



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Inês Maria Santos Novais

## ESTÁGIO LABORATORIAL EM CITOGENÓMICA

**Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial  
realizado sob a orientação da Professora Doutora Isabel Maria Marques  
Carreira e Doutora Manuela Mota Freitas, apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de Coimbra.**

Junho de 2023



## Resumo

A citogenética convencional é a ciência que estuda a estrutura, função e o comportamento dos cromossomas ao longo do ciclo celular. A evolução das técnicas de cultura celular e bandagem tornou possível a identificação de diferentes alterações cromossômicas numéricas e estruturais e a associação das mesmas a diversas síndromes genéticas. Assim, rapidamente o estudo do cariótipo se tornou teste de rotina nos laboratórios de citogenética clínica. A confluência da citogenética com a genética molecular permitiu o desenvolvimento de novas ferramentas no apoio ao diagnóstico genético. A citogenética molecular surgiu de forma a colmatar o baixo limite de resolução do cariótipo e ainda incluir o estudo em núcleos interfásicos, através da técnica de *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH). Mais tarde, a investigação na área da genômica levou ao aumento de resolução na detecção de pequenas alterações do número de cópias do genoma humano. A técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) utiliza painéis de sondas específicos para a análise de vários *loci* do genoma humano em simultâneo. Estas técnicas descritas complementam-se no diagnóstico genético e exercem implicações na orientação clínica, decisão terapêutica e avaliação do prognóstico. O presente relatório de estágio aborda 6 casos clínicos representativos de cada um dos estudos realizados no departamento de citogenética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães (CGMJM): cariótipo (caso clínico 1, 2 e 3), FISH (caso clínico 4 e 5) e MLPA (caso clínico 6). Estes casos foram selecionados de 150 casos clínicos acompanhados ao longo dos nove meses de estágio e englobam nos seus resultados a descrição de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais detetadas. No decorrer do estágio foi adquirida autonomia e experiência em laboratório de diagnóstico e realizadas as principais técnicas de citogenética convencional e molecular: culturas celulares, manipulação, espalhamento, bandagem, montagem de kariogramas e realização da técnica de FISH. Na genética molecular foi realizada extração e quantificação de DNA e a técnica de MLPA. Assim, para além das bases teóricas apresentadas, este relatório permite ainda enfatizar a contínua importância da citogenética no diagnóstico genético clínico.

**Palavras-chave:** Citogenética Convencional, Cariótipo, Citogenética Molecular, FISH, MLPA.

## **Abstract**

Conventional cytogenetics is the science that studies the structure, function, and behavior of chromosomes throughout the cell cycle. The evolution of cell culture and banding techniques has made it possible to identify different numerical and structural chromosomal alterations and to associate them with various genetic syndromes. Thus, the study of the karyotype quickly became a routine test in clinical cytogenetics laboratories. The convergence of cytogenetics with molecular genetics allowed for the development of new tools to aid in genetic diagnosis. Molecular cytogenetics emerged to bridge the low-resolution limit of the karyotype and to include the study in interphase nuclei, through the technique of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). Later, research in the field of genomics led to increased resolution in the detection of small alterations in the copy number of the human genome. The Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique uses specific probe panels for the analysis of various loci of the human genome simultaneously. These described techniques complement each other in genetic diagnosis and have implications in clinical guidance, therapeutic decision making, and prognosis assessment. This internship report covers six clinical cases representative of each of the studies conducted in the cytogenetics department of Doctor Jacinto Magalhães Medical Genetics Center (CGMJM): karyotype (clinical case 1, 2 and 3), FISH (clinical case 4 and 5) and MLPA (clinical case 6). These cases were selected from 150 clinical cases that were followed during the nine-month internship and include in their results the description of detected numerical and structural chromosomal abnormalities. During the internship, was gained autonomy and experience in the diagnostic laboratory and performed the main techniques of conventional and molecular cytogenetics, such as performing cell cultures, manipulation, spreading, banding, assembly of karyograms, and implementation of the FISH technique. In molecular genetics, were followed and performed DNA extraction and quantification and the MLPA technique. Thus, in addition to the theoretical bases presented, this report also emphasizes the continuous importance of cytogenetics in clinical genetic diagnosis.

**Keywords:** Conventional Cytogenetics, Karyotype, Molecular Cytogenetics, FISH, MLPA.



## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração deste trabalho só foi possível com o apoio e incentivo de várias pessoas que me acompanharam ao longo deste percurso:

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

À minha orientadora, Dra. Manuela Freitas, pelo incentivo e partilha científica que teve comigo ao longo deste ano e me tornou mais competente nesta área que me apaixonou, a citogenética. À Dra. Natália Teles, diretora da unidade, pelas oportunidades que me proporcionou e pela confiança no meu trabalho. À Dra. Cristina, Dra. Sílvia, Dra. Tina, Dra. Elisa, Dra. Paula, Tamara, Dininha e D. Filomena por me terem acompanhado de perto ao longo de todo o meu percurso. Por todas as aprendizagens e por me darem sempre margem para questionar e errar. Por me fazerem sentir parte integrante da equipa e uma verdadeira colega de trabalho. Por todos os momentos de cumplicidade vividos e pela grande amizade que se formou. Não há palavras para descrever o quão importantes foram no meu crescimento profissional e pessoal deste ano. A toda a equipa do CGM, desde a unidade de bioquímica e molecular, até à citogenética, sou muito grata por esta oportunidade.

À Julieta e ao Pedro. À Julieta, pela amizade que vai crescendo ao longo dos anos e pelas histórias que vamos construindo juntas. Ao Pedro, um agradecimento especial. O meu parceiro de todas as horas que tive a sorte de cruzar na minha vida. Pelas rizadas, pelas resmunguices, pela cumplicidade e pela palavrinha amiga que me deu nos momentos em que mais precisava. Mais do que um parceiro de estágio é um amigo que levo comigo para o resto da vida.

