnicos, o relatório do caso é elaborado descrevendo o modo de análise do caso, o resultado obtido e a interpretação do mesmo.

6.7. Nomenclatura

Após a descoberta do número de cromossomas Tijo e Levan em 1956, um grande interesse sobre o tema da citogenética foi suscitado levando à criação de vários sistemas de nomenclatura de cromossomas o que gerou grande confusão na literatura. Isto levou à necessidade de criar um sistema de nomenclatura comum que facilitaria a comunicação em todos os laboratórios da área da citogenética, assim, foram realizadas várias conferências com especialistas e em 1977 foi decidido criar um sistema de nomenclatura citogenética internacional, o “*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978)*” que era a culminação de todas as conferências importantes realizadas previamente. Ao longo dos anos, este sistema tem sido atualizado para estar a par das novas descobertas no campo e suportar o uso de novas metodologias^[41].

Num cariógrama os autossomas estão numerados de 1 a 22 e os cromossomas sexuais são denominados X e Y. Os cromossomas são ainda distribuídos por grupos de A a G, baseados no seu tamanho e posição de centrómero que influencia a razão de tamanho do braço longo e do braço curto do cromossoma [\(Tabela 1\)](#) ^[41].

Tabela 1- Grupos de cromossomas.

Grupo A	1-3	Cromossomas metacêntricos grandes, distinguidos pelo tamanho e posição do centrómero
Grupo B	4-5	Cromossomas submetacêntricos grandes
Grupo C	6-12, X	Cromossomas metacêntricos ou submetacêntricos de tamanho médio
Grupo D	13-15	Cromossomas acrocêntricos de tamanho grande
Grupo E	16-18	Cromossomas metacêntricos e submetacêntricos curtos
Grupo F	19-20	Cromossomas metacêntricos curtos
Grupo G	21-22, Y	Cromossomas acrocêntricos curtos e o cromossoma Y.

Cada cromossoma possui uma série característica de bandas, que são uma parte do cromossoma claramente distintas de partes adjacentes devido a uma coloração escura ou clara dependendo do tipo de bandagem, estas bandas são designadas como regiões, bandas ou sub-bandas. Regiões são delimitadas por características morfológicas nos cromossomas que são consistentes e importantes na identificação dos cromossomas, estas regiões estão divididas em bandas que podem ainda ser subdivididas em sub-bandas (estas são marcadas na sua designação com um ponto final). Para designar uma banda particular são necessárias 4 informações: número de cromossoma, símbolo do braço do cromossoma, número da região e banda da região.

Estas informações são dadas nesta ordem sem espaçamento^[42]. Por exemplo a sub-banda 2 da banda 1 da região 1 do braço curto do cromossoma 2 designa-se: 2p11.2 (Figura 20).

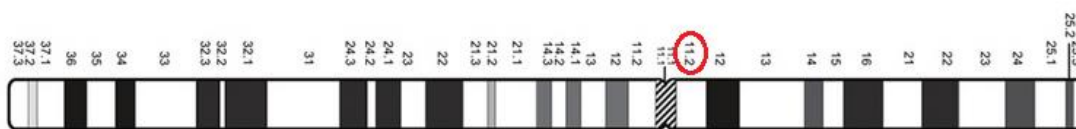


Figura 20- Idiograma do cromossoma 2 indicando a localização 2p11.2. Adaptado de McGowan-Jordan, J., Hastings, R. J., & Moore, S. (2020). ISCN 2020: An international system for human cytogenomic nomenclature (2020). Karger.

6.8. Criopreservação das culturas celulares

A preservação das culturas celulares é um aspeto importante da citogenética uma vez que, no futuro, podem ser requisitados novos testes para certo caso, logo é importante manter as células vivas e com capacidade proliferativa durante longos prazos de tempo. Isto pode ser alcançado com criopreservação, uma técnica que utiliza nitrogénio líquido para congelar e preservar as células permitindo também reduzir o risco de contaminação, evita a senescência e minimiza os efeitos de aparecimento de novas variantes genéticas^[42].

O processo de congelamento é crítico para as células, uma vez que um congelamento rápido permitirá a formação de cristais de gelo que podem colapsar a estrutura da própria célula, isto é, pode provocar a morte celular. Um congelamento não apropriado pode também desnaturar proteínas, alterar o pH e perturbar as concentrações de eletrólitos (Figura 21). Assim o congelamento deve ser feito lentamente para permitir que a água no interior da célula saia antes das células congelarem, este processo é auxiliado com um agente criopreservador, dimetilsulfóxido (DMSO) ou 10% glicerol que, quando adicionado ao meio de criopreservação, baixa a temperatura de congelamento permitindo um congelamento mais gradual o que é essencial para controlar as perdas de água na célula^{[22][42]}.

O procedimento de congelamento começa por isolar as células num tubo falcon que é centrifugado e onde posteriormente é removido o sobrenadante. Depois é adicionada a solução de criopreservação com DMSO e FCS a 1% às células, muito lentamente, para evitar a formação de cristais. As células são depois transferidas para uma ampola de criopreservação, devidamente identificada com o número do caso e data de criopreservação, que será então colocada em gelo a 4°C, durante 30min no mínimo. Depois as ampolas são transferidas para gelo seco a -80C, durante mais 30min. Por fim são colocadas nas arcas de azoto líquido^[42].

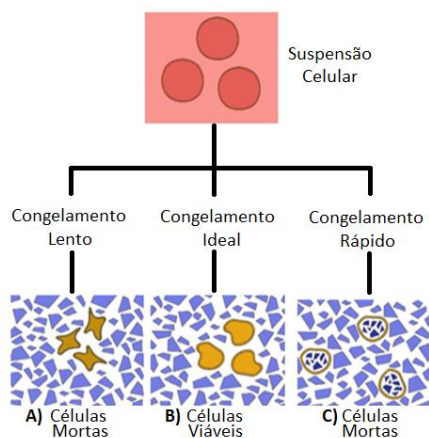


Figura 21- Efeitos dos diferentes tempos de congelamento na morfologia intracelular. A) Um maior tempo de congelamento contribui para uma maior saída de água da célula devido a osmose uma vez que a água extracelular se transforma em cristais de gelo. B) A maior viabilidade das células é atingida quando é utilizado um tempo intermédio de congelamento equilibrando o risco de formação de cristais de gelo no meio intracelular com a diminuição da água perdida por osmose. C) Um congelamento rápido contribui para a formação de cristais de gelo no meio intracelular o que resulta na morte celular. Adaptado de Baust, J. M., Campbell, L. H., & Harbell, J. W. (2017). Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 53(10), 855–871. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0201-y>

Para descongelar as células, a ampola de criopreservação é removida da arca frigorífica a nitrogénio líquido e inserida imediatamente num banho de água a 37°C enquanto é agitada continuamente durante 60 segundos. Após o descongelamento a ampola é desinfetada com etanol a 70% e depois a suspensão celular descongelada é transferida para meio com solução de lavagem Hank's, para remover o DMSO. Depois a suspensão celular é centrifugada e no fim, as células são transferidas para a caixa de cultura celular com o meio de cultura apropriado. Estas devem ser observadas após 24h para verificar se as células aderiram à caixa de cultura e o meio deve ser mudado de 2-5 dias após o estabelecimento da cultura verificando se a linha celular foi reestabelecida com sucesso^[42].

Capítulo VII- Citogenética molecular

Citogenética molecular é um campo de estudo que combina citogenética com técnicas de biologia molecular, focando-se à análise dos cromossomas a um nível molecular de modo a entender a sua estrutura, função e o seu papel em doenças genéticas. A introdução de técnicas moleculares como hibridização de DNA e PCR revolucionaram o campo da citogenética e assim estas técnicas permitiram a visualização e mapeamento de certos genes e sequências de DNA em cromossomas com uma resolução maior, possibilitando a obtenção de informação mais detalhada sobre anomalias cromossómicas.

7.1. *Fluorescent in-situ hybridization*

Uma das conquistas mais cruciais da citogenética molecular foi o desenvolvimento da técnica de FISH em 1980 que permitiu, com o uso de sondas de DNA fluorescentes, detectar sequências específicas de DNA ao hibridizar a sonda fluorescente à sequência de DNA que se pretende identificar. Isto permitiu, pela primeira vez, identificar genes específicos e regiões cromossômicas com grande precisão possibilitando a investigadores e clínicos estudar anomalias cromossômicas a um nível molecular correlacionando-as com várias doenças genéticas. Assim foi um passo importante para a diminuição do tempo de diagnóstico de certas doenças genéticas como síndrome de Turner, síndrome de Down e até certos tipos de cânceros.

FISH é uma técnica poderosa com um leque amplo de usos. Em diagnóstico pré e pós-natal FISH pode ser usado para a detecção de anomalias cromossômicas numéricas e anomalias cromossômicas estruturais não detectáveis pela citogenética convencional como translocações, inserções e inversões abaixo do nível de resolução da citogenética convencional, assim como, microduplicações e microdeleções que muitas vezes têm síndromes associadas, como a síndrome de Prader-Willi, Angelman e DiGeorge. É também especialmente útil na detecção de mosaicismos de baixa expressão e caracterização de cromossomas marcadores assim como a identificação de rearranjos desequilibrados em regiões sub-teloméricas em pacientes com déficit intelectual e malformações congênitas. Na situação de diagnóstico genético de pré-implantação é usado para a identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais. É aplicada no diagnóstico de cancro, detectando anomalias genéticas específicas que estão associadas com vários tipos de cancro, permitindo oferecer um tratamento mais personalizado e específico para o caso em questão.

A elevada especificidade da técnica de FISH é justificada pela necessidade de sondas que hibridizem numa sequência específica de DNA, assim sondas de FISH podem ser construídas para o estudo de quase qualquer região cromossômica. Grande parte das sondas de FISH pertencem a uma de três categorias: sondas de sequências repetitivas (centroméricas e teloméricas), sondas de pintura cromossômica (WCP) ou sondas de sequência única^[22].

As sondas de sequências repetitivas ([Figura 22](#)) mais usadas são direcionadas para as regiões α -satélite dos cromossomas, estas são localizadas nos centrómeros e são compostas por monómeros repetitivos em *tandem*. Este tipo de sondas é especialmente útil para a detecção de aneuploidias em células em metafase e interfase, detecção de mosaicismos de baixo nível e identificação de cromossomas marcadores. Existem outros tipos de sequências repetitivas para as quais são produzidas sondas de FISH, como sequências β -satélite localizadas nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos, sequências satélite “clássicas” encontradas, por exemplo, em regiões de heterocromatina do cromossoma Y e sequências repetitivas teloméricas^[22].



Figura 22- Sondas centroméricas para os cromossomas X, Y e 18 observadas por FISH em células interfásicas permitindo a observação de uma célula trissômica para o cromossoma X num indivíduo do sexo feminino. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Sondas de pintura cromossômica (WCP) que marcam um cromossoma na sua totalidade são compostas de sequências únicas e sequências repetitivas para um cromossoma inteiro ou região cromossômica (Figura 23). Estas sondas para serem produzidas precisam que o DNA de um cromossoma seja isolado do resto do genoma, isto pode ser feito com citometria de fluxo ou microdissecção de cromossomas e posterior amplificação das suas sequências por PCR. Este tipo de sondas é frequentemente utilizado para o estudo de rearranjos estruturais como translocações, inserções e para identificação da origem de cromossomas marcadores^[22].

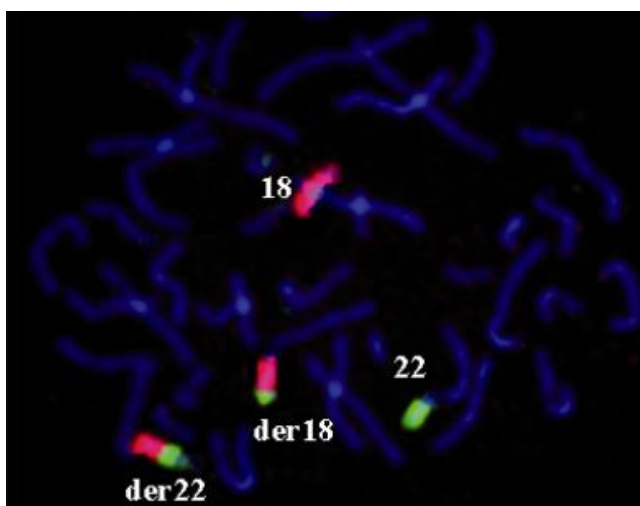


Figura 23- Sondas de pintura cromossômica para os cromossomas 18 (vermelho) e 22 (verde) permitindo a observação de uma translocação recíproca entre o cromossoma 18 e 22. Fonte: Dutta, Usha & Ponnala, Rajitha & Dalal, Ashwin. (2014). A Novel de novo Balanced Reciprocal Translocation t(18;22) Associated with Recurrent Miscarriages: A Case Report. *Journal of reproduction & infertility*. 15. 113-6.

Sondas de sequência única que são específicas para uma determinada região do genoma, (Figura 24) são produzidas usando regiões do genoma que são clonadas usando vetores como cosmídeos ou cromossomas bacterianos artificiais, ou por PCR usando *primers* para uma sequência específica. Estas sondas podem ter 1 kilobase a 1 megabase e são usadas para examinar uma sequência particular de modo a detetar CNV de uma

sequência específica ou localização da sequência. São úteis para detetar pontos de quebra nos cromossomas e também para o estudo das síndromes de microduplicação e microdeleção, como por exemplo, DiGeorge, Williams, Prader-Willi e Angelman^[22]. Outra variante de sondas de sequência, são sondas específicas para as regiões subteloméricas, direcionadas para a região terminal dos cromossomas humanos. Estas são úteis na deteção de deleções e duplicações nas regiões subteloméricas, uma vez que rearranjos detetados nestas regiões estão associados a indivíduos com défice intelectual idiopático, características dimórficas não específicas e atraso do desenvolvimento.



Figura 24- Sondas de sequência única para o gene *RAI1*, associado à síndrome de *Smith-Magenis* (sinal verde) no cromossoma 17 e sonda de controlo para 17q (sinal laranja) mostrando um cromossoma normal (seta branca) e um cromossoma com uma deleção do gene *RAI1* (seta vermelha). Fonte: Vlangos, C. N., Wilson, M., Blancato, J., Smith, A. C. M., & Elsea, S. H. (2004). Diagnostic fish probes for del(17)(p11.2p11.2) associated with Smith-Magenis syndrome should contain the *rai1* gene. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 132A(3), 278–282. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30461>

O procedimento para aplicar a técnica de FISH engloba as seguintes etapas: avaliação das lâminas; pré-tratamento; desidratação; aplicação das sondas; co-desnaturação; hibridização; lavagens pós-hibridização; aplicação do DAPI; análise no microscópio de fluorescência.

O primeiro passo é a avaliação das lâminas, que devem ter metafases com cromossomas compridos e bem espalhados, sem citoplasma, uma vez que este dificulta o acesso das sondas ao material alvo. Na presença de citoplasma, deverá ser feita uma digestão com solução de pepsina, após o pré-tratamento para remoção do citoplasma. De seguida é efetuado o pré-tratamento, com o objetivo de facilitar o acesso das sondas ao seu alvo. Isto é feito imergindo as lâminas numa solução de 2xSSC a 37°C. A desidratação é depois feita imergindo as lâminas em várias soluções cada vez mais alcoólicas sequencialmente (70%, 85%, 100%) durante 2 minutos. A lâmina é depois deixada a secar. De seguida é observada ao microscópio de contraste de fase para delimitar a área de interesse onde se vão aplicar as sondas, que deve conter uma grande quantidade de células em metafase ou núcleos celulares. As sondas são depois aplicadas na área delimitada. A lâmina é colocada numa placa de aquecimento para fazer a co-

desnaturação do DNA da amostra e das sondas. Depois da co-desnaturação as lâminas são incubadas numa câmara húmida e escura, que vai ser introduzida numa estufa a 37°C onde vai ser incubada *overnight* (16h a 20h) de modo a suscitar a hibridização entre a sonda e o DNA da amostra. Após a hibridização da amostra é feita a lavagem das sondas que não foram hibridizadas imergindo-as primeiro numa solução 2xSSC com *Tween* (um surfactante não-iónico de baixa toxicidade) de modo a separar a lamela da lâmina. De seguida as lâminas são imersas numa solução de lavagem (0,5xSSC a 68°C) e depois são inseridas numa solução de 2xSSC e *Tween* a temperatura ambiente para remover completamente o excesso de sondas que não hibridizaram. De seguida aplica-se DAPI (um corante que confere contraste à cromatina) nas áreas delimitadas anteriormente possibilitando a visualização dos cromossomas ao microscópio de fluorescência. As lâminas são depois armazenadas no frigorífico até a sua análise (devem permanecer pelo menos 15 minutos no frigorífico previamente à sua análise) no microscópio de fluorescência. De seguida é feita a análise das lâminas ao microscópio de fluorescência.

Uma das grandes vantagens da técnica de FISH é o facto de ser uma técnica dirigida, possibilitando a deteção de sequências específicas de DNA. É também uma técnica de rápida aplicação podendo ser utilizada em casos clínicos urgentes uma vez que é possível obter resultados em 24h a 48h quando não é necessário efetuar culturas celulares, como é o caso da análise de células interfásicas. O facto que a técnica pode ser aplicada em ambos cromossomas em metafase e interfase confere à técnica grande flexibilidade, facilitando a deteção de mosaicos assim como alterações cromossómicas numéricas e estruturais e permite a caracterização de cromossomas marcadores.

As desvantagens da técnica de FISH são: é uma técnica dirigida, o que quer dizer que apenas deteta alterações abrangidas pelas sondas utilizadas e assim pode não detetar outras anomalias genéticas presentes e é uma técnica com um elevado custo económico.

Capítulo VIII- Genética molecular e genómica

Genética molecular e genómica são dois campos de estudo relacionados com um foco em perceber a estrutura, função e organização de genes e genoma. Genética molecular investiga primariamente genes e a forma de como estes são passados de geração em geração, como são regulados e como mutações nestes podem originar doenças^[44]. Por outro lado, a genómica é um campo mais amplo uma vez que o seu objetivo é o estudo de genomas inteiros e visa investigar como alterações neste contribuem para a variação do fenótipo de um indivíduo^[45].~

8.1. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA é um passo necessário para se realizarem técnicas de genética molecular uma vez que é o processo onde o DNA é isolado e purificado a partir de células e tecidos de modo que tenha uma qualidade e pureza (sem contaminantes como proteínas, RNA ou outros químicos contaminantes) necessária para se poder efetuar um teste de diagnóstico genético fidedigno. Para obter DNA de modo a se efetuarem os testes de diagnóstico genéticos, podem ser usados diversos diferentes amostras biológicas, porém, no contexto do diagnóstico pré-natal e pós-natal são utilizados maioritariamente: amniócitos, vilosidades coriônicas, fibroblastos e sangue periférico.

Existem vários métodos de extração de DNA, no entanto, no LCG-FMUC utilizam-se 2 kits em que se utilizam duas metodologias diferentes para a extração de DNA: o kit da *Agilent*[®] que utiliza o método de *salting-out* para extrair DNA de sangue periférico e o kit da *Roche*[®] que utiliza o método de colunas de sílica para extrair DNA.