À minha família e amigos...

Ao meu núcleo de pessoas, aos meus amigos que sempre foram um suporte ao longo desta jornada, que é a vida. Às minhas melhores amigas, Carolina, Eduarda, Margarida, Marcela, Márcia e Inês por me fazerem acreditar sempre em mim e me inspirarem todos os dias com as suas conquistas, trabalho e ambição. São incríveis.

À minha família. Os pilares mais importantes da minha vida, responsáveis pela pessoa que sou hoje. Aos meus pais por me darem todas as oportunidades para crescer. Ao meu pai Alberto que sempre me provou que com trabalho e determinação chegamos onde pertencemos. À minha mãe Lurdes, minha melhor amiga e companheira, por me tranquilizar com a pureza e bondade que lhe é característica. Ao *brotherhood*, Diogo, Mariana, Filipe, Joana e Zé por me inspirarem e me educarem ao longo da vida. Por me mimarem e acompanharem em todas as etapas do meu percurso, acreditando sempre em mim e fazendo com que tudo se torne mais fácil. Caminhamos juntos, sempre. Ao meu Benji por ser a criança e o afilhado mais fofo do mundo. Amo-vos muito.

Ao meu primo Duarte, esta conquista dedico-a a ele. Pela força incondicional que me deu e acompanhou em todos os momentos deste ano. Viverás para sempre no meu coração.

Todas estas pessoas e muitas outras foram essenciais para o término deste ciclo, académico e pessoal. A todas elas, sou grata por existirem na minha vida.



<b>Índice de figuras .....</b>	<b>9</b>
<b>Índice de tabelas .....</b>	<b>11</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO I   Introdução .....</b>	<b>15</b>
<b>1   A célula .....</b>	<b>16</b>
1.1.   O Ciclo celular .....	16
1.1.1   Mitose.....	17
1.1.2   Meiose .....	19
<b>2   Citogenética Convencional .....</b>	<b>20</b>
2.1   História da Citogenética Clínica .....	20
2.2   Cromossomas Humanos.....	21
2.2.1   Estrutura .....	21
2.2.2   Classificação .....	22
2.2.3   Bandagem.....	23
2.3   Alterações Cromossômicas .....	25
2.3.1   Numéricas .....	25
Aneuploidia dos cromossomas autossômicos .....	27
Aneuploidia dos cromossomas sexuais.....	29
2.3.2   Estruturais .....	31
Equilibradas .....	31
Desequilibradas .....	35
2.4   Nomenclatura .....	37
2.5   Diagnóstico Pré-Natal .....	37
Invasivo .....	38
Não invasivo .....	39
2.6   Diagnóstico Pós-Natal.....	41
2.7   Elaboração do Relatório Clínico .....	42
<b>3   Citogenética Molecular .....</b>	<b>44</b>
3.1   Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization .....	44
Princípio da técnica.....	45
Tipos de sondas.....	45
<b>4   Genómica.....</b>	<b>47</b>
4.1   Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA .....	47

Princípio da Técnica .....	47
Painéis de sondas .....	49
<b>CAPÍTULO II   Objetivos .....</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO III   Materiais e Métodos .....</b>	<b>53</b>
5   Registo das amostras biológicas.....	54
6   Citogenética Convencional.....	54
7   Citogenética Molecular .....	61
8   Genómica.....	64
<b>CAPÍTULO IV   Resultados e Discussão.....</b>	<b>68</b>
Caso Clínico nº1 .....	71
Caso Clínico nº2.....	72
Caso Clínico nº3.....	80
Caso Clínico nº4.....	83
Caso Clínico nº5.....	87
Caso Clínico nº6.....	89
<b>CAPÍTULO V   Considerações Finais.....</b>	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO VI   Referências Bibliográficas .....</b>	<b>90</b>

## Índice de figuras

**Figura 1** | Fases constituintes da divisão celular.

**Figura 2** | Representação esquemática das principais fases Mitóticas.

**Figura 3** | Representação dos cromossomas metafásicos obtidos por Tijo e Levan em 1956.

**Figura 4** | Estrutura e classificação dos cromossomas.

**Figura 5** | Reconhecimento Cromossómico.

**Figura 6** | Cariograma de Síndrome de Down Livre e esquema de Síndrome de Down por Translocação Robertsoniana.

**Figura 7** | Cariograma representativo de Síndrome de Klinefelter.

**Figura 8** | Translocação recíproca.

**Figura 9** | Representação esquemática dos diferentes tipos de inversão.

**Figura 10** | Isocromossoma.

**Figura 11** | Sequenciação massiva paralela (MPS) na deteção de aneuploidia fetal.

**Figura 12** | Principais etapas da técnica de FISH.

**Figura 13** | Representação da sequência *stuffer* derivada de bacteriófago M13.

**Figura 14** | Representação esquemática das principais etapas da técnica de MLPA.

**Figura 15** | Representação gráfica dos fragmentos de controlo de qualidade presentes nos painéis de MLPA.

**Figura 16** | Principais etapas laboratoriais em citogenética convencional.

**Figura 17** | Modelos ilustrativos de diferentes tipos de culturas celulares.

**Figura 18** | Etapas da bandagem GTL.

**Figura 19** | Principais etapas da técnica de FISH.

**Figura 20** | Aparelho *ThermoBrite*.

**Figura 21** | Extração do DNA.

**Figura 22** | Representação gráfica do estudo de 150 amostras filtradas durante o período prático laboratorial.

**Figura 23** | Cariograma poliploide, 69,XXX obtido por bandagem GTL.

**Figura 24** | Cariograma 46,X,psu idic(X)(p11.2).

**Figura 25** | Representação esquemática da árvore genealógica da família em estudo.

**Figura 26** | Cariograma 45,XX,der(14;22)(q10;q10) obtido por bandagem GTL.

**Figura 27** | Metafases captadas com a presença dos três cromossomas marcadores distintos mar1, mar2 e mar3.

**Figura 28** | Imagens FISH captadas no microscópio de fluorescência.

**Figura 29** | Imagem FISH captada no microscópio de fluorescência com sinal de hibridação da sonda do *SRY*.

**Figura 30** | Resultado obtido através da técnica de MLPA com recurso ao painel *SALSA MLPA Probemix P343 Autism-I*

## Índice de tabelas

**Tabela 1** | Sondas de sequência única do kit *CytoCell*® utilizadas no CGM e respectiva região de detecção.

**Tabela 2** | Principais indicações clínicas referentes às amostras de diagnóstico pós-natal e pré-natal analisadas durante o período de estágio.