O método de extração *salting-out* começa por fazer uma lise da membrana celular para libertar o DNA dos leucócitos e uma digestão de proteínas, isto é feito incubando a amostra com um tampão de lise celular e pronase. De seguida é feita a precipitação das proteínas utilizando uma solução salina, isto formará um precipitado viscoso esbranquiçado, de seguida o tubo é centrifugado dando origem a um *pellet* que consiste nas proteínas lisadas e precipitadas anteriormente. O sobrenadante contém o DNA genómico que iremos extrair para outro tubo utilizando uma pipeta, cuidadosamente para não aspirar nenhum conteúdo do *pellet* formado aquando da centrifugação uma vez que contém proteínas e outras substâncias contaminantes que podem interferir com os testes genéticos. De seguida faz-se a precipitação do DNA utilizando etanol, formando um *pellet* de DNA que terá um tamanho maior ou menor consoante a quantidade de DNA presente na amostra, o tamanho deste *pellet* será também indicativo da quantidade de tampão de eluição utilizado para eluir o DNA. O *pellet* de DNA é retirado e inserido num tubo com tampão de eluição que após eluído está pronto a quantificar e depois a ser usado em testes genéticos ou armazenar para futuros testes. O método de extração de DNA por *salting-out* da *Agilent*[®] é um método rápido de extração de DNA genómico de baixa toxicidade, uma vez que, é baseado puramente na separação de proteínas contaminantes do DNA genómico^[46].

O método de extração usando colunas de sílica começa ([Figura 25](#)) por fazer uma lise das células incubando-as com proteinase K e com um tampão de lise. Depois da digestão celular, é feita a precipitação do DNA na amostra com isopropanol e é transferida para uma coluna de sílica que possui carga positiva e assim atrai o DNA que possui carga negativa. De seguida são feitas centrifugações usando soluções tampão de lavagem, de forma a eliminar conteúdos celulares contaminantes que afetarão a pureza do DNA genómico extraído. Após uma série de 4 lavagens é adicionado tampão de eluição para eluir o DNA e depois de uma última centrifugação o DNA está pronto para ser quantificado. O método de extração de DNA por colunas de sílica da *Roche*[®] permite

isolar e purificar o DNA genómico utilizando um método simples baseado em lavagens usando centrifugações em série [46].

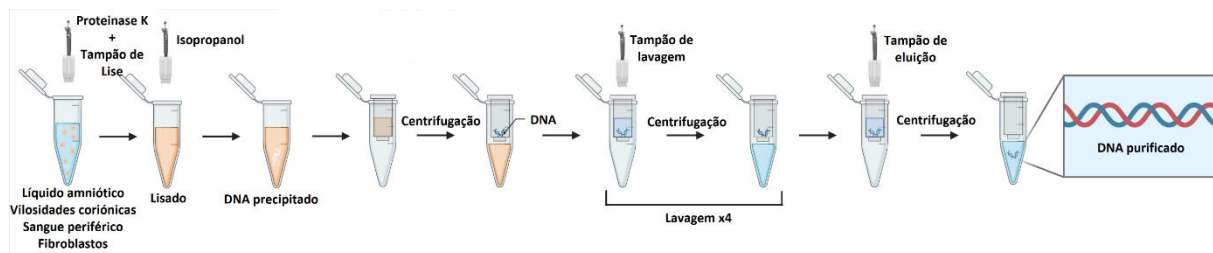


Figura 25- Esquema do processo de extração de DNA usando colunas de sílica. Adaptado de *AssayWise Letters* 2022, Vol. 11.

Após a extração do DNA, este é quantificado por espectrofotometria ao medir a sua absorvância a 260nm (A_{260}) uma vez que nucleótidos, RNA e DNA absorvem luz nesse comprimento de onda. Para verificar que o DNA genómico se encontra sem contaminantes a sua absorvância com outros comprimentos de onda também são medidos, 230nm (A_{230}) e 280nm (A_{280}), e ao fazer a razão entre A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} é possível estimar a pureza do DNA extraído. A razão A_{260}/A_{280} é usada para medir a pureza de DNA e RNA, sendo que um valor de aproximadamente 1,8 é o ideal para considerar o DNA puro, se este valor for consideravelmente abaixo deste é importante considerar a possibilidade de contaminação do DNA por proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvam luz a um comprimento de onda a 280nm. Para além disso pequenas variações do pH também causam variações no valor da razão A_{260}/A_{280} . A razão A_{260}/A_{230} é usada como medida secundária dos ácidos nucleicos, nesta razão, os ácidos nucleicos são considerados puros quando apresentam um valor de 2,0-2,2, se os valores forem consideravelmente inferiores, podem indicar a presença de contaminantes que absorvam luz num comprimento de onda de 230nm, como carboidratos e fenóis [47].

Quando após a extração a quantidade de DNA presente na amostra extraída é insuficiente para realizar determinado tipo de teste diagnóstico, é necessário fazer uma concentração e purificação de DNA. Para isto é utilizado o kit purificação e concentração da *Zymo Research*®, o procedimento é feito através de uma série de lavagens sequenciais da amostra numa coluna de sílica com o auxílio de um tampão de lavagem, onde estas são sujeitas a centrifugações entre cada lavagem de modo que os contaminantes sejam removidos das colunas e posteriormente descartados, obtendo assim um DNA purificado com maior concentração e pureza.

8.2. *Quantitative fluorescent polymerase chain reaction*

Apesar do diagnóstico pré-natal por citogenética convencional ser crucial, uma das inegáveis desvantagens é o elevado tempo de espera necessário para obter resultados devido à necessidade de criar uma cultura celular. O QF-PCR consegue contornar este obstáculo, através do despiste rápido das aneuploidias mais comuns (aneuploidias dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y) que permite obter resultados num

espaço de 24-48 horas, por uma fração do preço do diagnóstico por citogenética convencional por cariótipo ou diagnóstico utilizando a técnica de *FISH*^[48].

A técnica de QF-PCR consiste na amplificação de sequências de DNA específicas a certo cromossoma, os STRs, que são polimórficos de pessoa para pessoa, sendo assim possível a identificação da origem de cada alelo do paciente, se este não for homozigótico para esse alelo. Para fazer a técnica de QF-PCR é necessário utilizar DNA extraído e purificado anteriormente, este é diluído até que a concentração de DNA desejada seja atingida. O DNA é depois transferido para as misturas de PCR que contêm *primers* fluorescentes dirigidos para as regiões alvo onde existem os STRs, DNA polimerases, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) e buffer da reação de PCR. Estas regiões são amplificadas por PCR e uma vez que os *primers* utilizados para a amplificação são fluorescentes, as sequências amplificadas serão, conseqüentemente, fluorescentes^[49]. Estas sequências são separadas usando eletroforese capilar e o número de cópias é calculado no analisador genético que emite um eletroferograma. Este apresenta vários picos com áreas distintas em cada marcador com base na fluorescência emitida pelos fragmentos e a partir dessa área o número de cópias de cada marcador pode ser calculado^[48].

O eletroferograma é posteriormente analisado no *software GeneMapper*. Na análise das aneuploidias mais comuns existem padrões de picos característicos que permitem identificar ou excluir a presença de aneuploidias. Devido aos marcadores de STRs serem regiões hipervariáveis do genoma, estes conferem um carácter polimórfico a um *locus* permitindo a distinção dos alelos diferentes herdados dos progenitores quando os alelos não são homozigóticos, que são representados por picos distintos em dado marcador. Num indivíduo normal heterozigótico para determinado *locus*, o respetivo marcador apresentará dois picos de tamanho semelhante, um representativo de cada progenitor (ratio 1:1) enquanto num indivíduo normal homozigótico apresentará apenas um pico. Num indivíduo com trissomia, num determinado marcador poderão ser observados três picos distintos do mesmo tamanho (ratio 1:1:1), dois picos distintos com tamanho diferente (ratio 2:1) ou apenas um pico presente. Quando uma amostra apresenta apenas um pico em determinado marcador não podemos afirmar que o indivíduo é monozigótico, normal homozigótico ou trissómico homozigótico, assim esse marcador é classificado como não informativo uma vez que não nos permite identificar o número de cópias presente^[49]. No caso da avaliação do número de cromossomas sexuais presentes na amostra, se o indivíduo for do sexo masculino, irá existir amplificação dos marcadores polimórficos do cromossoma X e dos marcadores polimórficos e não polimórficos do cromossoma Y. Na análise do cromossoma X é feita a comparação com marcadores não polimórficos do cromossoma 3 e 7, que têm sequências idênticas a sequências amplificadas nos cromossomas X e Y. Isto permite verificar, por comparação, o número de cromossomas X presentes na amostra avaliando a presença de síndromes do cromossoma X. No caso de a amostra ser de indivíduo do

sexo feminino, não haverá amplificação dos marcadores associados às regiões do cromossoma Y e haverá amplificação de marcadores associados ao cromossoma X que, por comparação com os sinais emitidos pelos marcadores polimórficos dos autossomas e pelos marcadores não polimórficos dos cromossomas 3 e 7, se poderá calcular o número de cromossomas X presentes na amostra (Figura 26) [50].

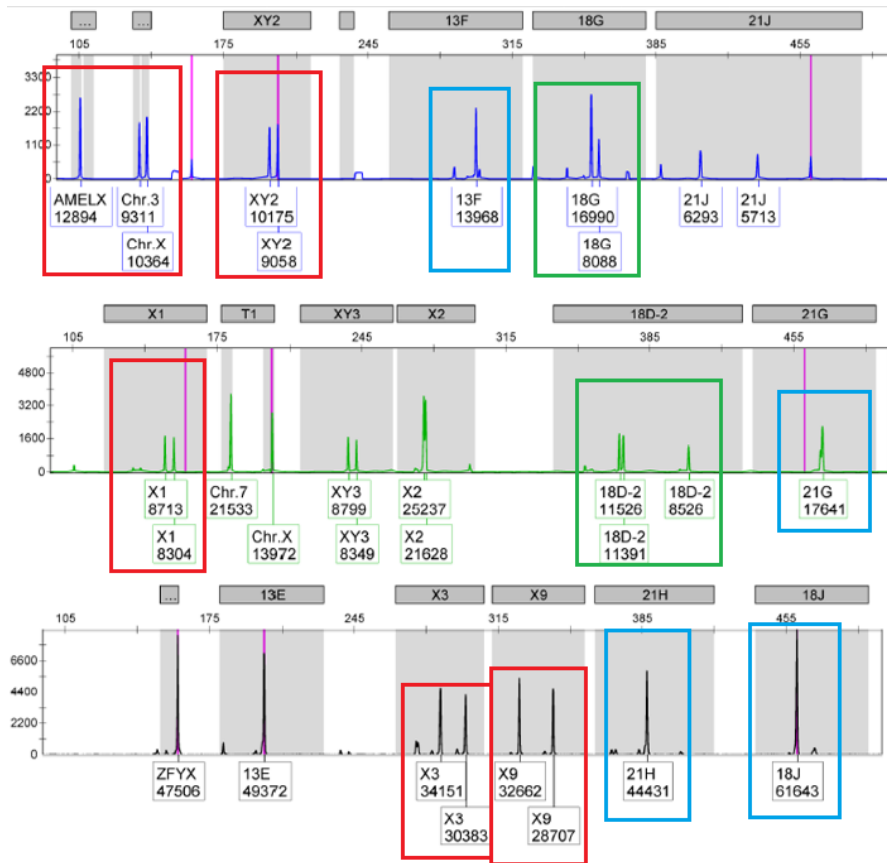


Figura 26- Eletroferograma de um QF-PCR de um indivíduo do sexo feminino (vermelho), com trissomia do cromossoma 18 (verde) evidenciado pelos picos dos marcadores do cromossoma 18 onde estão respetivamente num ratio de 2:1 e 1:1:1. A azul estão assinalados marcadores não informativos. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Para se interpretar o resultado como normal, pelo menos 2 marcadores informativos por cromossoma devem ser identificados. No caso de o resultado ser uma trissomia de determinado cromossoma, devem ser identificados pelo menos dois marcadores informativos e consistentes com resultado de trissomia do respetivo cromossoma. Neste caso, o padrão de picos pode indicar diferentes mecanismos que deram origem à trissomia. A presença de resultados com um *ratio* 1:1:1 é consistente com o fenómeno de não-disjunção meiótica e a ausência desse resultado indica a possibilidade de ter ocorrido uma não-disjunção mitótica ou de um mosaicismo confinado à placenta. Isto deve ser considerado na interpretação do resultado e antes do resultado ser reportado no relatório, os resultados anormais devem ser confirmados refazendo o mesmo teste ou por comparação com uma amostra sanguínea materna. No caso de resultados inconclusivos é recomendado que sejam feitos mais estudos, efetuando novamente o teste com outra cultura das células do paciente, efetuar o

estudo dos progenitores ou efetuar estudos por outras técnicas como FISH, cariótipo ou microarray^[50].

A técnica de QF-PCR permite também detetar mosaicismo, com um limite de 20%, para trissomia em células normais. A possibilidade de mosaicismo é posta em causa quando existe picos adicionais ou ratios diferentes dos padrões característicos^[50].

De seguida, o relatório do caso analisado deve ser realizado, este deve apresentar o resultado com a nomenclatura conforme a edição mais recente do ISCN e o relatório deve estar feito, contendo toda a informação necessária para a interpretação do caso conforme as *guidelines* internacionais. QF-PCR é um teste diagnóstico e não precisa de testes de confirmação, mas este teste não possibilita a deteção de alterações em regiões não abrangidas pelos marcadores utilizados, nem deteta alterações equilibradas, e por isso é recomendado efetuar uma avaliação citogenética por cariótipo para determinar a possível presença destas alterações e determinar o seu risco de recorrência^[50]. Pode também ser necessário utilizar outras técnicas para procurar uma causa da indicação clínica quando é obtido um resultado normal utilizando a técnica de QF-PCR.

8.2.1. Despiste de contaminação materna

Contaminação da amostra fetal por células maternas pode comprometer os resultados de uma análise genética pré-natal, por isso é necessário saber identificar a presença de uma contaminação materna.

Com QF-PCR é possível identificar a presença de 2 genótipos, 1 genótipo fetal e 1 genótipo materno. A contaminação materna numa amostra fetal é identificável pelo seu padrão de picos alélicos tendo caracteristicamente 3 picos de diferentes alturas com um padrão $A+B=C$ onde A e B são os alelos fetais e maternos específicos e o pico C é o alelo partilhado pela mãe e o feto, sendo que a altura dos picos dos alelos A e B estarão correlacionados com o nível de contaminação materna presente na amostra. A identificação de qual pico alélico é pertencente ao feto e qual é pertencente à mãe apenas é possível se o feto for do sexo masculino ou se forem efetuados testes à amostra materna^[50].

Quando é identificado a presença de contaminação materna na amostra fetal, testes adicionais devem ser feitos consoante o tipo de amostra testada. No caso de vilosidades coriônicas, o caso mais comum de contaminação materna é a presença de resíduos de tecido materno na amostra fetal^[51], por isso, é importante que estas sejam cuidadosamente dissecadas e que o material fetal seja separado do material materno antes de ser testado, adicionalmente, no caso de o feto ser do sexo feminino uma amostra materna deve ser testada para confirmar a origem do tecido presente^[50].

No caso de amostras de líquido amniótico, o caso mais comum de contaminação materna é a presença de sangue materno no líquido amniótico, porém a presença de sangue não indica que tenha havido contaminação materna^[51]. É aceitável processar e

analisar amostras de líquido amniótico sanguinolento uma vez que o sangue pode ser de origem fetal ou pode ser de origem materna, mas estar presente em baixo nível, no entanto, as amostras do sexo feminino que tenham estas condições, a progenitora deve ser testada para permitir a confirmação da origem do genótipo presente no resultado^[51].

8.3. Diagnóstico da síndrome de X-Frágil

Síndrome do X-Frágil (FXS) é a causa mais comum de déficit intelectual herdado com uma incidência de cerca 1 em 4000 indivíduos do sexo masculino e uma incidência de 1 em 5000-8000 em indivíduos do sexo feminino^[52]. Esta síndrome é causada por um déficit ou ausência da proteína *fragile X messenger ribonucleoprotein* (FMRP) que é causada, em mais de 99% dos casos, por uma expansão de tripletos CGG na região não traduzida (UTR) 5' do gene *fragile X messenger ribonucleoprotein 1* (*FMR1*). Este gene está localizado no cromossoma X, mais especificamente em Xq27.1, e tem 17 exões constituindo um total de 49kb de DNA genómico. Este aumento de tripletos nessa região está associada à hipermetilação do gene e por consequência a inibição da sua transcrição impedindo que o gene *FMR1* seja transcrito e traduzido na proteína FMRP, que é teorizado que atua como um supressor de tradução que regula a síntese proteica em dendrites em resposta a sinais estimulantes sinápticos^[53].

A FXS é caracterizada por um déficit intelectual moderado a severo com atraso no desenvolvimento da linguagem e problemas comportamentais, sendo estes os sintomas mais comuns. Para além de défices cognitivos, indivíduos com FXS podem também apresentar ligeiros dimorfismos faciais e macroorquidismo, porém os sintomas não são específicos nem constantes em FXS, por isso a testagem para FXS normalmente faz parte na testagem genética em indivíduos com indicações clínicas de atraso de desenvolvimento, déficit cognitivo e problemas comportamentais^[52].

Existem 4 formas alélicas do gene *FMR1* classificadas pelo número de repetições do triplete CGG no gene presentes: (1) Alelo normal onde indivíduos têm 5 a 44 repetições e indivíduos com alelos normais não apresentam nenhuma instabilidade mitótica ou meiótica. Em alelos normais, a cerca de cada 9 repetições do triplete CGG existe um triplete AGG que é teorizado ter a função de impedir o emparelhamento incorreto das sequências repetitivas reduzindo o risco de expansão. (2) Alelo intermédio que consiste em alelos com 45 a 54 repetições de tripletos CGG no gene *FMR1*. Indivíduos com este número de repetições podem ser considerados normais uma vez que não estão associados a sintomas de FXS e não são capazes de expandir para uma mutação completa em apenas uma geração, assim apenas podem estar associados a FXS em gerações mais distantes. (3) Alelo com pré-mutação, que consiste em alelos com 55 a 200 repetições de tripletos CGG no gene *FMR1*. Estes alelos, quando transmitidos para a descendência, podem expandir resultando no aumento de tripletos o que pode resultar numa mutação completa, porém isto apenas acontece por transmissão

materna. A maioria dos indivíduos com uma pré-mutação não apresenta sintomas de FXS, porém existem casos em que um elevado número de repetições dos tripletos (>100) estejam associados com problemas de aprendizagem, comportamentais e até déficit intelectual ligeiro. Indivíduos com pré-mutação podem desenvolver outros sintomas, no caso de indivíduos do sexo masculino existe um risco de desenvolver síndrome de ataxia/tremores associada ao X-frágil (FXTAS) que tem uma penetrância maior em idades mais avançadas e é caracterizada por uma perda progressiva da função cognitiva, aumento de tremores e ataxia e desenvolvimento de problemas comportamentais. No caso de indivíduos do sexo feminino com uma pré-mutação, estes têm um risco de cerca de 20% de desenvolver insuficiência ovárica prematura associada ao X-frágil (FXPOI) e também podem desenvolver, com um risco menor que os indivíduos do sexo masculino, FXTAS. (4) Alelos com uma mutação completa, que consiste em alelos com mais de 200 repetições de tripletos CGG no gene *FMR1* e a identificação desta mutação é diagnóstica em indivíduos do sexo masculino uma vez que a penetrância é de 100%, porém em indivíduos do sexo feminino menos de 50% dos casos onde é detetada uma mutação completa existe a manifestação de déficit intelectual, apesar de detetar outros sintomas mais ligeiros o que pode ser explicado pela inativação ao acaso do cromossoma X^{[52] [53]}.