**Tabela 3** | Resultados tabelados dos rácios correspondentes a cada sonda do painel *SALSA MLPA Probemix P343 Autism-I*.

## Lista de Abreviaturas

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°</b>	Graus celsius
<b>#</b>	Cromossoma
<b>µL</b>	Microlitros
<b>2n</b>	Diploide
<b>aCGH</b>	<i>array Comparative Genomic Hybridization</i>
<b>ACMG</b>	<i>American College of Medical Genetics</i>
<b>ADPM</b>	Atraso Desenvolvimento Psicomotor
<b>AGD</b>	Atraso Global do Desenvolvimento
<b>AgNor</b>	Região organizadora do nucléolo com nitrato de prata
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de prata
<b>BAR</b>	Bandas de Alta Resolução
<b>CBG</b>	Bandas C por Hidróxido de bário e Giemsa
<b>cffDNA</b>	<i>Cell-free fetal DNA</i>
<b>CGH</b>	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
<b>CGM</b>	Centro de Genética Médica
<b>CNV</b>	<i>Copy Number Variants</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPN</b>	Diagnóstico pré-natal
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
<b>G0</b>	Gap 0
<b>G1</b>	Gap 1
<b>G2</b>	Gap 2
<b>GTG</b>	Bandas G, usando tripsina e corante Giemsa
<b>GTL</b>	Bandas G, usando tripsina e corante Leishman
<b>IMA</b>	Idade Materna Avançada
<b>ISCN</b>	<i>Internacional System for human Cytogenetic Nomenclature</i>
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>M-FISH</b>	<i>Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization</i>

<b>MFIU</b>	Morte Fetal Intra-Uterina
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
<b>n</b>	Haplóide
<b>NIPT</b>	<i>Non-Invasive Prenatal Testing</i>
<b>NOR</b>	Região organizadora do nucléolo
<b>p</b>	Braço curto do cromossoma
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDI</b>	Perturbação do Desenvolvimento Intelectual
<b>q</b>	Braço longo do cromossoma
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribossómico
<b>S</b>	Fase de Síntese
<b>SD</b>	Síndrome de Down
<b>SE</b>	Síndrome de Edwards
<b>SK</b>	Síndrome de Klinefelter
<b>SP</b>	Síndrome de Patau
<b>SSC</b>	Solução salina de citrato de sódio
<b>ST</b>	Síndrome de Turner
<b>UPD</b>	Dissomia uniparental



## CAPÍTULO I | Introdução

---

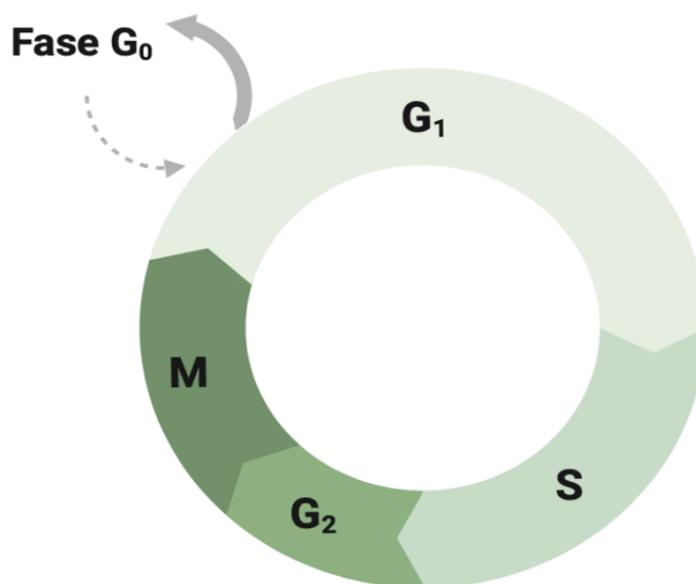
# 1 | A célula

## 1.1| O Ciclo celular

As descobertas realizadas ao longo dos séculos na biologia celular e molecular, promovem a contínua investigação e interesse por aquela que é a unidade fundamental da vida – a célula. Depois de muitas décadas de investigação focada na complexidade da considerada “maquinaria do sistema vivo”, atualmente é incontestável o papel da mesma na constituição de cada organismo vivo no planeta. Apesar da sua aparente diversidade, os seres vivos são fundamentalmente semelhantes no seu interior, todos eles são constituídos por células: unidades pequenas, condensadas por membranas, preenchidas com uma solução aquosa rica em nutrientes e substâncias químicas e dotadas da extraordinária capacidade de criar cópias de si mesmas. Através de um mecanismo orquestrado e regulado - o ciclo celular - é possível a sua sobrevivência e sucessiva divisão e a replicação precisa do seu conteúdo genético [1].

O ciclo celular permite o crescimento e a reprodução de todos os organismos vivos através da duplicação e distribuição do material genético às células recém-formadas. No caso dos seres vivos unicelulares, constituídos apenas por uma célula, a divisão celular origina um novo ser vivo, enquanto que nos seres vivos multicelulares origina diversas células geneticamente idênticas à célula-mãe [2].