No LCG-FMUC para se realizar o diagnóstico da FXS é utilizado a técnica de PCR e TP-PCR para detetar o número de repetições de tripletos de CGG, uma vez que é a causa de mais de 99% dos casos de FXS^[52].

A técnica de PCR é um método fácil e rápido para detetar o número de tripletos CGG. A técnica é feita seguindo um protocolo de PCR convencional, mas utilizando *primers* específicos para uma porção da sequência do gene *FMR1* que inclui a região repetitiva de tripletos CGG^[54]. Após a reação de PCR é feita uma análise da amostra por eletroforese capilar onde o resultado irá ser analisado no *software GeneMapper* (Figura 27) possibilitando visualizar o eletroferograma com o fragmento amplificado e calcular o número de tripletos CGG da amostra e averiguar se esta é detentora de uma mutação completa, pré-mutação, mutação intermédia ou se tem um número de tripletos normal. Para calcular o número de tripletos na amostra, é necessário subtrair o número de nucleótidos presentes na região dos *primers* que precedem e sucedem as repetições dos tripletos CGG, dividir o resultado por três para obter ao número de tripletos CGG presentes na amostra e adicionar o fator de correção.

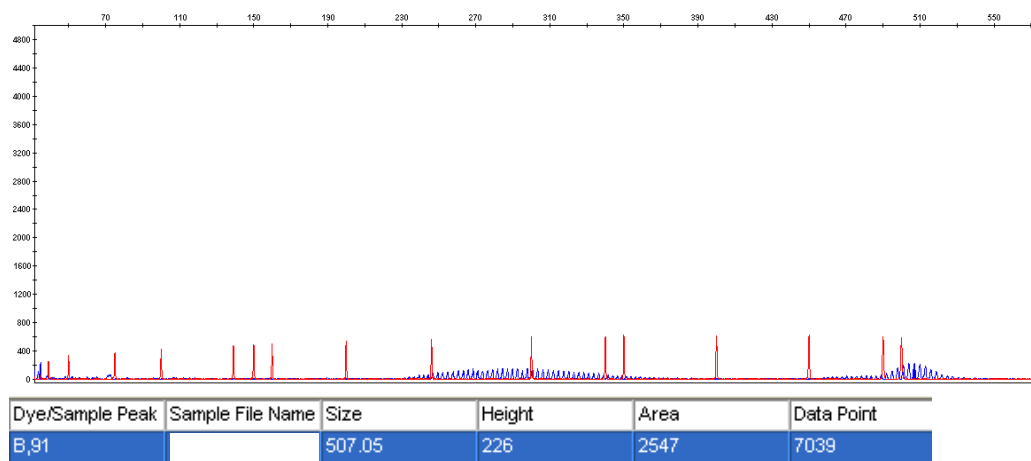


Figura 27- Eletroferograma do PCR convencional numa amostra do sexo masculino onde é possível observar um alelo com 101 ($507-221=284$; $284/3=94,667$; $94,667+6=100,667$) repetições de tripletos CGG o que constitui uma pré-mutação. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Quando são detetadas pré-mutações de grande número de tripletos, mutações completas, ou mulheres aparentemente homozigóticas, é efetuado a confirmação do resultado com o teste de TP-PCR (Figura 28) que utiliza *primers* que vão flanquear a região das repetições de tripletos CGG e utiliza *primers* CGG que se irão ligar à região de repetições CGG amplificando vários produtos, permitindo visualizá-los como picos no eletroferograma e identificar todos os alelos expandidos e o número e a localização das interrupções AGG^[55].

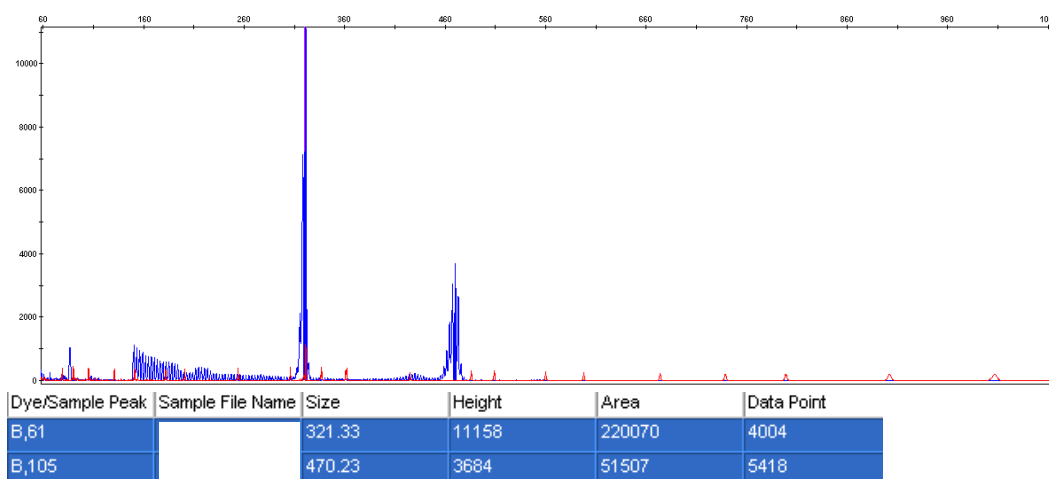


Figura 28- Eletroferograma do TP-PCR numa amostra do sexo feminino onde é possível observar um alelo com 31 ($321-228=93$; $93/3=31$) repetições de tripletos CGG o que constitui um alelo normal e um alelo com 81 ($470-228=242$; $242/3=80,667$) repetições de tripletos CGG o que constitui um alelo com pré-mutação. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Esta técnica é limitada pela sua impossibilidade de detetar outras mutações ou alterações no gene *FMR1* causadoras de FXS.

8.4. Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)

Chromosomal microarray (CMA) é uma metodologia de testes de diagnóstico genético que tem sido cada vez mais utilizado para testar indivíduos que apresentam manifestações como déficit intelectual, autismo ou outras anomalias congênitas^[56]. Esta metodologia engloba 2 tipos de testes, o aCGH e o *single nucleotide polymorphism array* (SNP)^[57]. O aCGH consiste em criar um mapa de números de cópia de sequências de DNA ao hibridizar simultaneamente o DNA da amostra em estudo com o DNA de referência usando diferentes fluorocromos, possibilitando, por comparação entre a fluorescência emitida pelos diferentes fluorocromos usados para marcar o DNA da amostra e o DNA de referência, detectar regiões no genoma da amostra de DNA usada onde existem CNVs^[58].

O aCGH tem-se tornado uma técnica essencial no diagnóstico pré-natal uma vez que, ao contrário da citogenética convencional, possibilita a detecção de microdeleções e microduplicações que podem estar associadas a diferentes patologias e o aCGH pode ser usado em DNA de bastantes tecidos diferentes. Porém o aCGH também tem algumas desvantagens associadas como não detectar alterações genéticas exceto CNVs, pode não detectar mosaicismos de baixo nível dependendo de fatores como plataforma usada, tipo de amostra ou qualidade do DNA utilizado, pode não elucidar o mecanismo que originou o CNV, não detecta CNVs em regiões não abrangidas pela plataforma utilizada e não detecta CNV abaixo do limite de resolução^[57]. Para além disso o uso da técnica de aCGH impõe vários desafios uma vez que a grande frequência de CNVs de grande escala no genoma humano complica o diagnóstico tornando a análise mais extensiva o que resulta num tempo de espera mais longo.

O aCGH também é especialmente importante no diagnóstico pós-natal permitindo a uma criança ou adulto ser diagnosticado no caso deste possuir manifestações cuja causa não é conhecida, como atraso do desenvolvimento, síndrome do espectro do autismo, déficit intelectual ou outras anomalias congênitas múltiplas^[56].

Para que haja uma interpretação clínica dos CNVs encontrados, é necessário que existam métodos para avaliar o conteúdo genómico do CNV e correlacionar essa região alterada com as indicações clínicas do caso em estudo. Isto é feito comparando o CNV do caso em estudo com as alterações detetadas noutros casos em bases de dados específicas. Assim é possível atribuir uma de 5 categorias a um CNV segundo guidelines internacionais^[59]:

- **Patogénica:** CNVs reportados e associados com fenótipos clínicos consistentes entre diferentes publicações e com penetrância e expressividade bem documentada; CNVs que se sobrepõem completamente com outra região reportada como patogénica; CNVs multigénicos em que pelo menos um gene está associado a sintomas patogénicos quando associado CNVs.

- **Provavelmente patogénica:** Deleções envolvidas no terminal 5' de genes haploinsuficientes; Deleções em vários exões num gene haploinsuficiente; deleções ou duplicações que envolvam genes em vários casos reportados que sejam consistentes com fenótipos específicos.
- **Significado incerto:** CNVs que estejam fora dos limites de tamanho estabelecido pelo laboratório para reportar e que não abranja genes no intervalo do CNV; CNVs descritos num pequeno número de casos na população geral e que não tem uma frequência suficiente para ser considerado um polimorfismo; CNVs que contenham um pequeno número de genes que não se sabe se estes são sensíveis a variações de dosagem; CNVs descritos em várias publicações ou bases de dados que sejam contraditórios e assim não ofereçam informações sólidas do significado clínico; CNVs dentro de um só gene sem um efeito claro no quadro de leitura de um transcrito.
- **Provavelmente benigna:** CNVs sem diferenças estatísticas relevantes entre as observações de casos e dos controlos; CNVs observados frequentemente na população geral, mas numa frequência abaixo do que é convencionalmente aceite para ser considerado um polimorfismo.
- **Benigna:** CNVs reportadas em várias publicações e em bases de dados como variantes benignas; CNVs que representam um polimorfismo comum benigno.

Para além da sua utilidade em detetar condições genéticas quer num contexto de diagnóstico pré-natal ou pós-natal, o aCGH é utilizado para detetar alterações genéticas cancerígenas uma vez que CNVs são comuns no cancro levando à alteração da expressão de vários oncogenes. A identificação destas regiões onde existem CNVs é crucial para se obter mais conhecimento nos mecanismos de formação do cancro e em torno permitir oferecer ferramentas especializadas para o tratamento do mesmo^[60].

Para realizar a técnica de aCGH é necessário marcar as amostras de DNA que queremos estudar e as amostras de referência previamente extraídas com fluorocromos de diferentes cores (Cy5- fluorocromo vermelho que marca as amostras em estudo; Cy3- fluorocromo verde que marca as amostras de referência), depois de marcar as amostras com os fluorocromos, estas têm que ser hibridizadas na presença de Cot-1 DNA para bloquear a hibridização não-específica e são hibridizadas com os oligonucleótidos presentes nas lâminas de vidro, o que é feito transferindo o DNA das amostras para as lâminas e fixar as mesmas com um *gasket* e depois inserir numa estufa a 65°C *overnight*. As lâminas, após a hibridização, são lavadas com *washing buffer* para remover o excesso de DNA que não foi hibridizado e depois são colocadas num *scanner* que medirá os *ratios* de fluorescência entre as amostras em estudo e as amostras de referência e nos dará os

resultados. Depois os resultados são submetidos a controlos de qualidade através da observação de vários parâmetros, e se estes passarem no controlo, serão analisados no *software* específico de análise de aCGH, *CytoGenomics* da *Agilent*® (Figura 29).

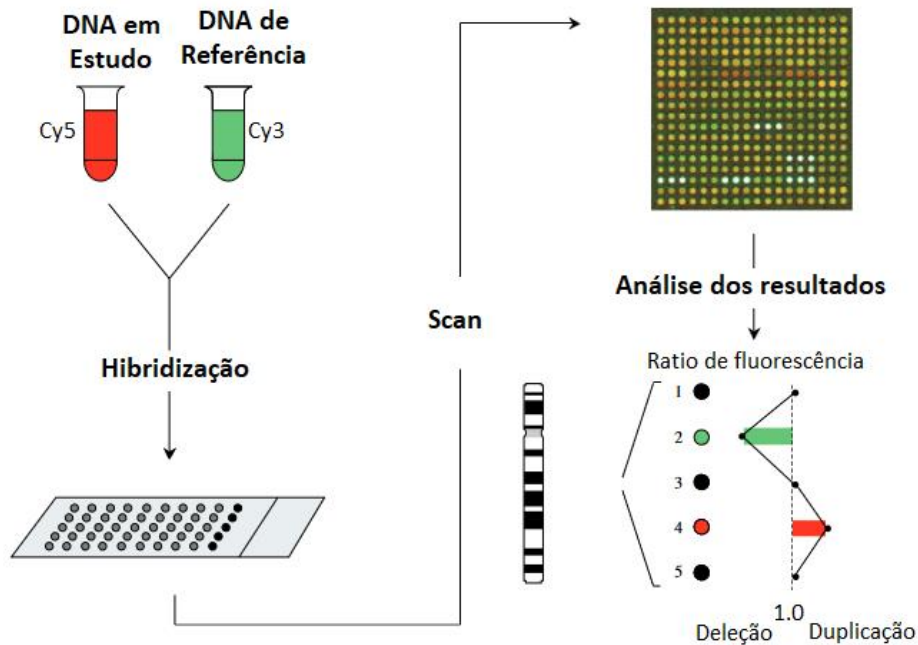


Figura 29- Representação esquemática do protocolo da técnica de aCGH. As amostras são primeiramente marcadas com os fluorocromos Cy5 e Cy3 (Cy5- amostra em estudo; Cy3- amostra de referência). Depois as amostras são hibridizadas na lâmina de vidro que contém oligonucleótidos de várias regiões genómicas. A lâmina com as amostras hibridizadas é analisada pelo *scanner* e, se os parâmetros de qualidade de controlo estiverem dentro de valores aceitáveis é feita a análise dos resultados no *software* próprio: *CytoGenomics* da *Agilent*®. Adaptado de Oostlander, A. E., Meijer, G. A., & Ylstra, B. (2004). *Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics*. In *Clinical Genetics* (Vol. 66, Issue 6, pp. 488–495). <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00322.x>

Os resultados são introduzidos no *software* e os *ratios* de intensidades de fluorescência emitidas pelos fluorocromos são traduzidas em valores logarítmicos. Quando não existem CNVs em determinado segmento, o valor logarítmico será zero: $\log_2\left(\frac{2}{2}\right)=0$. No caso de existirem CNVs num segmento, o valor logarítmico irá ser alterado e terá um valor negativo no caso de uma perda de número de cópias: $\log_2\left(\frac{1}{2}\right)=-1$; e um valor positivo quando existe um ganho de número de cópias: $\log_2\left(\frac{3}{2}\right)=0,58$ ^[61]. Para se analisar os CNVs, é utilizada a base de dados *University of California Santa Cruz Genome Browser* (*UCSC Genome Browser*), que tem dados de vários casos previamente descritos como, se o CNV foi um ganho ou perda, o tamanho do CNV, a sua classificação de patogenicidade e outros dados como genes abrangidos pelo CNV, registo de indivíduos saudáveis com CNVs e fenótipos associados com o CNV. Com estes dados é possível averiguar, por comparação, se a amostra em estudo é patogénica ou não, as suas possíveis manifestações clínicas ou atribuir uma síndrome ou doença ao caso em estudo.

Quando se encontram CNVs patogênicas é necessário fazer uma pesquisa mais aprofundada em outras bases de dados, procurando bibliografia que nos ajude a confirmar o resultado para depois se poder elaborar um relatório para o caso em estudo de acordo com as *guidelines* internacionais.

8.5. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

CNVs são uma das origens mais comuns de variação genética em humanos, contribuindo para um grande número de doenças com origem genética. O MLPA é uma técnica semi-quantitativa e específica que permite a detecção de CNVs em até 60 amostras de DNA humano em simultâneo num só tubo, sendo uma técnica que não necessita de grandes quantidades de DNA (50ng), barata e rápida para a detecção deste tipo de alterações^[19]. A aplicação mais comum da técnica de MLPA é a análise de CNVs em amostras de DNA genómico humano para avaliar a possibilidade de haver variação no número de cromossomas, detetar a perda ou ganho de regiões subcromossómicas e detetar deleções ou duplicações em regiões génicas sendo assim bastante útil para detetar mutações em genes causadores de doença como *BRCA1* e *BRCA2*, *DMD*, *MLH1* e *MSH2* e outros^[62].

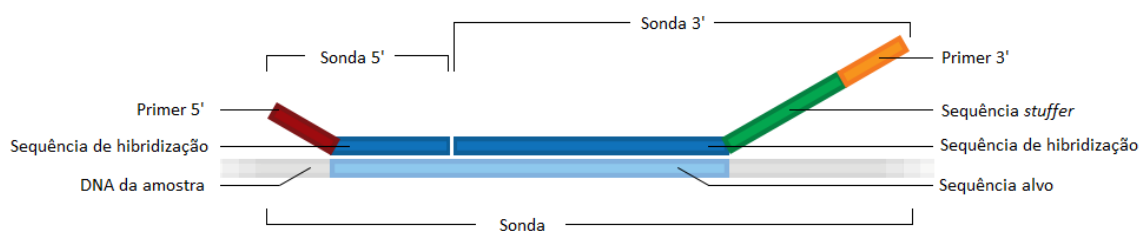


Figura 30- Representação esquemática de uma sonda de MLPA. Adaptado de MRC-Holland.

Como foi referido anteriormente, MLPA é uma técnica que pode analisar CNVs de até 60 regiões diferentes de DNA usando até 60 sondas específicas para a região de interesse. Cada sonda é constituída por duas meias-sondas, uma sonda 5' e uma sonda 3', estas sondas têm um *primer* universal marcado com um fluorocromo, que permite a reação simultânea de PCR nas várias amostras e a sua detecção após a eletroforese capilar, e a sequência que irá hibridizar com a sequência alvo. Adicionalmente, a meia-sonda 3' tem uma sequência *stuffer* que varia de tamanho entre as diferentes sondas, permitindo a diferenciação do produto de amplificação baseado no seu tamanho após a eletroforese (Figura 30). Para realizar a técnica de MLPA, primeiro o DNA é desnaturado e incubado com as sondas de MLPA num termorreciclador, as sondas de MLPA vão reconhecer as sequências específicas coincidentes na amostra de DNA e hibridizarão com essa sequência. Depois as meias sondas hibridizadas ligam-se uma à outra usando um *mix* de ligação que contém a enzima ligase, formando assim uma sonda completa. Após a reação de ligação, é feita a amplificação das sondas por PCR e seguidamente a separação destes produtos amplificados por eletroforese capilar (Figura 31)^[63].