O ciclo celular é dividido em quatro fases (figura 1), através das quais uma célula duplica o seu conteúdo celular e se divide em duas células-filhas. Na fase inicial da divisão ocorre um período de crescimento, fase  $G_1$ , que permite a síntese das macromoléculas, entre elas as membranas, proteínas e o RNA. De seguida, a fase S, permite a replicação do DNA. No período  $G_2$  as células continuam em crescimento e consequente aumento de volume obrigando a mesma a entrar em divisão na fase posterior. Na fase M o material genético é dividido de igual forma por duas células filhas, terminando o ciclo celular com o fenómeno de citocinese. As células não divididas entram em senescência em  $G_0$  [2], [3].



**Figura 1 | Fases constituintes do ciclo celular.** Interfase e mitose. (G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) - Todos os constituintes celulares são produzidos em quantidades suficientes para colmatar as necessidades de duas células; (S) - A composição genética é replicada; (M) - Células preparadas para entrar no processo de divisão; (G<sub>0</sub>) - Células não divididas entram em senescência. Adaptado de [4]. Imagem criada em *Biorender*.

### 1.1.1 | Mitose

O processo mitótico nas células somáticas é o evento-chave do ciclo celular. Inicia-se na fase M com o controlo e fosforilação altamente dinâmico de numerosas proteínas, as quinases, à medida que a célula progride no ciclo celular. [5]. Envolve uma complexa reorganização da arquitetura celular e divisão do material nuclear, previamente replicado, para obtenção de duas células-filhas geneticamente idênticas a uma célula-mãe. Esta fase subdivide-se em cinco fases distintas, entre elas: profase, prometáfase, metafase, anafase e telófase (figura 2). Termina com a citocinese, através da formação do anel contrátil e formação das duas células-filhas [6].

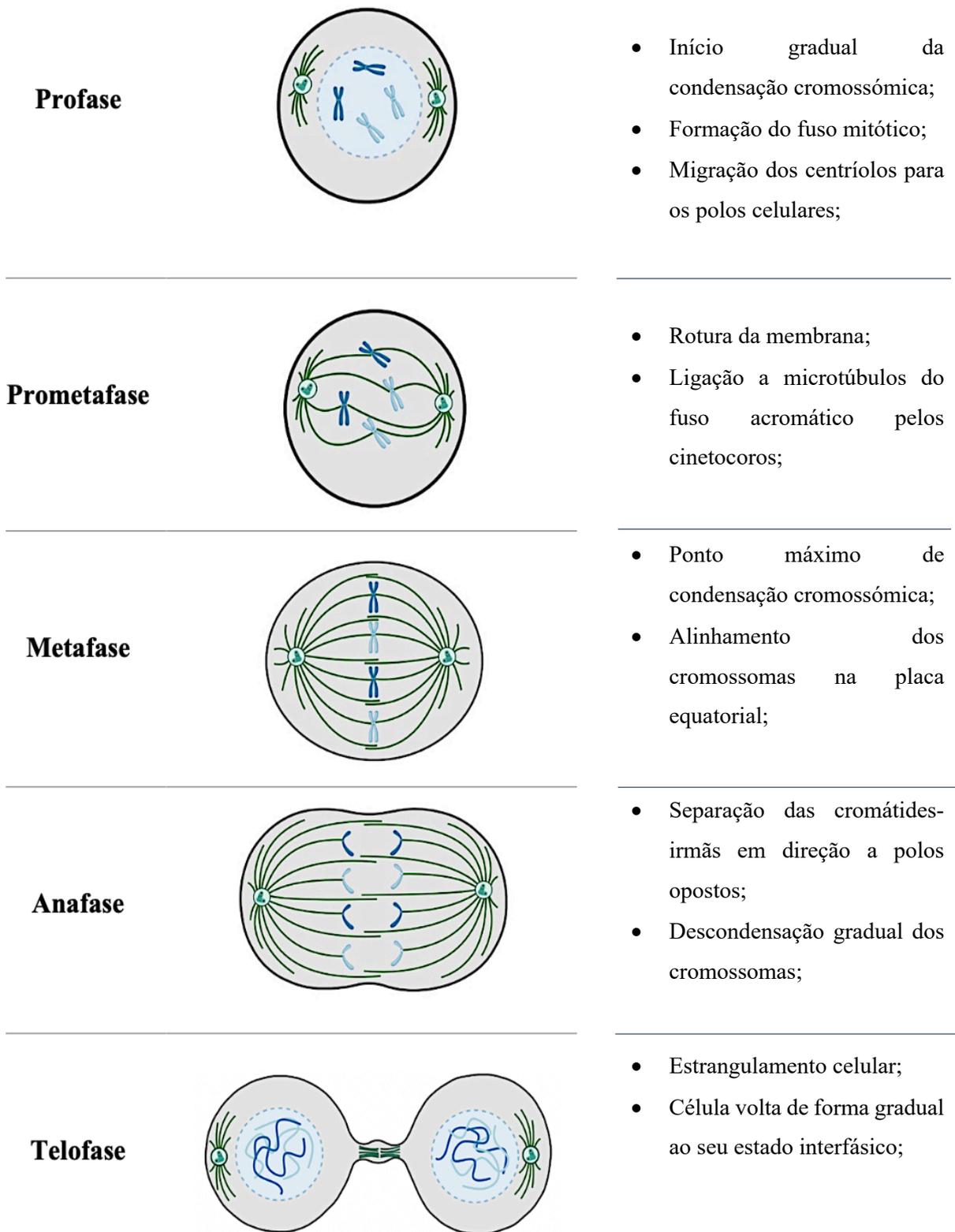


Figura 2 | Representação esquemática e descrição das principais fases Mitóticas. Imagem criada em *Biorender*.

### 1.1.2 | Meiose

A célula diploide ( $2n=46$ ) contém duas cópias de cada cromossoma, uma de origem materna e outra de origem paterna, sendo que cada par de cromossomas idênticos é designado de cromossomas homólogos. Meiose é o evento pelo qual ocorrem dois ciclos de segregação cromossómica, seguida de divisão celular. A reprodução sexual, mecanismo através do qual duas células germinativas se fundem, tipicamente haploides ( $n=23$ ), não seria possível sem o processo de meiose. Após a fecundação, o número diploide é restabelecido com a formação do zigoto [7].