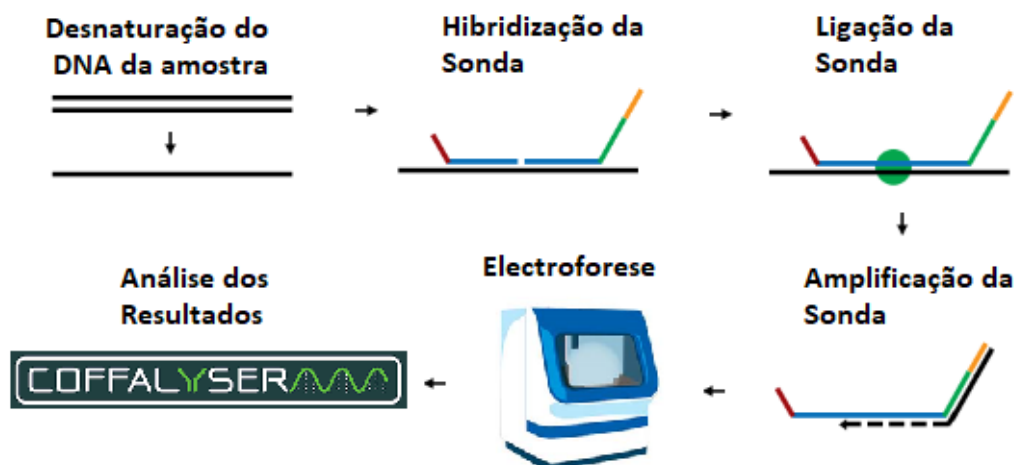


Figura 31- Representação esquemática do protocolo da técnica de MLPA. Adaptado de MRC-Holland.

A análise dos fragmentos gerados após a eletroforese capilar é feita no *software Coffalyser. Net™*. Antes de análise ser feita é necessário efetuar um controlo de qualidade verificando se os fragmentos de controlo MLPA presentes no kit de sondas MLPA estão nos parâmetros requeridos para permitir a validação os resultados do MLPA. Existem 4 tipos de fragmentos no kit de sondas de MLPA^[64]:

- **Fragmento de referência:** Um fragmento com o tamanho de 92 nucleótidos cujo seu tamanho é usado como referência pelos outros fragmentos de controlo de qualidade.
- **Fragmentos de quantidade (Q):** Fragmentos com diferentes tamanhos (64, 70, 76 e 82 nucleótidos) responsáveis por aferir se a quantidade de DNA adicionada foi suficiente e se a reação de ligação teve sucesso. O tamanho do sinal será elevado quando a quantidade de DNA é insuficiente ou a ligação falhou sendo considerado aceitável fragmentos que não excedem 33% da altura do fragmento de referência.
- **Fragmentos de desnaturação (D):** Fragmentos com diferentes tamanhos (88 e 96 nucleótidos) responsáveis por detetar sequências de ilhas CpG que são mais difíceis de desnaturar devido à grande quantidade de nucleótidos CG. Quando o tamanho destes fragmentos é menor que 50% do fragmento de referência é indicativo que a amostra de DNA foi desnaturada insuficientemente.
- **Fragmentos X e Y:** Fragmentos de diferentes tamanhos (100 e 105 nucleótidos) usados para impedir a confusão entre diferentes amostras.

Se os parâmetros de controlo estão dentro dos limites aceitáveis para a validação dos resultados, então pode-se proceder com a análise dos mesmos. Estes são analisados em comparação com a amostra de controlo, sendo também possível analisar a amostra

por comparação com os fragmentos de controlo. Os resultados são apresentados num gráfico com valores representativos do *ratio* entre o tamanho das amostras em teste e das amostras de referência. Um *ratio* de 0,7 a 1,3 é considerado um valor normal, ou seja, não existem CNVs nessa sequência e um *ratio* fora deste intervalo é indicativo da presença de CNVs nessa sequência sendo que um valor menor que 0,7 constitui uma perda de número de cópias e um valor superior a 1,3 constitui um ganho de número de cópias^[65].

8.5.1. Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

MS-MLPA é uma variante da técnica de MLPA que, para além de permitir a deteção de CNVs, possibilita também a deteção do estado de metilação de genes^[66], um processo biológico que regula a expressão génica inibindo a sua atividade sem alterar a sequência ao adicionar grupos metil à molécula de DNA^[67].

Alterações do estado de metilação do DNA estão associados com bastantes doenças como doenças de *imprinting* genómico, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e cancro^[68]. Assim a deteção do estado de metilação é de grande importância que no diagnóstico pré-natal, quer no diagnóstico pós-natal.

A técnica de MS-MLPA é idêntica à técnica de MLPA com a exceção das sondas utilizadas, que para além das sondas regulares para a deteção de CNVs, tem sondas específicas para sequências de DNA que contêm uma região de restrição para a enzima HhaI, e do passo de ligação das sondas que é separado em duas reações, uma reação é processada da mesma maneira da técnica de MLPA usando apenas a ligase, sendo esta reação usada para a deteção de CNVs e a outra reação utiliza-se a ligase e outra enzima denominada HhaI, uma endonuclease sensível à metilação que irá digerir a sequência alvo se essa sequência não estiver metilada, e esta não será amplificada. Este não será o caso se a sequência alvo estiver metilada, assim a HhaI não irá digerir a sequência e este será amplificada^[66]. Depois da amplificação e eletroforese capilar, os resultados são analisados no *software Coffalyser.net* e, por comparação com as amostras de referência, é determinado o estado de metilação e é verificada a presença de CNVs nas sequências em estudo ([Figura 32](#)).

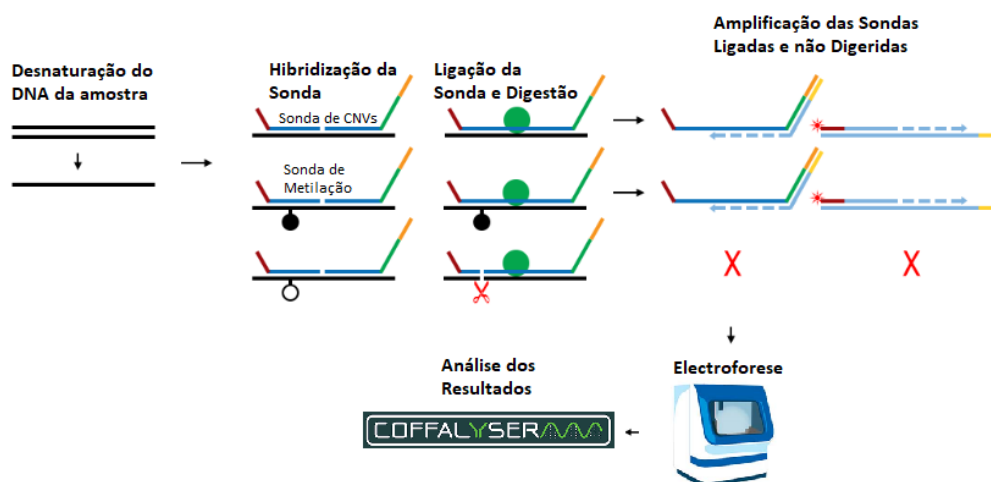


Figura 32- Representação esquemática do protocolo da técnica de MS-MLPA. Adaptado de MRC-Holland.

Capítulo IX- Fase Pós-Analítica

Um laboratório de testes clínicos tem de seguir os padrões de qualidade ISO15189 que classificam a fase pós-analítica como os processos posteriores à obtenção de resultados do teste e sua análise. Parte destes processos incluem a retenção e armazenamento das amostras clínicas não usadas nos testes, para acesso futuro se necessário, assim como o descarte das amostras utilizadas que já não terão uso. Outro aspeto importante nesta fase é a qualidade do relatório final que deve seguir as *guidelines* internacionais e deve incluir parâmetros como intervalos de referência, resultados relevantes, interpretações clínicas e outras notificações como as limitações dos testes utilizados. Para além desta informação referente aos resultados, é necessário ter informação necessária sobre o paciente permitindo a sua identificação, o hospital e clínico que referenciou este teste, as indicações clínicas e outros dados como o número de processo do caso, data de chegada, análise, identificação do laboratório e dos técnicos responsáveis pelo teste efetuado. Este pode-se considerar um passo tão importante como a análise dos resultados uma vez que contém a informação necessária para suportar o clínico e o paciente numa decisão em como proceder com o caso em questão de forma em obter um prognóstico mais favorável possível para o paciente^{[69][70]}. O relatório dos resultados deve estar o mais estandardizado possível, ser informativo, breve e claro para uma pessoa não especializada, de forma que este seja perceptível para o paciente e o clínico responsável^[71].

Outro aspeto importante da fase pós-analítica é o tempo de resposta que deve ser o mais curto possível e deve ter em conta o teste requerido, tecido usado e o nível de urgência (Tabela 2) (Tabela 3)^[71].

Tabela 2- Tempo de resposta máximo recomendado baseado no tempo de cultura de determinada amostra biológica. Adaptado de Hastings, R., Howell, R., Bricarelli, F. D., Kristoffersson, U., & Cavani, S. (2012). *General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics*. 29, 7–25.

Tipo de amostra biológica	Tempo de resposta
Cultura de líquido amniótico e vilosidades coriônicas	17 dias
Cultura de linfócitos	28 dias
Cultura de medula óssea e tumores sólidos	21 dias
Cultura de tecidos sólidos	28 dias
Cultura de curta duração de vilosidades coriônicas	7 dias
Cultura urgente de linfócitos e sangue do cordão umbilical	7 dias
Cultura urgente de medula óssea	7 dias

Tabela 3- Tempo de resposta máximo recomendado baseado no tipo de teste requerido. Adaptado de Hastings, R., Howell, R., Bricarelli, F. D., Kristoffersson, U., & Cavani, S. (2012). *General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics*. 29, 7–25

Tipo de teste	Tempo de resposta
Despiste pré-natal de aneuploidias por FISH/QF-PCR	4 dias
aCGH pré-natal	17 dias
aCGH pós-natal do probando (sem <i>follow-up</i>)	60 dias
aCGH pós-natal do probando e progenitores	90 dias
aCGH dos progenitores após o resultado aCGH do probando	60 dias

A taxa de sucesso dos testes realizados num laboratório certificado é um fator importante para a garantia da qualidade e estes têm valores mínimos que devem ser cumpridos ([Tabela 4](#)). No entanto a taxa de sucesso depende de vários fatores internos e externos ao laboratório como a qualidade da amostra quando é recebida e o processamento da mesma dentro do laboratório. Devido a problemas fora do laboratório em que este não tem controlo, a taxa de sucesso pode diminuir significativamente e por essa razão o laboratório deve usar para avaliar a sua taxa de sucesso apenas as amostras que chegam ao laboratório com uma qualidade adequada. No entanto o laboratório deve identificar ambos fatores internos e externos que possam afetar negativamente a taxa de sucesso para que uma ação corretiva possa ser tomada.

Tabela 4- Taxa de sucesso mínima baseado no tipo de amostra biológica. Adaptado de Hastings, R., Howell, R., Bricarelli, F. D., Kristoffersson, U., & Cavani, S. (2012). *General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics*. 29, 7–25

Tipo de amostra biológica	Taxa de sucesso mínima
Culturas vilosidades coriônicas e de líquido amniótico	98%
Vilosidades coriônicas sem cultura	90%
Sangue periférico pós-natal	98%
Sangue fetal	98%
Amostras de hematologia	95%
Tumores sólidos	n/a
Produtos de concepção/Partes fetais/Biópsias da pele	60%

Capítulo X- Análise de Casos Clínicos

Durante o estágio, tive a oportunidade de acompanhar casos clínicos nas áreas da citogenética convencional, citogenética molecular e genética molecular, assim como efetuar as técnicas laboratoriais necessárias para a elaboração dos mesmos, com isto obtive conhecimento sobre o procedimento laboratorial desde que a amostra chega ao laboratório até à obtenção de resultados, para além disso, também tive a oportunidade de acompanhar e efetuar análises de resultados e interpretá-los de forma a que conseguisse elaborar um relatório do caso que esteja de acordo com as *guidelines* seguidas no laboratório. Neste capítulo vão ser analisados alguns desses casos clínicos.

10.1. Caso Clínico 1

Feto com 13 semanas e 4 dias. Rastreamento bioquímico 1:120; Rastreamento ecográfico revelou translucência nucal de 2,70

Foram requeridos, para este caso, o estudo do cariótipo e o despiste rápido das aneuploidias mais comuns. O despiste rápido das aneuploidias mais comuns revelou um resultado $\text{rsa}(X,13,18,21) \times 2$ o que constitui um feto do sexo feminino sem nenhuma aneuploidia nos cromossomas 13, 18, 21, X e Y. A análise de 6 metafases com bandas GTL obtidas a partir de cultura de células de vilosidades coriônicas revelou um cariótipo mosáico com 2 linhas celulares diferentes, uma linha celular de constituição cromossômica feminina patológica com trissomia do cromossoma 15 detetada em 2 metafases ([Figura 33](#)) e uma linha celular de constituição cromossômica feminina sem nenhuma anomalia cromossômica detetável em 4 metafases ([Figura 34](#)). Trissomia 15 em mosaico tem um fenótipo patológico caracterizado principalmente pela restrição do crescimento intrauterino, anomalias cardíacas congênitas e dimorfismo craniofacial.

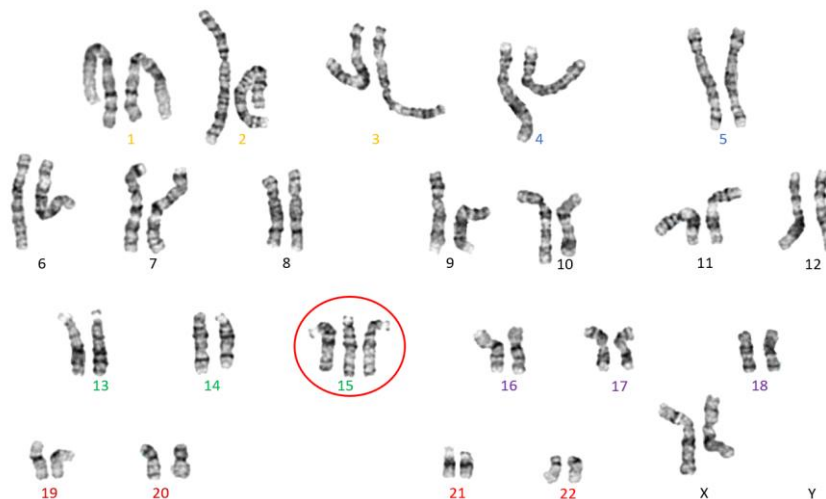


Figura 33- Cariograma representativo da linha celular 47,XX,+15 onde existe um cromossoma 15 supranumerário. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.



Figura 34- Cariograma representativo da linha celular 46,XX onde não se encontram alterações cromossômicas. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

O resultado tem a possibilidade de ser um caso de mosaïcismo confinado à placenta, por isso foi posteriormente realizada uma amniocentese para a colheita de amniócitos do feto e análise ao seu cariótipo para verificar se o mosaïcismo está presente em células fetais. A análise de todas as metafases observadas com bandas GTL obtidas a partir de cultura de células de líquido amniótico revelou um cariótipo 46,XX, de constituição cromossômica feminina sem nenhuma anomalia cromossômica detetável ([Figura 35](#)). Este resultado não exclui por completo a possível presença de trissomia do cromossoma 15 em mosaico de baixa expressão como foi detetado no resultado anterior, pode também tratar-se de uma situação de mosaïcismo confinado à placenta. É possível a presença de heterodissomia uniparental no cromossoma 15 devido a *trisomy rescue* nas metafases cujo cariótipo é aparentemente normal. O que pode constituir uma síndrome de Prader-Willi se a heterodissomia uniparental for de origem materna, se a heterodissomia uniparental for de origem paterna pode ocorrer a síndrome de Angelman. É recomendado fazer a pesquisa de presença de dissomia uniparental através da análise e comparação entre os marcadores de microssatélite do feto, e ambos os progenitores.

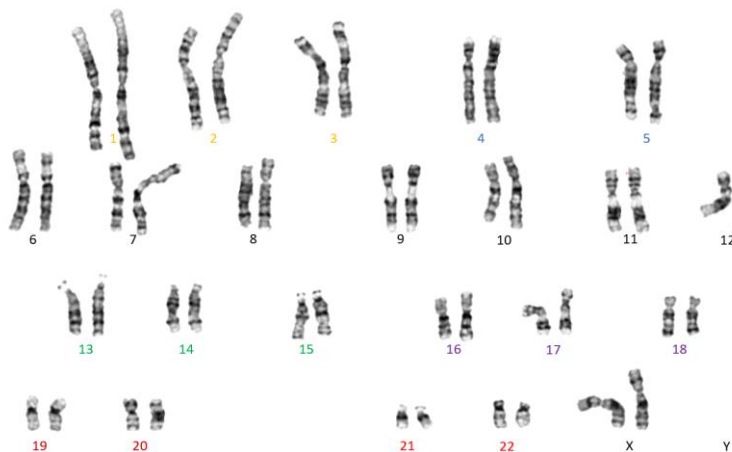


Figura 35- Cariograma de complemento cromossômico 46,XX onde não se encontram alterações cromossômicas. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Este resultado deve ser discutido numa consulta de aconselhamento genético.

10.2. Caso Clínico 2

Progenitora com rearranjo cromossômico: 46,XX,t(10;19)(p13;p13.3)mat e filho anterior com resultado de array: arr[hg19]10p15.3p13(136361_13107401)x3,14q23.1(61112261_61112795)x1

Foi requerido o estudo do cariótipo. A análise cromossômica de todas as metafases com bandas GTL, obtidas a partir da cultura celular de células de vilosidades coriônicas, revelou um cariótipo 46,XX,der(19)t(10;19)(p13;p13.3)dmata de constituição cromossômica feminina com um derivativo do cromossoma 19 resultante de uma translocação equilibrada materna, com pontos de quebra em 10p13 e 19p13.3 herdada de forma desequilibrada devido a uma segregação adjacente ([Figura 36](#)). Este resultado representa uma monossomia parcial do cromossoma 19 e uma trissomia parcial do cromossoma 10 que têm um fenótipo provavelmente patológico caracterizado principalmente por dismorfismos faciais, anomalias osteoarticulares, atraso de desenvolvimento e déficit intelectual moderado a severo.