Meiose I e meiose II são as duas divisões sucessivas da meiose. A meiose I é a etapa de redução do número de cromossomas para metade através do emparelhamento de homólogos em profase I e segregação dos mesmos para polos opostos em anafase I. Os cromossomas X e Y emparelham em segmentos homólogos nas extremidades dos seus braços curtos e longos [6]. Durante a profase I ocorre a recombinação genética dos cromossomas homólogos, bivalentes, essencial para a segregação precisa ao longo da meiose. Neste processo, mais concretamente, na subfase do paquíteno, a formação dos pontos de quiasma permite a troca física de segmentos de DNA entre cromátides não-irmãs (*crossing-over*). Erros de recombinação podem resultar em troca desigual de material genético originando deleções ou duplicações de material e, conseqüentemente, segregação anormal ou novos rearranjos cromossómicos. Numa fase mais tardia, pode resultar em aneuploidias ou anomalias genéticas durante o período gestacional, responsáveis por diversas síndromes no neonatal. Na meiose I é expectável um balanço final de duas células-filhas haploides ( $n$ ) com apenas uma cópia de cada cromossoma homólogo [8], [9]

A meiose II segue a meiose I sem nenhuma etapa interventiva de replicação do DNA. Na meiose II é expectável um balanço final de quatro células-filhas haploides ( $n$ ) constituídas por apenas uma cromátide-irmã de cada cromossoma homólogo [9].

## 2 | Citogenética Convencional

### 2.1 | História da Citogenética Clínica

No final do século XIX foram dados os primeiros passos naquela que é a ciência que estuda a estrutura, função e evolução dos cromossomas, a citogenética. O início da citogenética humana é geralmente atribuído ao citologista e professor Walther Flemming que em 1882 publicou as primeiras ilustrações de cromossomas humanos. Anos mais tarde Waldeyer introduziu a palavra “cromossoma” na comunidade cientista e rapidamente se formulou a hipótese destes constituírem a base física da hereditariedade [10]. Dada esta hipótese, o foco nos anos que se seguiram foi no estudo e investigação cromossómica. Em 1952, Hsu sugeriu que a análise de cromossomas seria facilitada por meio de culturas celulares, e perante imagens não distinguíveis de forma clara e individual, estabeleceu como 48 aquele que seria o número total de cromossomas humanos. Os avanços das técnicas laboratoriais de manipulação e a qualidade de resolução das lentes óticas, permitiram em 1956 a Tijo e Levan a basearam-se na técnica de Hsu para reportarem o número correto de cromossomas humanos, 46 cromossomas (figura 3).



**Figura 3| Representação dos cromossomas metafásicos obtidos por Tijo e Levan em 1956.** Metáfase de fibroblastos embrionários humanos que permitiram a primeira contagem correta do número cromossómico humano. Adaptado de [11].

Os anos que se seguiram foram de grande relevo e foco na associação das anomalias genéticas encontradas ao diagnóstico de síndromes patológicas, com destaque em grandes nomes como Lejeune, Ford, Jacobs e Strong, Patau e Edwards [12]. Desde então, a citogenética clínica continua em expansão e aliada ao desenvolvimento das tecnologias moleculares desempenha um papel crucial no diagnóstico. Através da detecção e identificação de alterações cromossômicas, por análise de cariótipo e por técnicas de citogenética molecular como a Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), permite uma orientação clínica personalizada, decisão terapêutica e avaliação adequada do prognóstico esperado [13].

## **2.2 | Cromossomas Humanos**

### **2.2.1 | Estrutura**

O cromossoma mitótico é constituído por duas cromátides-irmãs, compostas por uma dupla hélice de DNA, contraída e compactada com auxílio das histonas, levando à formação de octâmeros que constituem o nucleossoma. O nucleossoma enrola-se sobre si mesmo e origina fibras de cromatina, que, quando condensadas dão origem ao cromossoma (figura 4). As regiões do centrómero, telómero e regiões organizadoras dos nucléolos são regiões funcionalmente diferenciadas dos cromossomas [14], [15].

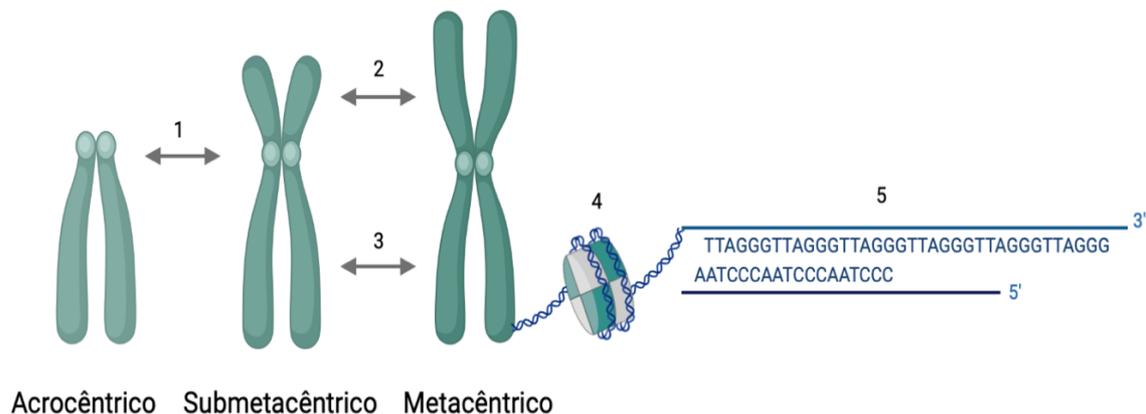
O centrómero é a constrição primária dos cromossomas, constituído por sequências de DNA repetitivas e essencial na sobrevivência do cromossoma ao longo da divisão celular. Permite a interação dos cinetocoros - complexo proteico presente na superfície do centrómero - com os microtúbulos do fuso acromático e leva à separação e migração das cromátides-irmãs durante a anáfase [16].