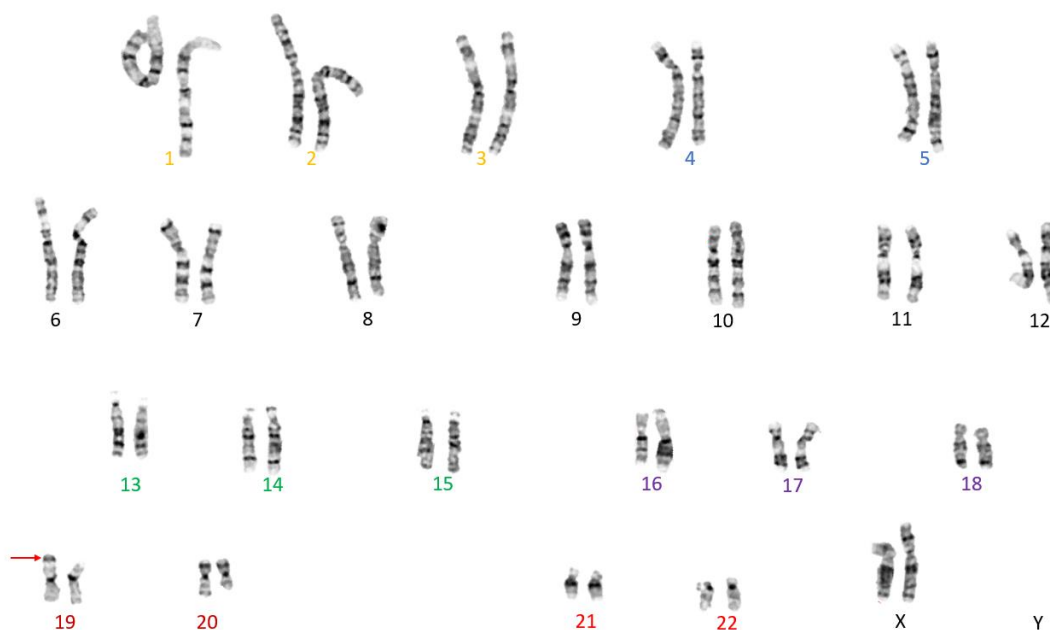


Figura 36- Cariograma de complemento cromossômico 46,XX,der(19)t(10;19)(p13;p13.3)dmata. Pode-se observar uma translocação desequilibrada entre o braço curto do cromossoma 10 e o braço curto do cromossoma 19 resultando num derivativo do cromossoma 19. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

O resultado deve ser discutido numa consulta de aconselhamento genético de modo a discutir opções disponíveis para esta gravidez. Testes de diagnóstico pré-natal serão oferecidos nas próximas gestações.

10.3. Caso Clínico 3

Idade materna avançada

O despiste rápido das aneuploidias mais comuns revelou um resultado $\text{rsa}(X,Y)\times 1,(13,18,21)\times 2$ o que constitui um feto do sexo masculino sem nenhuma aneuploidia nos cromossomas 13, 18, 21, X e Y. A análise cromossômica de todas as metafases com bandas GTL, obtidas a partir da cultura celular de células do líquido amniótico revelou um cariótipo $46,XY,t(1;18)(q32.1;q21.2)$ de constituição cromossômica masculina onde existe uma translocação entre o cromossoma 1 e o cromossoma 18 onde os pontos de quebra se situam em $1q32.1$ e $18q21.2$ (Figura 37). Trata-se de um rearranjo aparentemente equilibrado, logo não é expectável ter um impacto no fenótipo. Para averiguar se o rearranjo é herdado dos progenitores, o que poderá causar problemas numa futura gravidez, ou *de novo*, estudos familiares analisando o cariótipo dos mesmos com amostras de sangue periférico devem ser efetuados.

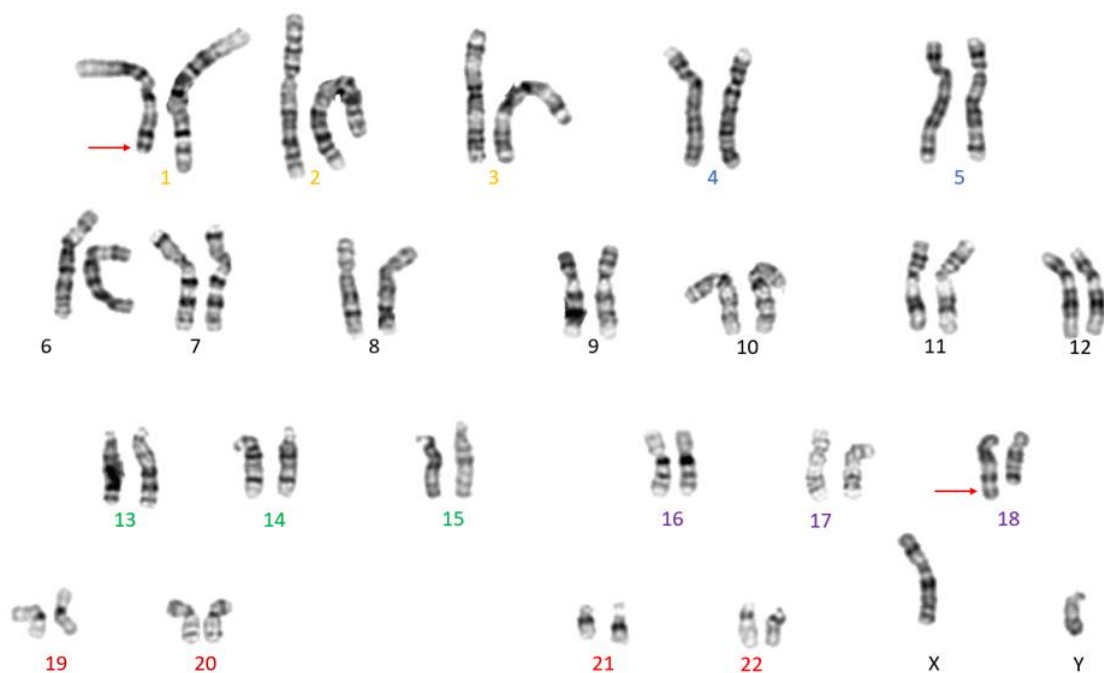


Figura 37- Cariograma de complemento cromossômico $46,XY,t(1;18)(q32.1;q21.2)$. Pode-se observar uma translocação entre a região terminal do braço longo do cromossoma 1 e a região terminal do braço curto do cromossoma 18. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

O resultado deve ser discutido numa consulta de aconselhamento genético.

10.4. Caso Clínico 4

Foi requisitado um teste de diagnóstico de array-CGH de 180K sondas para o estudo genético de uma criança que foi diagnosticada com autismo de modo a descobrir a causa genética do fenótipo do paciente.

O estudo genético por array-CGH 180K revelou um resultado: arr[GRCh37] 10q11.22q11.23(46964973_51826226)x1. A análise deste resultado revelou uma deleção em heterozigotia (log *ratio* de -0,89) no braço longo do cromossoma 10, uma deleção de 4861 Kb, abrangendo 145 sondas, que tem início na posição 46,964,973 e fim em 51,820,226 que se localiza em 10q11.22q11.23 ([Figura 38](#)).

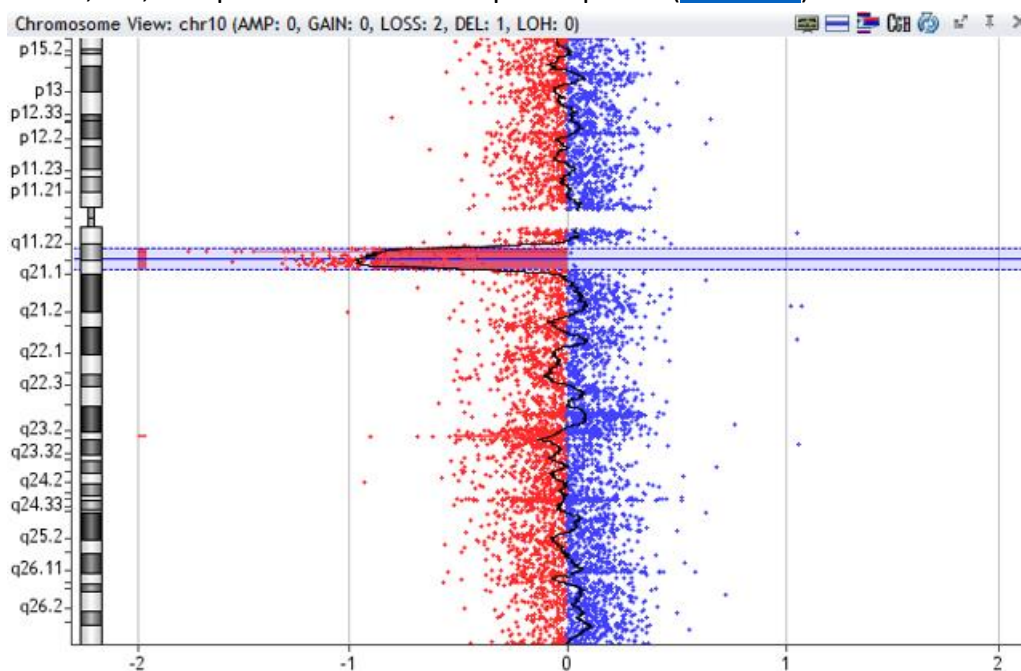


Figura 38- Resultado do aCGH do cromossoma 10 (arr[GRCh37] 10q11.22q11.23(46964973_51826226)x1) com um log *ratio* de -0,89 indicativo de uma deleção em heterozigotia. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Esta deleção envolve a perda de 22 genes ([Figura 39](#)), sendo que 7 deles estão reportados no *OMIM Morbid Map* (*RBP3*, *GDF2*, *ERCC6*, *CHAT*, *SLC18A3*, *OGDHL*, *MSMB*). Esta deleção é intersticial e assim tem dois pontos de quebra, o primeiro é situado no exão do gene *SYT15* e o segundo é situado no exão do gene não codificante *FLJ31813*. Na base de dados *Decipher* e *ClinGen* estão reportados casos com deleções que são sobreponíveis à deleção deste caso e que reportam fenótipos como autismo, défice intelectual, atraso do desenvolvimento e problemas respiratórios.

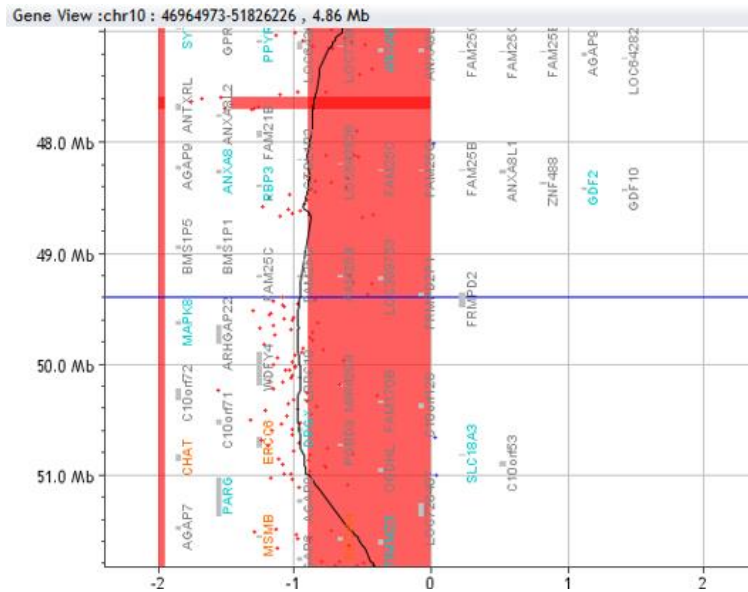


Figura 39- Genes abrangidos pela deleção arr[GRCh37] 10q11.22q11.23(46964973_51826226)x1. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

De modo a averiguar se a alteração é herdada dos progenitores ou *de novo* foi realizado um array-CGH 180k em ambos os progenitores. A análise dos resultados do array-CGH 180k feito conclui que existe uma deleção em heterozigotia no braço longo do cromossoma 10, mais especificamente, uma deleção em 10q11.22q11.23 no pai (Figura 40), o que indica que esta alteração genética foi herdada do pai.

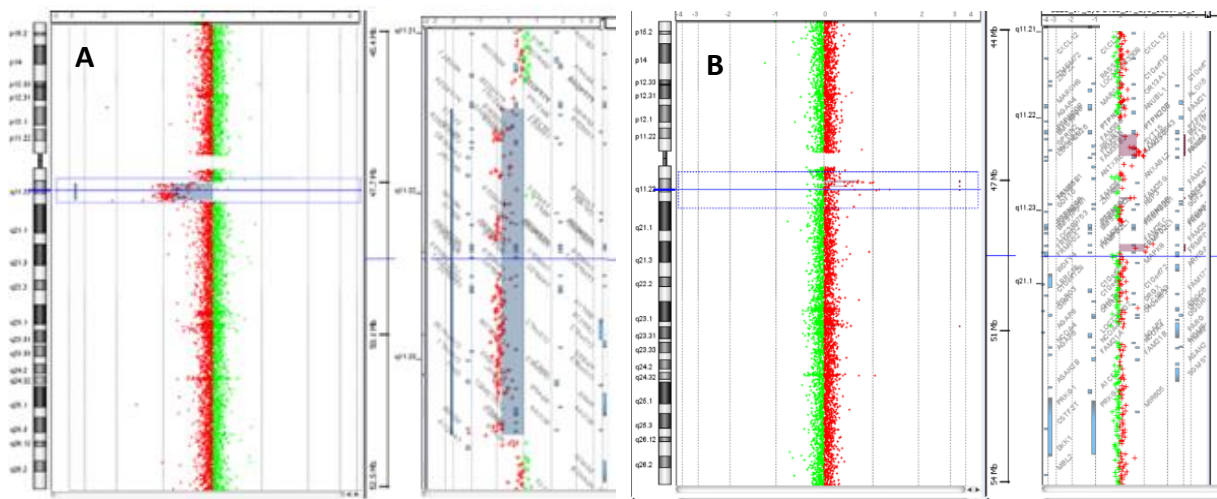


Figura 40- Resultado do aCGH dos progenitores revelando que existe (A) uma deleção em heterozigotia no cromossoma 10 do pai com a localização 10q11.22q11.23 e que (B) a mãe não apresenta alterações do número de cópias patológicas. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Esta deleção é provavelmente patogénica, estando associada a um fenótipo de autismo, défice intelectual, estenose pulmonar e atraso do desenvolvimento. Devem ser efetuados testes genéticos familiares para averiguar a presença desta alteração nos restantes familiares próximos. Este resultado deve ser discutido numa consulta de aconselhamento genético.

10.5. Caso Clínico 5

Foi realizado um estudo de array-CGH de 180K sondas para detecção de possíveis alterações genéticas que correlacionem com o fenótipo de malformações do sistema nervoso central nomeadamente diâmetro do cerebelo no percentil 5 e hipoplasia do corpo caloso detetado no feto.

O estudo genético por array-CGH 180K revelou um resultado: arr[37GRCh] 10q26.2q26.3(129268804_135403668)x3,18q21.2q23(48424104_78012829)x1. A análise deste resultado revelou uma duplicação em heterozigotia (*log ratio*: 0,656) no braço longo do cromossoma 10, uma duplicação de 6135Kb, abrangendo 294 sondas, que tem início na posição 129,268,804 e fim na posição 135,403,668 que se localiza em 10q26.2q26.3 (Figura 41).

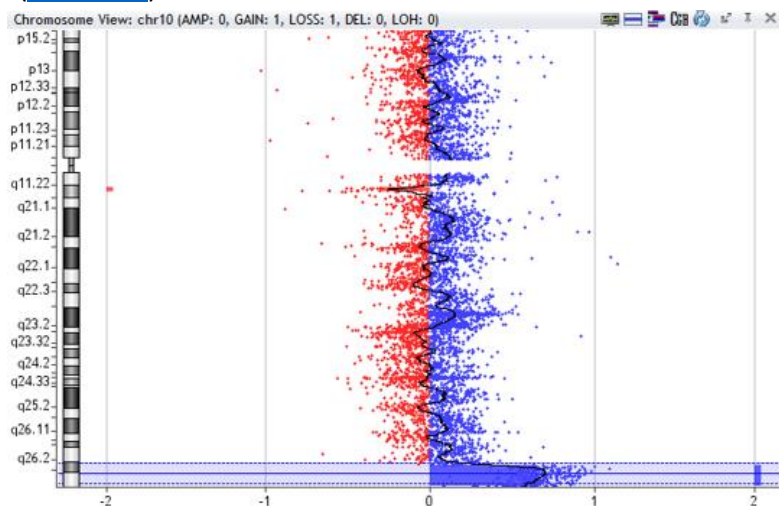


Figura 41- Resultado do aCGH do cromossoma 10 (arr[37GRCh] 10q26.2q26.3(129268804_135403668)x3) com um log ratio de 0,656 indicativo de uma duplicação em heterozigotia. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Esta duplicação envolve o ganho de 29 genes (Figura 42), sendo que 5 destes estão reportados no *OMIM Morbid Map*, (*EBF3*, *NKX6*, *TUBGCP2*, *ECHS1*, *SYCE1*). Esta duplicação tem um ponto de quebra, porém não é intragénico. Na base de dados *Decipher* e *ClinGen* estão reportados casos com duplicações sobreponíveis à duplicação do cromossoma 10 deste caso que reportam fenótipos como atraso global do desenvolvimento, ataxia, défice intelectual e hipoplasia do vermis cerebelar.

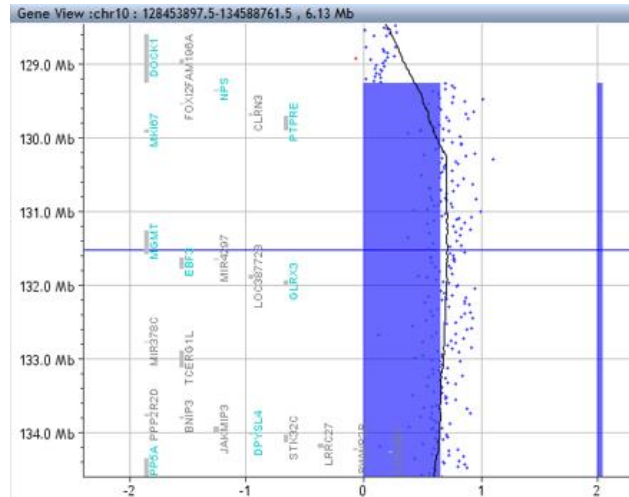


Figura 42- Genes abrangidos pela duplicação arr[37GRCh] 10q26.2q26.3(129268804_135403668)x3. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

A análise de array-CGH 180K revelou também uma deleção em heterozigotia (log ratio: -0,848) no braço longo do cromossoma 18, uma deleção de 29189Kb, abrangendo 1431 sondas, que tem início na posição 48,824,104 e fim em 78,012,829 que se localiza em 18q21.2q23 ([Figura 43](#)).

Esta deleção envolve a perda de 81 genes ([Figura 44](#)), sendo que 23 deles estão no *OMIM Morbid Map* (*DCC*, *TCFU*, *FECH*, *NARS1*, *ATP8B1*, *NEDD4L*, *MALT1*, *RAX*, *LMAN1*, *CCBE1*, *MC4R*, *PIGN*, *TNFRSF11A*, *BCC2*, *KDSR*, *SERPINB7*, *SERPINB8*, *RTTN*, *CYB5A*, *ZNF407*, *TSHZ1*, *CTDP1*, *TXNL4A*).