Os telómeros são estruturas em *loop* importantes na estabilidade do genoma e na proliferação celular. Constituem as terminações físicas do cromossoma e são formados por sequências repetitivas em *tandem* altamente conservadas. O comprimento do telómero diminui gradualmente com o processo de envelhecimento e com o aumento do número de divisões celulares. Desta forma, células com alterações no funcionamento da telomerase - enzima ribonucleoproteica especializada na transcriptase reversa e na manutenção dos telómeros - resultarão em encurtamento gradual dos cromossomas, e levam à sua instabilidade, e conseqüente, senescência celular [17], [18].

As regiões organizadoras dos nucléolos (NORs) estão localizadas nos *stalks* de cromossomas acrocêntricos e estão na origem da formação dos nucléolos em células interfásicas. As NORs são constituídas por genes ribossomais e, portanto, envolvidas na produção do rRNA [18].

### 2.2.2 | Classificação

Antes do desenvolvimento das técnicas de bandagem GTL, os cromossomas eram identificados consoante a sua estrutura, tamanho e proporção dos braços curto (*p* - do francês *petit*) e longo (*q* - do francês *queue*). Esta proporção era determinada a partir da posição centromérica do cromossoma em questão. A identificação arbitrária de pares de cromossomas com base na sua posição centromérica permitiu dividi-los em três categorias: cromossomas metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (figura 4)[19].



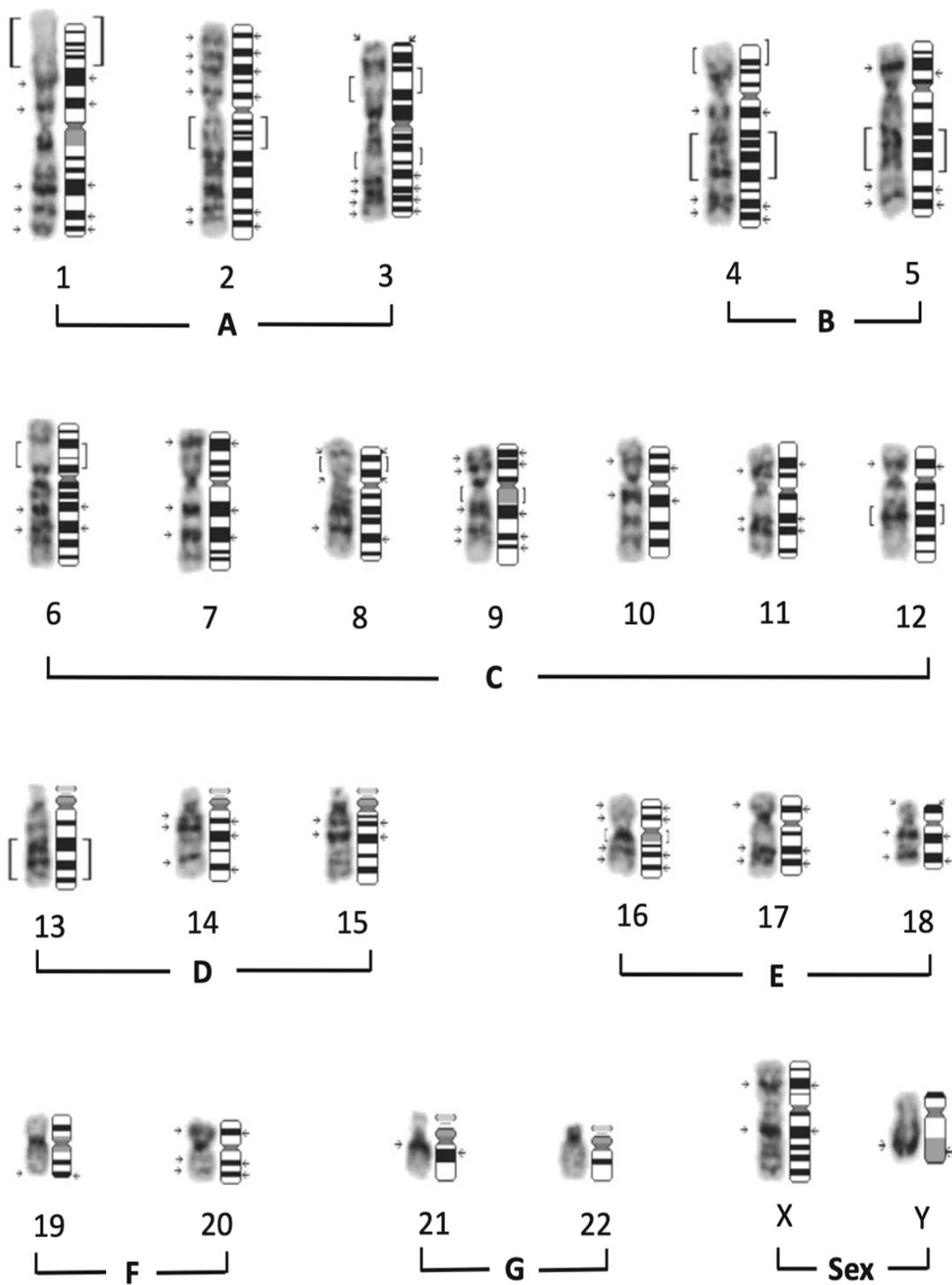
**Figura 4 | Estrutura e classificação dos cromossomas.** (1) Centrômero; (2) Braço curto do cromossoma (*p*); (3) Braço longo do cromossoma (*q*); (4) Nucleossoma; (5) Cadeias de DNA *forward* e *reverse*. Imagem criada em *Biorender*.