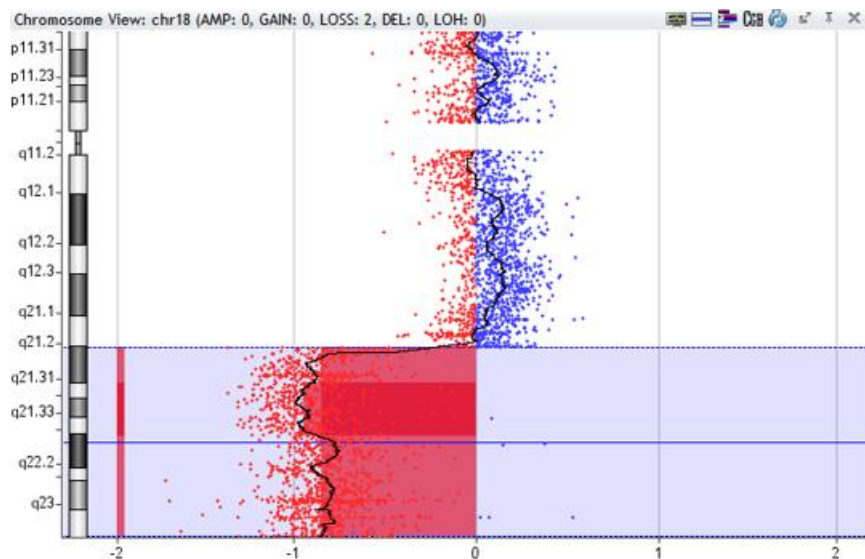


Figura 43- Resultado do aCGH do cromossoma 18 (arr[37GRCh] 18q21.2q23(48,824,104_78,012,829)x1) com um log ratio de -0,848 indicativo de uma deleção em heterozigotia. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Esta deleção é terminal com um ponto de quebra numa região não intragénica. Nas bases de dados *Decipher* e *ClinGen* estão reportados casos com deleções que são sobreponíveis à deleção deste caso e que reportam fenótipos como défice intelectual,

morfologia anormal do corpo caloso, dismorfismos faciais, polimicrogria, atraso do desenvolvimento pré-natal e hipotonia.

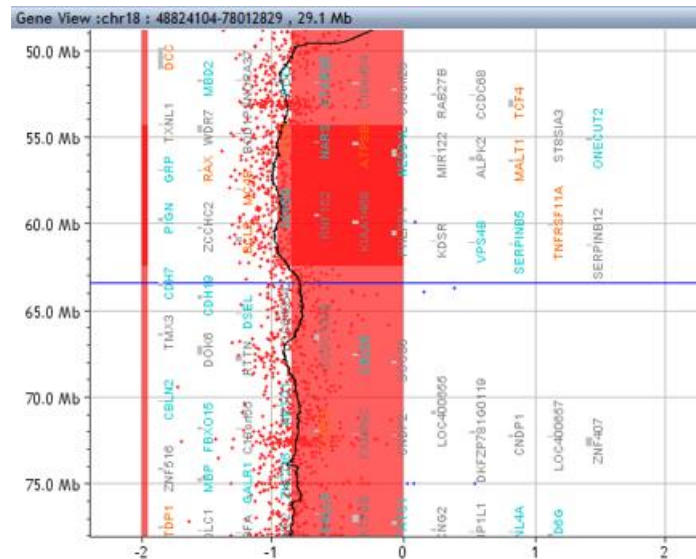


Figura 44- Genes abrangidos pela deleção arr[37GRCh] 18q21.2q23(48,824,104_78,012,829)x1. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Este é um caso de uma trissomia parcial do cromossoma 10 e uma monossomia parcial do cromossoma 18, estas alterações são indicativas de um dos progenitores possuir uma alteração cromossômica estrutural equilibrada entre estes dois cromossomas, nomeadamente uma translocação recíproca, que foi transmitida ao feto de forma desequilibrada criando um desequilíbrio genético. Deste modo foram feitos os cariótipos do feto, mãe e pai para confirmar esta hipótese (Figura 45). Os cariótipos tiveram um resultado de 46,XX no caso da mãe, 46,XY,t(10,18)(q26.1;q21.1) no caso do pai isto constitui uma translocação recíproca do braço longo do cromossoma 10 e o braço longo do cromossoma 18 e 46,XY,der(18)(t10;18)(q26.1;q21.1)dp no caso do feto o que constitui uma translocação desequilibrada do braço longo do cromossoma 10 e o braço longo do cromossoma 18. O resultado do pai permite confirmar que a alteração genética do feto foi herdada do pai de forma desequilibrada devido a um fenómeno de segregação adjacente I.

Devem ser feitos testes familiares de modo a averiguar se existem outros familiares que possuam o rearranjo cromossômico do pai do feto. Este resultado deve ser discutido numa consulta de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal será oferecido em futuras gestações.

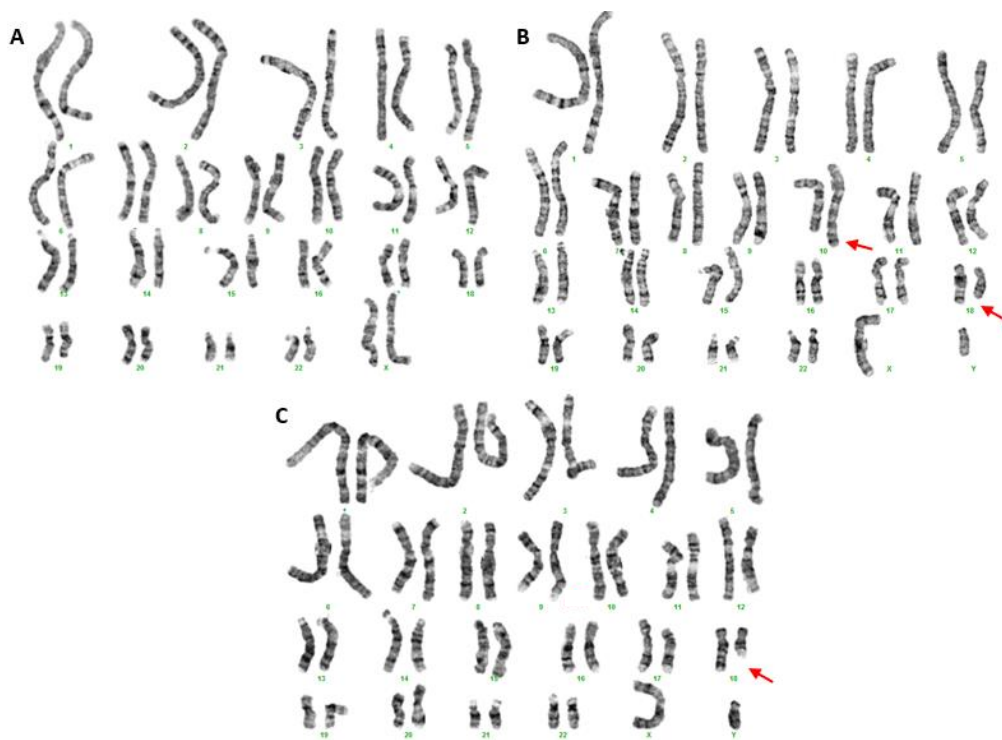


Figura 45- Resultados dos cariótipos efetuados nos progenitores e feto. (A) Cariótipo da mãe 46,XX sem alterações cromossômicas detetáveis. (B) Cariótipo do pai 46,XY,t(10,18)(q26.1,q21.1) o que constitui uma translocação recíproca do braço longo do cromossoma 10 e o braço longo do cromossoma 18. (C) Cariótipo do feto 46,XY,der(18)(t10;18)(q26.1;q21.1)dpat o que constitui uma translocação desequilibrada do braço longo do cromossoma 10 e do braço longo do cromossoma 18 herdada de forma desequilibrada do pai. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

10.6. Caso Clínico 6

Foi realizado um estudo de array-CGH de 180K sondas para detecção de possíveis alterações genéticas que correlacionem com o fenótipo de restrição do crescimento fetal e perímetro abdominal inferior ao percentil 3.

O estudo genético por array-CGH 180K revelou um resultado arr[37GRCh] 14q32.2q32.31(100,397,006_101,488,936)x1. A análise deste resultado revelou uma deleção em heterozigotia (log *ratio*: -0,763) no braço longo do cromossoma 14, uma deleção de 1092Kb, abrangendo 184 sondas, que tem início na posição 100,397,006 e fim na posição 101,488,936 que se localiza em 14q32.2q32.31 ([Figura 46](#)).

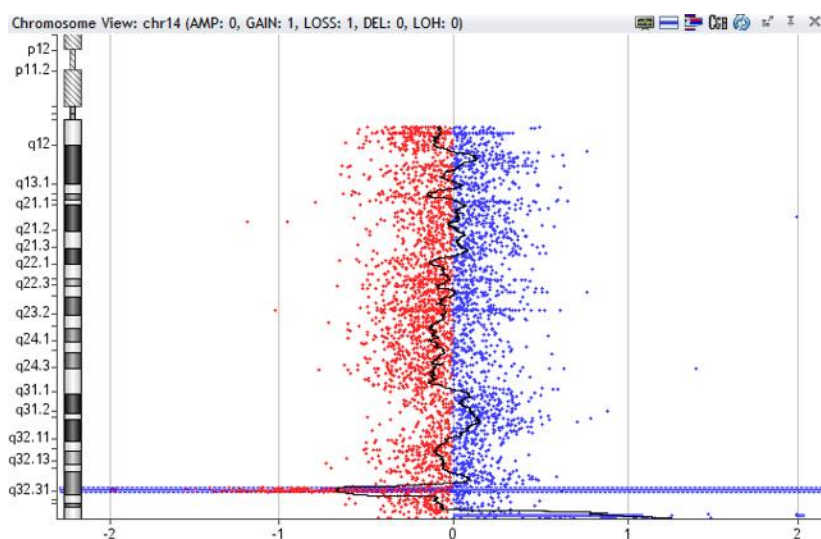


Figura 46- Resultado do aCGH do cromossoma 14 (arr[37GRCh] 14q32.2q32.31(100,397,006_101,488,936)x1) com um log ratio de -0,763 indicativo de uma deleção em heterozigotia. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Esta deleção envolve a perda de 22 genes ([Figura 47](#)) sendo que 3 deles estão no *OMIM Morbid Map* (*EML1*, *YY1*, *WARS1*). Esta deleção é intersticial com um ponto de quebra intragénico no exão 18 do gene *EML1* e outro ponto de quebra numa região intergénica. Nas bases de dados *Decipher* e *ClinGen* estão reportados casos com deleções que são sobreponíveis à deleção deste caso e que reportam fenótipos como anomalias faciais, restrição do crescimento pré e pós-natal e anomalias cardíacas.

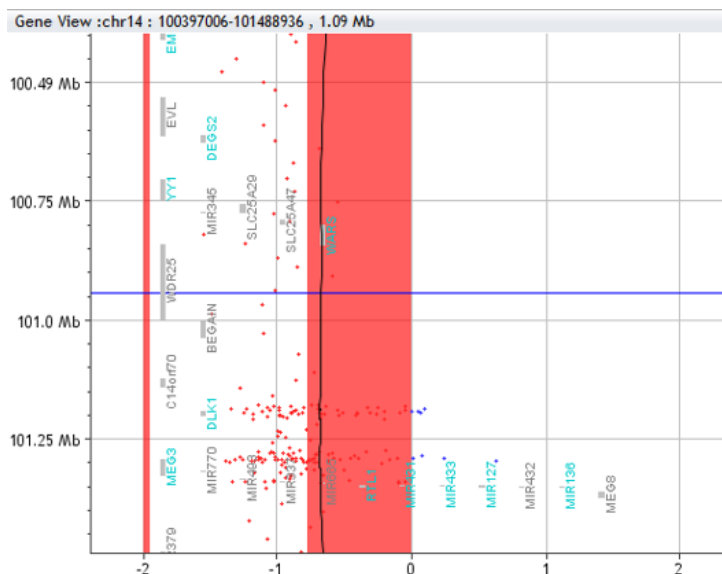


Figura 47- Genes abrangidos pela deleção arr[37GRCh] 14q32.2q32.31(100,397,006_101,488,936)x1. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

O cromossoma 14 tem regiões com genes sujeitos a *imprinting* genômico e a deleção detetada por array-CGH 180K abrange uma dessas regiões, a região 14q32. Perdas genéticas estão associadas à síndrome de Temple, se estas ocorrerem no alelo paterno, e à síndrome de Kagami-Ogata, se estas ocorrerem no alelo materno, assim é necessário averiguar em que cromossoma ocorreu a alteração genética, o que pode ser feito pela técnica de MS-MLPA.

É efetuada também uma confirmação da deleção genética pela técnica de MLPA (Figura 48) com o painel de sondas ME032 UPD7-UPD14 e os progenitores são também testados para averiguar se a alteração no feto é *de novo* e após a análise do resultado dos pais, não se encontra qualquer alteração (Figura 49), confirmando que a alteração encontrada no feto é *de novo*.

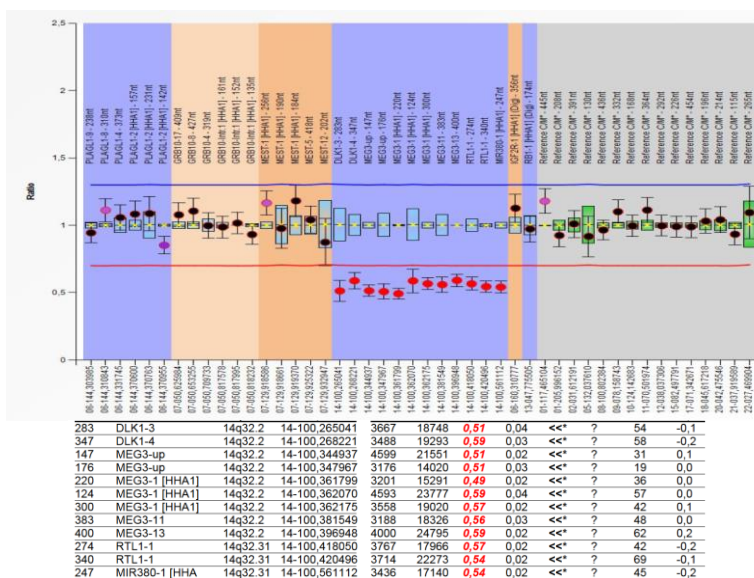


Figura 48- Confirmação da deleção detetada no feto por MLPA (rsa 14q32.2(DLK1,MEG3,RTL1,MIR380)x1). Este resultado confirma a deleção na região do cromossoma 14 em heterozigotia (ratios < 0,7). Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

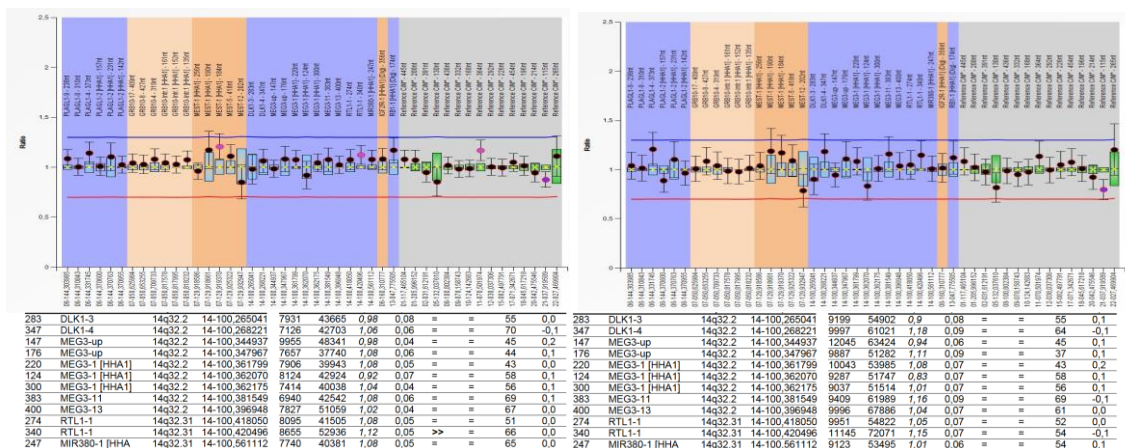


Figura 49- Análise de MLPA aos progenitores concluindo que não existe nenhuma alteração de número de cópia na região testada. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

O estudo da metilação por MS-MLPA permitiu concluir que a deleção ocorreu no alelo paterno, assim esta deleção está associada à síndrome de Temple. Isto é possível concluir uma vez que o gene *MEG3* é de expressão materna e num caso normal devia ter uma metilação de 50% uma vez que está metilado no cromossoma paterno, porém não houve metilação neste caso uma vez que, no teste de MS-MLPA é utilizada uma enzima sensível a metilação que cliva a sonda quando não existe metilação e assim esta não é detetada, como não houve deteção da sonda (Figura 50), significa que não houve metilação do gene *MEG3*, isto significa que o alelo paterno não está presente e assim conclui-se que a deleção ocorreu neste.

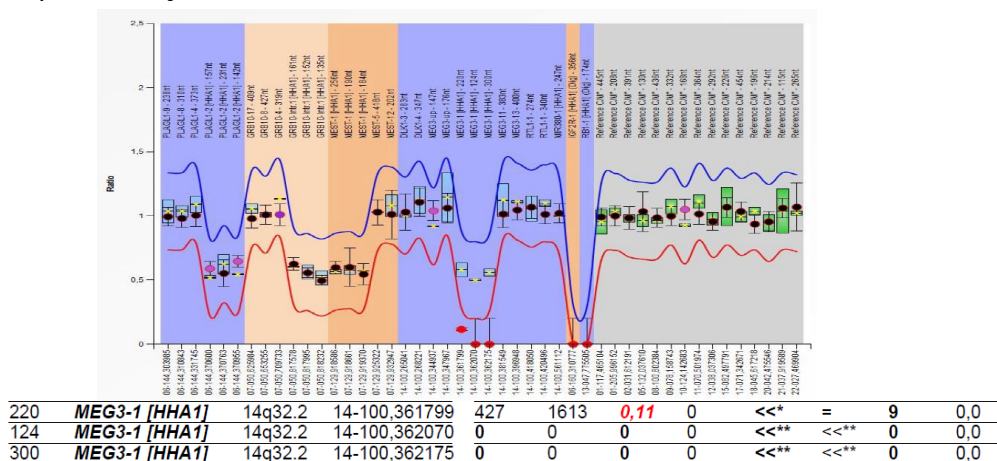


Figura 50- Análise de MS-MLPA do feto onde a sonda direcionada para o gene *MEG3* não foi detetada concluindo que a deleção é ocorreu no alelo paterno. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Este feto do sexo masculino possui uma deleção patogénica associada à síndrome de Temple, uma síndrome caracterizada por restrição do crescimento uterino no estágio pré-natal e por hipotonia, atraso nas atividades motoras, problemas de ingestão de alimentos, puberdade precoce, estatura menor que o normal, mãos e pés pequenos e anomalias faciais. Este resultado deve ser discutido numa consulta de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal será oferecido em futuras gestações devido a um risco de recorrência acrescido para a síndrome de Temple.

10.7. Caso Clínico 7

Grávida de uma gravidez gemelar com dois fetos do sexo feminino, no feto 1 foi detetado higroma e cardiopatia e no feto 2 não foram detetadas anomalias. Pai tem dois irmãos com síndrome do X-Frágil.

Foi feita uma análise ao número de tripletos CGG no gene *FMR1* do pai por PCR convencional, de modo a averiguar se o pai possui um número acima do normal de tripletos CGG no gene *FMR1*, uma vez que possui dois irmãos com síndrome do X-Frágil, que poderá ser patogénico para os fetos. O resultado desta análise foi de 101 tripletos CGG (Figura 51), este número de tripletos é acima do limite considerado normal e constitui uma pré-mutação (55 a 200 tripletos CGG), apesar de não constituir uma mutação completa, certos indivíduos com um número elevado de repetições do triplete (>100) foram caracterizados com sintomas relacionados com síndrome de X-Frágil como dificuldades de aprendizagem, problemas emocionais e défice intelectual.

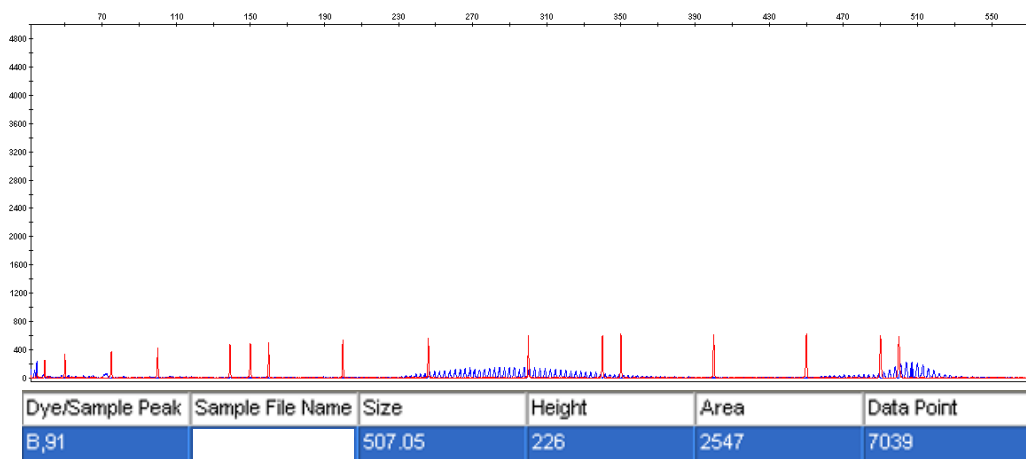


Figura 51- Eletróferograma do PCR para a deteção do número de tripletos CGG no gene *FMR1* do pai. Observa-se que o pai é portador de um alelo com pré-mutação com 101 tripletos ($507-221=284$; $284/3=94,667$; $94,667+6=100,667$). Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Indivíduos do sexo masculino com uma pré-mutação têm risco de tremores e ataxias relacionadas com a síndrome de X-Frágil (FXTAS) em idades mais avançadas. FXTAS é uma doença cuja penetrância aumenta com o número de repetições de tripletos CGG, com a idade e se o indivíduo afetado for do sexo masculino, tem desenvolvimento progressivo de ataxias e tremores e é frequentemente acompanhada por dificuldades cognitivas e comportamentais (perda de memória, ansiedade e demência) progressivas. Indivíduos do sexo feminino com uma pré-mutação têm risco de cerca de 20% de terem insuficiência ovárica prematura relacionada à síndrome do X-Frágil (FXPOI).

A transmissão da permutação é feita de forma dominante, assim toda a descendência do sexo feminino deste indivíduo terá a pré-mutação que está associada a FXTAS e FXPOI, porém existem casos em que, a partir de transmissão paterna, o número de tripletos transmitidos à descendência é reduzido, podendo regredir para um número de tripletos normal.

Para confirmação do resultado anterior fez-se uma análise número de tripletos CGG no gene *FMR1* por TP-PCR, o que revelou um resultado de 111 tripletos CGG (Figura 52), o que constitui uma pré-mutação que poderá ser passada para a descendência.

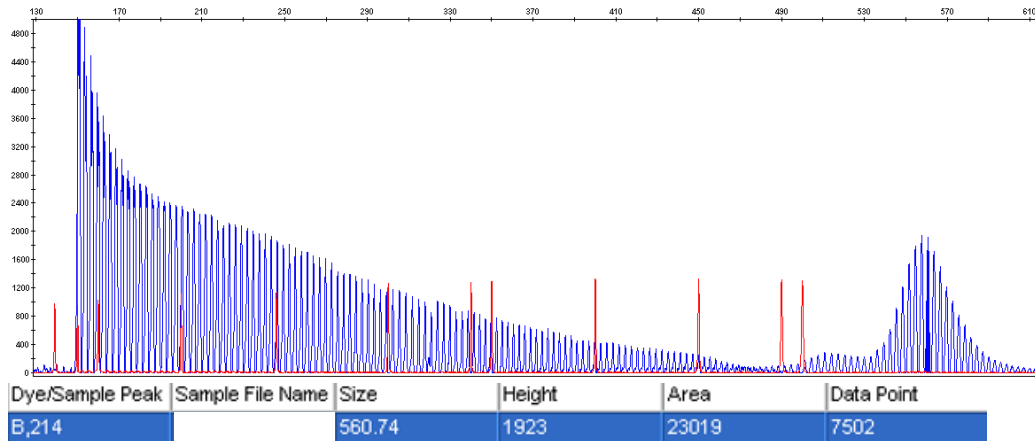
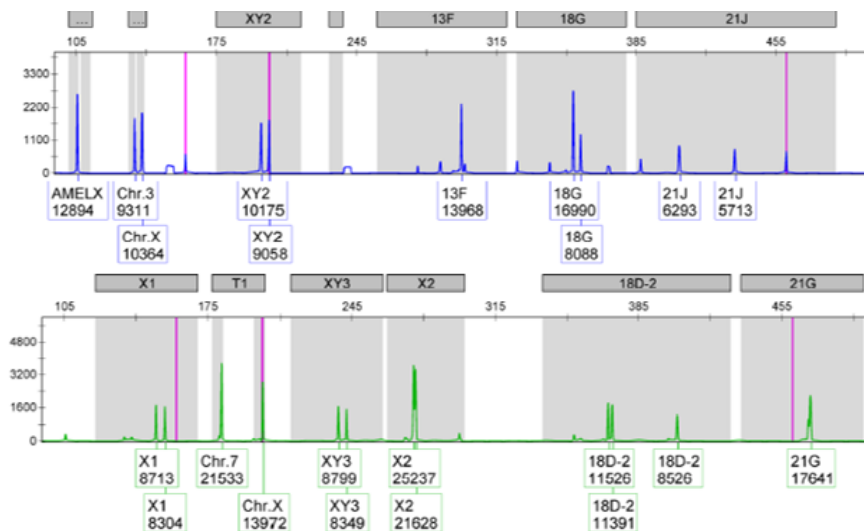


Figura 52- Eletroferograma do TP-PCR para a detecção do número de tripletos CGG no gene *FMR1* do pai. Observa-se que o pai é portador de um alelo com pré-mutação com 111 tripletos CGG (560-228=332; 332/3=110,667). Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Foi feito o estudo rápido das aneuploidias comuns por QF-PCR através de biópsia de vilosidades coriônicas a ambos os fetos, devido às indicações clínicas presentes no feto 1. O resultado do feto 1 foi, feto do sexo feminino com trissomia do cromossoma 18 (Figura 53) e o resultado do feto 2 foi, feto do sexo feminino sem anomalias cromossômicas (Figura 54) detetadas pelo teste efetuado.



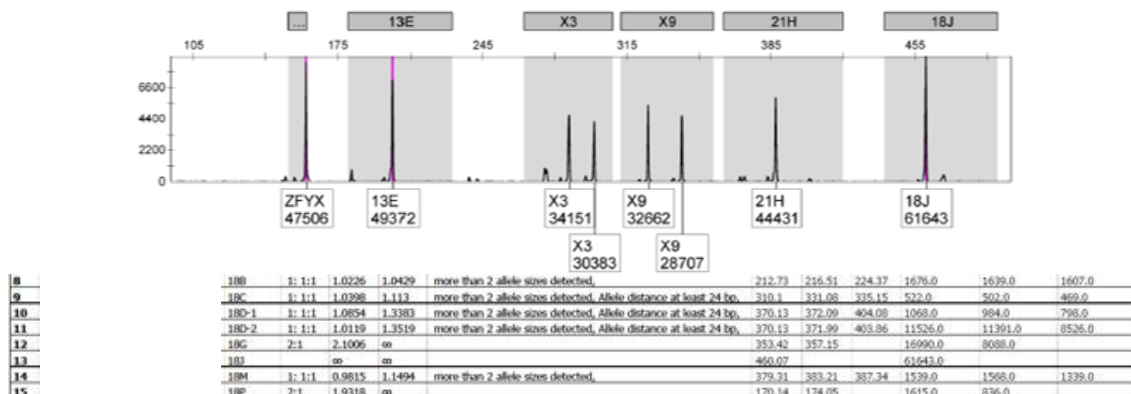


Figura 53- Eletroferograma do QF-PCR para o despiste das aneuploidias mais comuns no feto 1 com um resultado rsa,(18)x3,(13,21,X)x2 indicativo de trissomia do cromossoma 18. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

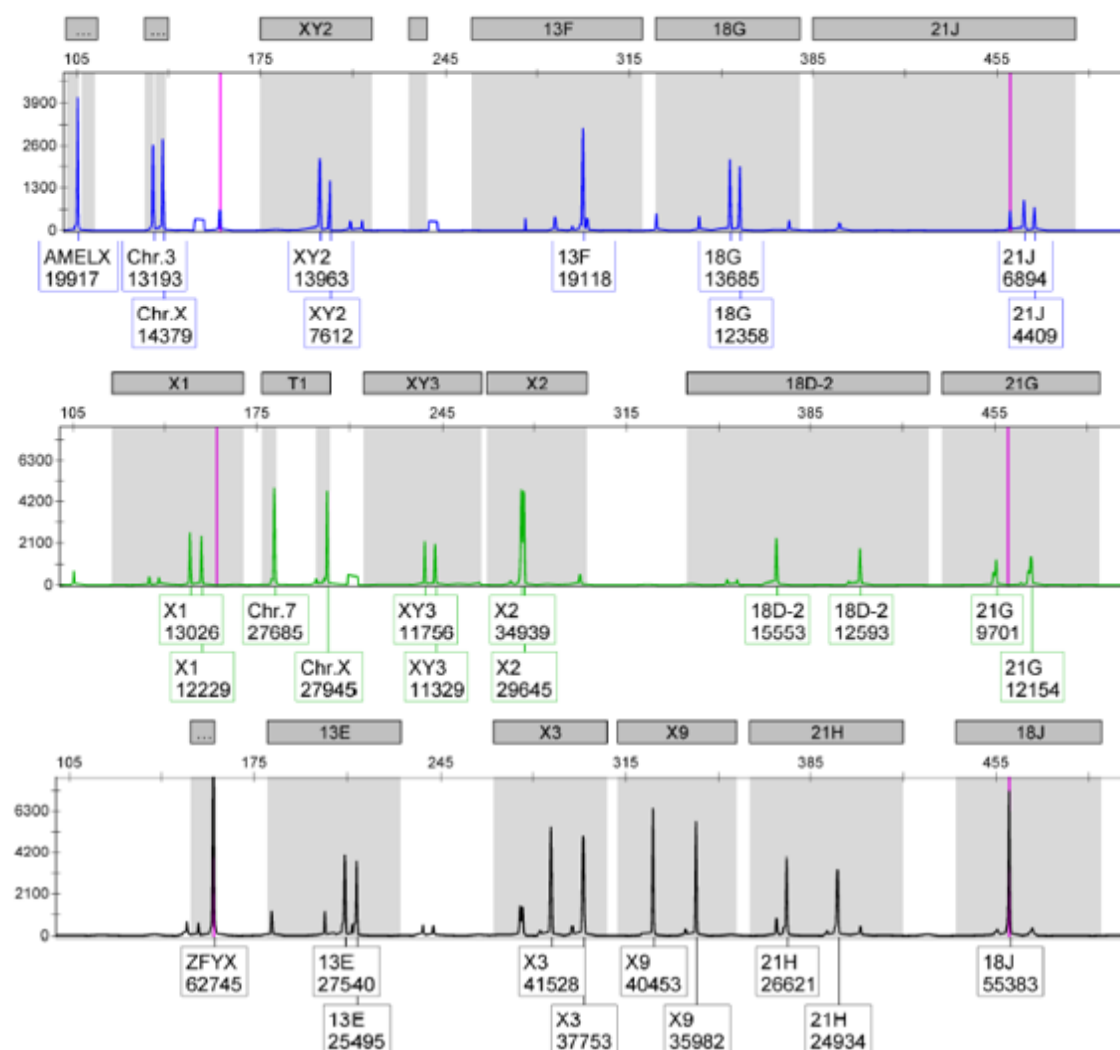


Figura 54- Eletroferograma do QF-PCR para o despiste das aneuploidias mais comuns no feto 2 com um resultado rsa,(13,18,21,X)x2 sem anomalias cromossômicas detetáveis. Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

O resultado do feto 1 é patológico, trissomia do cromossoma 18 representa uma síndrome de Edwards. Fetos afetados com esta síndrome tem um elevado risco de morte *in útero* (cerca de 95%), porém fetos do sexo feminino têm uma taxa de

sobrevivência maior que fetos do sexo masculino. Os principais sintomas da síndrome de Edwards são hipotonia, problemas de alimentação, atraso do crescimento, microcefalia e malformações cardíacas, do sistema digestivo, do sistema excretor e dos olhos. Bebês com esta síndrome têm um prognóstico de morte antes do primeiro ano de vida em 90% dos casos e apenas desenvolvem uma autonomia muito limitada com atraso de crescimento significativo.

Foram feitos estudos do número de tripletos CGG no gene *FMR1* em ambos os fetos através do teste de TP-PCR em biópsias de vilosidades coriônicas. O resultado do feto 1 foi um alelo com 31 repetições de tripletos CGG e outro alelo com 81 repetições de tripletos CGG (Figura 55), isto constitui uma pré-mutação e significa que o feto 1 tem suscetibilidade a FXTAS/FXPOI. O resultado do feto 2 foi um alelo com 31 repetições de tripletos CGG e outro alelo com 104 repetições de tripletos CGG (Figura 56), isto constitui uma pré-mutação e significa que o feto 2 também tem suscetibilidade a FXTAS/FXPOI.

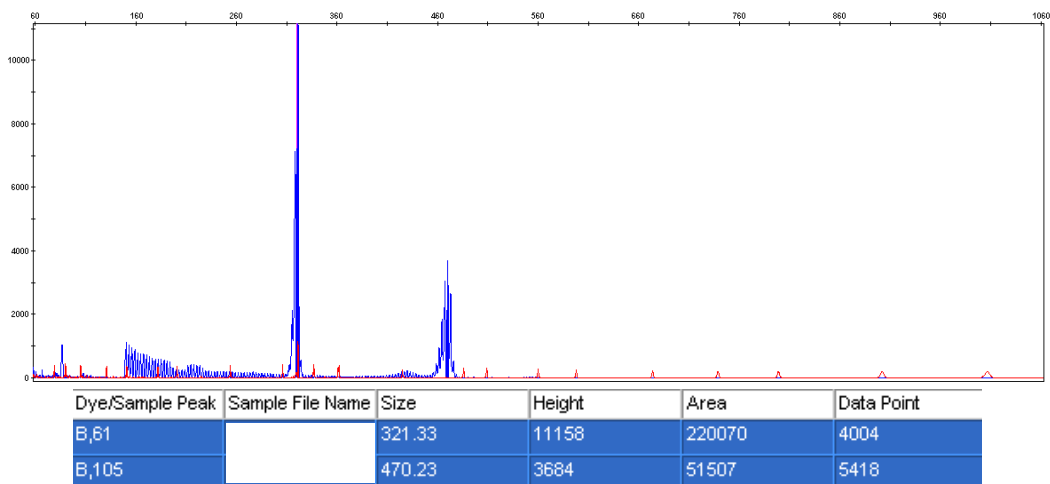


Figura 55- Eletroferograma do TP-PCR para a detecção do número de tripletos CGG no gene *FMR1* do feto 1. Observe-se que o feto 1 é portador de um alelo com pré-mutação com 81 tripletos CGG (470-228=242; 242/3=80,667) e de um alelo normal com 31 tripletos CGG (321-228=93; 93/3=31). Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

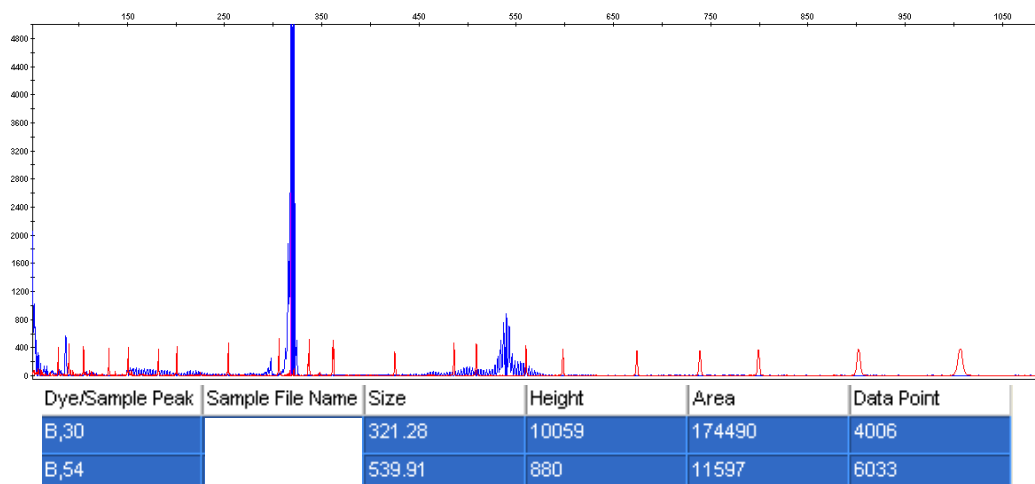


Figura 56- Eletroferograma do TP-PCR para a detecção do número de tripletos CGG no gene *FMR1* do feto 2. Observe-se que o feto 2 é portador de um alelo com pré-mutação com 104 tripletos CGG (539-228=311; 311/3=103,667) e de um alelo normal com 31 tripletos CGG (321-228=93; 93/3=31). Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Estes estudos genéticos permitem-nos chegar à conclusão de que o pai é portador de uma pré-mutação do gene *FMR1* e transmitiu a mesma para ambos os fetos do sexo feminino, o que remete para uma maior suscetibilidade a FXTAS/FXPOI, para além disso o feto 1 possui uma trissomia do cromossoma 18, associado à síndrome de Edwards. É incomum ocorrer uma contração do número de tripletos de geração para geração, porém, existem casos onde o gene *FMR1* transmitido pelo pai contrai quando transmitido às filhas [\[72\]](#). Diagnóstico pré-natal será oferecido em futuras gravidezes devido à suscetibilidade a FXTAS/FXPOI e ao risco de recorrência da síndrome de Edwards. Estes resultados devem ser discutidos numa consulta de aconselhamento genético.

10.8. Caso Clínico 8

Em estudos anteriores foi feito um cariótipo ao sangue que revelou 4 linhas celulares distintas: 48,XXXX[1]/47,XXX[1]/45,X[1]/46,XX[70].

Para a confirmação deste resultado foi efetuado a pesquisa do cromossoma X por FISH em células de fibroblasto.

Neste estudo FISH foram utilizadas o kit de sondas centroméricas para os cromossomas 18 (D18Z1), X (DXZ1) e Y (DYZ3) do sistema FAST-FISH (*Cytocell-Aquarius*[®]). Esta sonda hibridiza com as regiões centroméricas dos cromossomas 18, X e Y ([Figura 57](#)).