Os cromossomas metacêntricos, incluem os mais longos do cariótipo Humano, apresentam o centrômero ao centro que leva a uma equidade relativa do tamanho do braço curto e longo. Os submetacêntricos, com o centrômero descentrado resultam numa desigualdade proporcional no tamanho dos braços *p* e *q*. Os acrocêntricos apresentam o centrômero próximo da extremidade originando um braço *p* bastante curto, facilmente distinguível dos restantes. Após o agrupamento dos homólogos segundo estes critérios de classificação, os cromossomas são reunidos com base no tamanho relativo decrescente e

posição do centrómero em diferentes grupos de A a G, para identificação mais clara de cada um deles. O cromossoma sexual X pertence ao grupo C e o cromossoma sexual Y pertence ao grupo G [18].

### **2.2.3 | Bandagem**

O grande avanço na identificação cromossômica surge em 1970 pela demonstração por Casperson de que cada cromossoma tem um padrão de bandas próprio. Estabelecido um sistema internacionalmente aceite para a descrição do padrão de bandas dos cromossomas, cada par de cromossomas homólogos passou a ser identificado com precisão por *landmarks*, regiões e bandas específicas (figura 5). Esta conquista teve grande impacto no diagnóstico clínico laboratorial, pois, atualmente é possível identificar um conjunto de alterações cromossômicas numéricas e estruturais através do reconhecimento do padrão de bandas e, correlacioná-las com um quadro clínico específico [20]. As técnicas de bandagem podem ser incluídas em dois grupos, as técnicas que resultam em bandas distinguíveis ao longo de todo o comprimento cromossômico (G, Q e R) e as que resultam em bandas que distinguem regiões específicas do cromossoma (C, T e NOR) [21].



**Figura 5 | Reconhecimento Cromossômico.** Landmarks de todos os cromossomas humanos, obtidas por técnicas de bandagem G e divisão dos cromossomas nos respectivos grupos. Adaptado de [20].

As bandas são estruturas visíveis de milhares de genes, com 5 a 10 Mb de resolução. As técnicas de bandagem refletem a organização funcional do genoma que regula DNA de reparação, transcrição, replicação e recombinação [6]. O reconhecimento do padrão de bandas iniciou-se com as técnicas de bandagem GTG/GTL (bandas G por Tripsina e Giemsa/*Leishman*), a mais comumente utilizada em laboratórios clínicos. As bandas G positivas são escuras e ricas em adenina-timina. As bandas G negativas são claras e ricas em citosina-guanina e genes. Esta técnica implica o tratamento das lâminas com tripsina, uma protease para digestão parcial do cromossoma, e posterior marcação com corante Giemsa ou *Leishman* [21].

As bandas CGB (bandas C por hidróxido de bário e Giemsa) a coloração AgNOR (coloração com nitrato de prata para as regiões organizadoras dos nucléolos) são também técnicas de relevo no estudo do cromossoma. A bandagem CGB estuda a heterocromatina constitutiva ( $\approx 20\%$  do genoma humano) dos centrómeros e constrições secundárias dos cromossomas. A heterocromatina constitutiva apesar de se localizar em torno da constrição primária de todos os cromossomas humanos, é mais abundante nas constrições secundárias dos cromossomas 1, 9, 16 e no Yq [19]. Por outro lado, as bandas AgNOR utilizam nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e coloração com Giemsa para o estudo de regiões organizadoras dos nucléolos dos cromossomas acrocêntricos [22].

## 2.3 | Alterações Cromossômicas

### 2.3.1 | Numéricas

**Euploidia** Os seres euploides variam de acordo com o número de conjuntos genômicos presentes no núcleo. Um cariótipo diploide contém 46 cromossomas, 22 pares de cromossomas autossômicos e um par de cromossomas sexuais, completando assim os 23 pares. O termo euploidia descreve alterações em todo o genoma que envolvem o ganho ou a perda de um conjunto cromossômico inteiro, alterando desta forma o conjunto cromossômico final  $2n=46$  [23].

Os organismos poliploides têm múltiplos exatos resultantes de uma divisão celular anormal. Um cariótipo poliploide pode originar triploidias (69 cromossomas) ou tetraploidias (96 cromossomas). Nos humanos estima-se que a triploidia esteja presente

em 1 a 2% de todas as concepções. A presença destes cariótipos não é compatível com a vida humana e está associada a ocorrência de abortos espontâneos numa fase gestacional precoce [19], [24].

**Aneuploidia** Ao longo dos processos mitóticos as células são sujeitas a aumentos crescentes de defeitos de segregação que propiciam instabilidade cromossômica e populações heterogêneas de células, não múltiplas do complemento haploide. Isto leva a um desequilíbrio cromossômico final denominado aneuploidia, que se expressa de forma negativa na proliferação, metabolismo e manutenção da integridade do genoma [25].

As aneuploidias dividem-se em duas categorias principais, dependendo se o(s) cromossoma(s) extra ou ausente(s) do cariótipo haploide é um dos 22 cromossomas autossômicos ou cromossomas sexuais X ou Y [26]. Na origem deste desequilíbrio estão erros de segregação na meiose I e meiose II. A não-disjunção dos cromossomas na meiose I ou II resulta em migração anormal e num desequilíbrio genético final nas células-filhas. Já a instabilidade do fuso durante o processo meiótico também está presente em fenómenos aneuploides. A ligação incorreta do cinetocoros às fibras do fuso acromático pode levar a que o cromossoma se perca durante o processo meiótico, na migração em anafase I ou II, e não seja incluído no núcleo recém-formado, levando de igual forma a um desequilíbrio final nas células-filhas com perda do número de cópias cromossômicas [27]. Incluem-se também fatores como falha de recombinação na profase da meiose I, deterioração da coesão cromossômica ligada à idade dos oócitos e disfunção mitocondrial [28].