Figura 57- Locais de hibridização do kit de sondas centroméricas para os cromossomas 18 (D18Z1), X (DXZ1) e Y (DYZ3) do sistema FAST-FISH da Cytocell-Aquarius[®].

A análise de FISH de 102 células de fibroblastos (interfases e metafases) com a sonda centromérica do cromossoma X revelou uma situação de mosaicismos com 4 linhas celulares:

- 2 células com tetrassomia do cromossoma X (DXZ1x4)
- 1 célula com trissomia do cromossoma X (DXZ1x3) associadas a síndrome do triplo X ([Figura 58](#))
- 4 células com monossomia do cromossoma X (DXZ1x1) associadas a síndrome de Turner ([Figura 58](#))
- 95 células normais com 2 cromossomas X (DXZ1x2) ([Figura 58](#)).

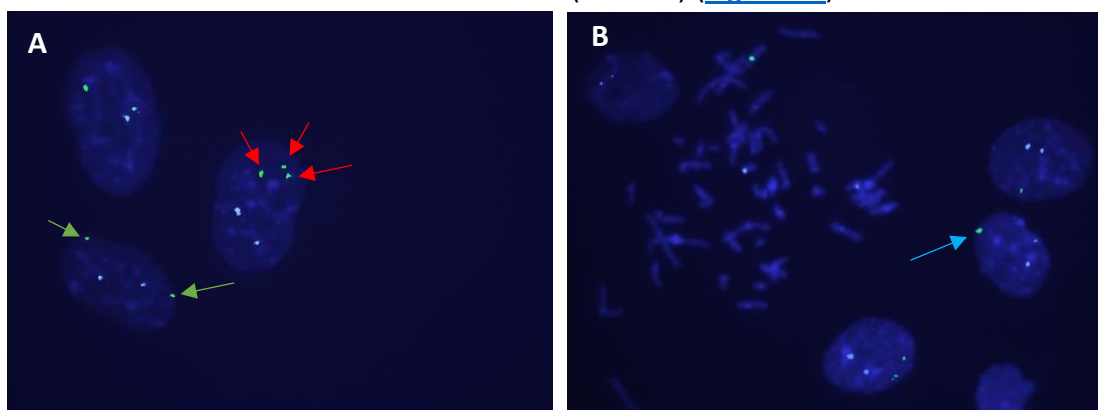


Figura 58- Observação de células em interfase através do microscópio de fluorescência podendo observar células com 3 sinais para o cromossoma X o que constitui uma trissomia X (seta vermelha), 2 sinais para o cromossoma X (seta verde) e 1 sinal para o cromossoma X o que constitui uma monossomia X (seta azul). Imagem cedida pelo LCG-FMUC.

Este resultado confirma o mosaicismos detetado na amostra de sangue anterior e deve ser discutido numa consulta de aconselhamento genético, uma vez que existe mosaicismos potencialmente patogénico, não sendo possível prever a distribuição das diferentes linhas celulares nos diferentes tecidos e consequentemente prever o seu impacto fenotípico.

Capítulo XI- Conclusão

O estágio curricular no LCG-FMUC enriqueceu tanto o meu conhecimento académico como as minhas habilidades práticas em laboratório. No decorrer do estágio ganhei conhecimento sobre todas as etapas da análise genética em laboratório e como estas são imperativas para o sucesso do diagnóstico genético. A importância da qualidade e precisão em todas as etapas do diagnóstico genético é de grande peso, uma vez que, esta é responsável pela obtenção de resultados fidedignos.

Durante o estágio, tive a oportunidade de trabalhar em colaboração com uma equipa dedicada de profissionais no campo da genética clínica pré e pós-natal. Colaborar com profissionais com conjuntos de habilidades diversas ampliou a minha perspetiva no campo do diagnóstico genético permitiu-me testemunhar a importância da colaboração interdisciplinar na abordagem de casos clínicos complexos. Isto é evidenciado, quando se compara os campos da citogenética convencional, citogenética molecular e genética molecular. A citogenética convencional permite a análise do complemento cromossómico possibilitando a deteção de alterações cromossómicas equilibradas e desequilibradas que estejam acima do limite de resolução da técnica. A técnica de FISH complementa a técnica de citogenética convencional, oferecendo um limite de resolução superior permitindo a deteção de alterações cromossómicas microscópicas não detetáveis na citogenética convencional, porém precisa de sondas específicas para a região alvo para detetar estas alterações tornando-se mais dispendiosa e dirigida, podendo não detetar alterações que não são cobertas pelo kit de sondas utilizado. O campo da genética molecular tem um grande leque de técnicas, umas mais específicas que apenas detetam CNVs de regiões específicas guiadas por marcadores ou sondas como é o caso da técnica de MLPA e o QF-PR, mas também existe a técnica de aCGH que permite detetar alterações de CNVs com um poder de resolução muito elevado em quase todo genoma, porém os resultados serão muito mais robustos e complexos de analisar uma vez que obtemos uma grande quantidade de informação a partir deste teste o que em torno resulta num período mais longo até a emissão do relatório. Para além disso nenhuma das técnicas de genética molecular referidas conseguem detetar alterações equilibradas, sendo necessário recorrer à citogenética convencional para a deteção destas.

Uma das lições mais significativas, foi a importância da precisão e atenção aos detalhes no diagnóstico genético. O compromisso de um laboratório certificado em manter rigorosas medidas de controlo de qualidade destacou a importância da precisão em cada etapa do processo diagnóstico. Essa experiência aprimorou as minhas habilidades no processo da aplicação das diferentes técnicas de diagnóstico, incutindo um senso de responsabilidade e meticulosidade que levarei comigo no meu futuro profissional.

Além dos aspectos técnicos, o meu tempo no estágio iluminou a importância das considerações éticas associadas aos testes genéticos. Aprender sobre a importância do consentimento do paciente, privacidade e o uso responsável das informações genéticas aumentou minha consciência das implicações mais amplas do diagnóstico genético em indivíduos e na sociedade como um todo.

Concluindo, a utilização das técnicas de citogenética e genética molecular complementam-se permitindo oferecer um diagnóstico genético o mais completo possível, por essa razão a escolha dos testes de diagnóstico para estudar um caso clínico é crucial para permitir oferecer um diagnóstico completo que poderá contribuir para relacionar o fenótipo com o genótipo. Em todo este processo é importante cumprir as regras do laboratório e ser metucioso e organizado de modo a minimizar os erros possíveis, o que inclui também o processo de análise de resultados e elaboração do relatório para que seja possível para o clínico responsável e para o paciente obter uma resposta claro sobre o seu caso clínico.

Referências

1. Balajee, A. S., & Hande, M. P. (2018). History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836(August), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.08.008>
2. Marantz Henig, R. (2001). *The Monk in the Garden: The Lost and Found Genius of Gregor Mendel, the Father of Genetics*. The Mariner.
3. Flemming, W. (1965). Historical paper: Contributions to the knowledge of the cell and its vital processes. *Journal of Cell Biology*, 25(1), 3–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.25.1.3>
4. Winkelmann A. (2007). Wilhelm von Waldeyer-Hartz (1836-1921): an anatomist who left his mark. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 20(3), 231–234. <https://doi.org/10.1002/ca.20400>
5. Tjio, J.H. and Levan, A. (1956), *The chromosome number of man*. *Hereditas*, 42: 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1956.tb03010.x>
6. Mégarbané, A., Ravel, A., Mircher, C., Sturtz, F., Grattau, Y., Rethoré, M. O., ... Mobley, W. C. (2009). The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: The past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genetics in Medicine*, 11(9), 611–616. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181b2e34c>
7. JACOBS, P., STRONG, J. A Case of Human Intersexuality Having a Possible XXY Sex-Determining Mechanism. *Nature* 183, 302–303 (1959). <https://doi.org/10.1038/183302a0>
8. FORD, C. E., JONES, K. W., POLANI, P. E., DE ALMEIDA, J. C., & BRIGGS, J. H. (1959). A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet (London, England)*, 1(7075), 711–713. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(59\)91893-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(59)91893-8)
9. Caspersson, T., Zech, L., & Johansson, C. (1970). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental cell research*, 60(3), 315–319. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(70\)90523-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(70)90523-9)
10. Drets, M. E., & Shaw, M. W. (1971). Specific banding patterns of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9), 2073–2077. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.9.2073>
11. Pathak, S., & Arrighi, F. E. (1973). Loss of DNA following C banding procedures. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 12(6), 414–422. <https://doi.org/10.1159/000130484>
12. Verma, R. S., & Lubs, H. A. (1975). A simple R banding technic. *American journal of human genetics*, 27(1), 110–117.
13. Bloom, S. E., & Goodpasture, C. (1976). An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Human genetics*, 34(2), 199–206. <https://doi.org/10.1007/BF00278889>
14. Bauman, J. G. J., Wiegant, J., Borst, P., & van Duijn, P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. *Experimental Cell Research*, 128(2), 485–490. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(80\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(80)90087-7)

15. Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), 2934–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>
16. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24(Table 1), 17–27.
17. Spinner, N. B., Ferguson-Smith, M. A., & Ledbetter, D. H. (2013). Cytogenetic Analysis. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00029-X>
18. Mansfield, E. S. (1993). Diagnosis of down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Human Molecular Genetics*, 2(1), 43–50. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.1.43>
19. Schouten, J. P. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12). <https://doi.org/10.1093/nar/gnf056>
20. Desai, A., & Jere, A. (2012). Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clinical Genetics*, 81(6), 503–510. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x>
21. Allyse, M., Minear, M. A., Berson, E., Sridhar, S., Rote, M., Hung, A., & Chandrasekharan, S. (2015). Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *International journal of women's health*, 7, 113–126. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S67124>
22. Gersen, S. L., & Keagle, M. B. (2013). *The principles of clinical cytogenetics*. Springer.
23. McIntosh J. R. (2016). Mitosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9), a023218. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023218>
24. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Meiosis. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10019/>
25. Turnpenny, P. D., Ellard, S., & Cleaver, R. (2022). *Emery's elements of medical genetics and Genomics*. Elsevier.
26. Jackson-Cook C. (2011). Constitutional and acquired autosomal aneuploidy. *Clinics in laboratory medicine*, 31(4), 481–vii. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2011.08.002>
27. Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2016). *Thompson & Thompson Genetics in medicine*. Elsevier.
28. Amor, D. J., M., G. R. J., & Sutherland, G. R. (2018). *Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University Press.
29. Scuffins, J., Keller-Ramey, J., Dyer, L., Douglas, G., Torene, R., Gainullin, V., Juusola, J., Meck, J., & Retterer, K. (2021). Uniparental disomy in a population of 32,067 clinical exome trios. *Genetics in Medicine*, 23(6), 1101–1107. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-01092-8>
30. Spinner, N. B., & Conlin, L. K. (2014). Mosaicism and Clinical Genetics. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 166(4), 397–405. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31421>

31. Toutain, J., Goutte-Gattat, D., Horovitz, J., & Saura, R. (2018). Confined placental mosaicism revisited: Impact on pregnancy characteristics and outcome. *PloS one*, 13(4), e0195905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195905>
32. Tran, H. A. (2006). Abnormal laboratory results: Biochemical tests for abnormalities in pregnancy. *Australian Prescriber*, 29(2), 48–52. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2006.028>
33. *Exames Ecográficos na Gravidez - portal das Normas Clínicas*. (n.d.). Retrieved April 4, 2023, from <https://normas.dgs.min-saude.pt/2011/09/29/exames-ecograficos-na-gravidez/>
34. Allyse, M., Minear, M., Rote, M., Hung, A., Chandrasekharan, S., Berson, E., & Sridhar, S. (2015). Non-invasive prenatal testing: A review of International Implementation and challenges. *International Journal of Women's Health*, 113. <https://doi.org/10.2147/ijwh.s67124>
35. Jones, T. M., & Montero, F. J. (2022). Chorionic Villus Sampling. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
36. Jindal, A., Sharma, M., Karena, Z. V., & Chaudhary, C. (2022). Amniocentesis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
37. Agarwal, N. (2016). Cordocentesis. *Journal of Fetal Medicine*, 3(2), 71–75. <https://doi.org/10.1007/s40556-016-0083-1>
38. Driscoll, D. A., Simpson, J. L., Holzgreve, W., & Otão, L. (2017). Genetic screening and prenatal genetic diagnosis. *Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies*, 193–218. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-32108-2.00010-x>
39. Berisha, S. Z., Shetty, S., Prior, T. W., & Mitchell, A. L. (2020). Cytogenetic and molecular diagnostic testing associated with prenatal and postnatal birth defects. In *Birth Defects Research* (Vol. 112, Issue 4, pp. 293–306). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1648>
40. Hastings, R. J., Cavani, S., Bricarelli, F. D., Patsalis, P. C., & Kristoffersson, U. (2007). Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: A common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations. *European Journal of Human Genetics*, 15(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201809>
41. Morton, C. C. (2010). Cytogenetics. *Current Protocols in Human Genetics*, 67(1). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0400s67>
42. McGowan-Jordan, J., Hastings, R. J., & Moore, S. (2020). *ISCN 2020: An international system for human cytogenomic nomenclature (2020)*. Karger.
43. Phelan, M. C. (2007). Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology*, 36(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0101s36>
44. Chowdhury, M. R., & Dubey, S. (2014). Role of cytogenetics and molecular genetics in human health and medicine. *Animal Biotechnology*, 451–472. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416002-6.00024-9>
45. Roth S. C. (2019). What is genomic medicine?. *Journal of the Medical Library Association : JMLA*, 107(3), 442–448. <https://doi.org/10.5195/jmla.2019.604>

46. Griffiths, L., & Chacon-Cortes, D. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: Current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 1. <https://doi.org/10.2147/bsam.s46573>
47. Boesenberg-Smith, K. A., Pessaraki, M. M., & Wolk, D. M. (2012). Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002>
48. Allingham-Hawkins, D. J., Chitayat, D., Cirigliano, V., Summers, A., Tokunaga, J., Winsor, E., & Chun, K. (2011). Prospective validation of quantitative fluorescent polymerase chain reaction for rapid detection of common aneuploidies. *Genetics in Medicine*, 13(2), 140–147. <https://doi.org/10.1097/gim.0b013e3182036763>
49. Pertl, B., Kopp a, S., Kroisel, P. M., Häusler, M., Sherlock, J., Winter, R., & Adinolfi, M. (1997). Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 177(4), 899–906. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(97\)70292-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(97)70292-8)
50. Mann, K., Hamilton, S., Evans, J., Sibbring, J., & Dore, J. (n.d.). *ACGS best practice guidelines for use of Quantitative Fluorescence-PCR for the detection of aneuploidy v4 Prepared and edited by.* <http://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>
51. Nykel, A., Woźniak, R., & Gach, A. (2021). The Influence of Maternal Cell Contamination on Fetal Aneuploidy Detection Using Chip-Based Digital PCR Testing. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1607. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11091607>
52. Biancalana, V., Glaeser, D., McQuaid, S., & Steinbach, P. (2015). EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *European Journal of Human Genetics*, 23(4), 417–425. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.185>
53. Monaghan, K. G., Lyon, E., & Spector, E. B. (2013). ACMG standards and guidelines for fragile X testing: A revision to the disease-specific supplements to the standards and guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine*, 15(7), 575–586. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.61>
54. Erster, S. H., Brown, W. T., Goonewardena, P., Dobkin, C. S., Jenkins, E. C., & Pergolizzi, R. G. (1992). Polymerase chain reaction analysis of fragile X mutations. *Human genetics*, 90(1-2), 55–61. <https://doi.org/10.1007/BF00210744>
55. Tassone, F. (2015). Advanced technologies for the molecular diagnosis of fragile X syndrome. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 15, Issue 11, pp. 1465–1473). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1101348>
56. Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., Carter, N. P., Church, D. M., Crolla, J. A., Eichler, E. E., Epstein, C. J., Faucett, W. A., Feuk, L., Friedman, J. M., Hamosh, A., Jackson, L., Kaminsky, E. B., Kok, K., Krantz, I. D., Kuhn, R. M., ... Ledbetter, D. H. (2010). Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *American Journal of Human Genetics*, 86(5), 749–764. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.006>
57. South, S. T., Lee, C., Lamb, A. N., Higgins, A. W., & Kearney, H. M. (2013). ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including

- postnatal and prenatal applications: Revision 2013. *Genetics in Medicine*, 15(11), 901–909. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.129>
58. Teh, H. S., Kishi, H., Scott, B., von Boehmer, H., Exp, J., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.-P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., Pinkel, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, P., Sudar, D., Gray, J. W., Waldman, F., & Pinkel, D. (1988). Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (Vol. 334). www.sciencemag.orgwww.sciencemag.org
 59. Riggs, E. R., Andersen, E. F., Cherry, A. M., Kantarci, S., Kearney, H., Patel, A., Raca, G., Ritter, D. I., South, S. T., Thorland, E. C., Pineda-Alvarez, D., Aradhya, S., Martin, C. L., & on behalf of the ACMG. (2020). Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics in Medicine*, 22(2), 245–257. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8>
 60. Kallioniemi, A. (2008). CGH microarrays and cancer. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 36–40). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.11.004>
 61. Picard, F., Robin, S., Lavielle, M., Vaisse, C., & Daudin, J. J. (2005). A statistical approach for array CGH data analysis. *BMC Bioinformatics*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-27>
 62. Kozlowski, P., Jasinska, A. J., & Kwiatkowski, D. J. (2008). New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*, 29(23), 4627–4636. <https://doi.org/10.1002/elps.200800126>
 63. Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G., & Gatta, V. (2012). Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3245–3276. <https://doi.org/10.3390/ijms13033245>
 64. MRC Holland. (2022). *MLPA® General Protocol Instructions For Use MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) General Protocol for the detection and quantification of DNA sequences.* (Issue May). <https://support.mrcholland.com/downloads/files/mlpa-general-protocol-one-tube>
 65. Willis, A. S., Van den Veyver, I., & Eng, C. M. (2012). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 32(4), 315–320. <https://doi.org/10.1002/pd.3860>
 66. Willis, A. S., Van den Veyver, I., & Eng, C. M. (2012). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 32(4), 315–320. <https://doi.org/10.1002/pd.3860>
 67. Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes and Cancer*, 2(6), 607–617. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>
 68. Kandi, V., & Vadakedath, S. (2015). Effect of DNA Methylation in Various Diseases and the Probable Protective Role of Nutrition: A Mini-Review. *Cureus*, 7(8), e309. <https://doi.org/10.7759/cureus.309>
 69. Willis, A. S., Van den Veyver, I., & Eng, C. M. (2012). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 32(4), 315–320. <https://doi.org/10.1002/pd.3860>
 70. Silva, M., de Leeuw, N., Mann, K., Schuring-Blom, H., Morgan, S., Giardino, D., Rack, K., & Hastings, R. (2019). European guidelines for constitutional cytogenomic analysis.

European Journal of Human Genetics, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0244-x>

71. Hastings, R., Howell, R., Bricarelli, F. D., Kristoffersson, U., & Cavani, S. (2012). *General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics*. 29, 7–25.
72. Ashley-Koch, A. E., Robinson, H., Glicksman, A. E., Nolin, S. L., Schwartz, C. E., Brown, W. T., Turner, G., Sherman, S. L., & Sher-Man, S. L. (1998). Examination of Factors Associated with Instability of the FMR1 CGG Repeat. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 63).