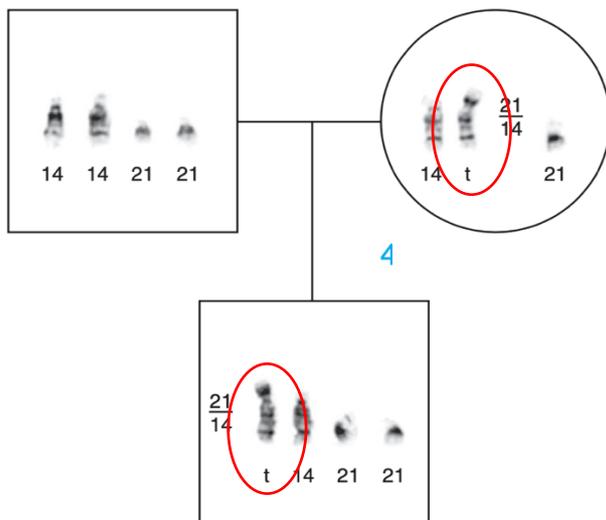
As aneuploidias são a causa genética mais comum associada a abortos espontâneos (35%) e atrasos no desenvolvimento cognitivo e psicomotor (0,3%), dependendo do grau de aneuploidia e dos cromossomas envolvidos [29]. A idade materna (IMA) está associada a fenómenos aneuploides e a sua percentagem aumenta exponencialmente na década anterior à menopausa. A IMA atinge de forma significativa os autossomas ao invés dos cromossomas sexuais. A aneuploidia de maior destaque devido à sua compatibilidade com a vida é relacionada com o cromossoma 21 associado à Síndrome de Down [28], [29].

## Aneuploidia dos cromossomas autossómicos

Nos seres humanos a aneuploidia autossómica mais comum é a trissomia do cromossoma 16, incompatível com a vida. Casos excepcionais de mosaïcismo, podem resultar em nascimento com atraso global do desenvolvimento psicomotor (AGDPM) e perturbações do desenvolvimento intelectual (PDI), dependendo do grau de mosaïcismo apresentado [28]

**Síndrome de Down (SD)** - Classificada como a síndrome do neurodesenvolvimento de causa genética conhecida mais comum e compatível com a sobrevivência humana [30]. A cópia extra de um cromossoma 21 resultante de segregação total do cromossoma - trissomia 21 livre - está presente em 95% dos indivíduos com SD. Este fenómeno advém de erros de segregação em meiose I (66%) ou de erros em fase mitótica após a formação do zigoto (5%). A translocação Robertsoniana entre o cromossoma 14 e 21 (5%), *de novo* ou herdada, e o mosaïcismo (2%) são igualmente responsáveis por um diagnóstico de SD. A trissomia parcial do cromossoma 21 é rara e pode resultar num conjunto de diferentes manifestações clínicas [31].





**Figura 6 | Cariograma de Síndrome de Down Livre e esquema Síndrome de Down por Translocação Robertsoniana.**

Na versão Livre, a cópia extra do cromossoma 21 é apresentada na sua totalidade. Na Translocação Robertsoniana o cromossoma de fusão 14q21q é transmitido pela mãe portadora à descendência, fazendo com que haja três cópias do cromossoma 21, e portanto, um quadro de Síndrome de Down. Cariograma cedido por CGM e esquema adaptado [110].

As manifestações mais comuns associadas a SD incluem déficit intelectual, doença cardíaca congênita e maior propensão a doença de Alzheimer. Aparecimento de várias características fenotípicas, tais como, olhos oblíquos estreitos, nariz achatado e baixa estatura. A literatura destaca o risco de trissomia 21 associado à idade materna avançada, aos padrões de recombinação cromossômica e ao metabolismo do folato. No entanto, ao longo dos anos de investigação, novos fatores incluindo o uso de pílulas contraceptivas, o consumo de tabaco e a exposição a radiações, foram incluídos como potenciais fatores a serem investigados no risco associado a aneuploidias [30].

**Síndrome de Edwards (SE)** - Caracterizada pela presença, total, parcial ou em mosaico do cromossoma 18. A trissomia total do cromossoma 18 está presente em cerca de 94% dos casos de SE. Contrariamente à Síndrome de Down, apresenta uma elevada taxa de mortalidade sendo que apenas cerca de 4% dos recém-nascidos sobrevivem ao primeiro ano de vida. Esta síndrome apresenta um conjunto de anomalias *major* e *minor* que se refletem na elevada mortalidade associada [32]. Na grande maioria dos casos o cromossoma 18 extra é de origem materna e resultado de um erro de segregação na meiose II, ou mitose pós-zigótica. Aquando de origem paterna são verificados erros pós-zigóticos. A SE está associada a IMA, apresentando um aumento de risco entre os 30 e os 45 anos, sendo que a partir desta idade o risco torna-se linear [33].

**Síndrome de Patau (SP)** – Caracterizada pela presença, total, parcial ou em mosaico do cromossoma 13. Apresenta uma elevada taxa de mortalidade neonatal e esperança de vida reduzida, normalmente semanas. Tem uma prevalência de aproximadamente 1 em cada 7000 nascimentos. Em situações de mosaicismo as características clínicas diferem de acordo com o grau de mosaicismo apresentado, podendo levar a uma esperança de vida mais ou menos longa [34].

### **Aneuploidia dos cromossomas sexuais**

**Síndrome de Klinefelter (SK)** - Na sua forma clássica, em 80% a 90% dos casos, é representada pela presença de um cromossoma X supranumerário em homens (figura 7). A SK é relatada em 1 a cada 600 nascimentos de homens e em aproximadamente 64% das vezes permanece por diagnosticar por toda a vida [35]. Mecanismos de não-disjunção em anafase mitótica, meiose I ou meiose II, estão na origem desta síndrome. Quando o cromossoma X extra é proveniente do lado materno, apresenta maior possibilidade de ter resultado de erros de segregação cromossômica em meiose I ou II. Quando o cromossoma X extra é proveniente do lado paterno, apenas poderá resultar de erros em meiose I, em meiose II os gametas resultantes traduzir-se-iam em XX ou YY, não sugestivo de síndrome de Klinefelter. Para além da forma clássica de SK poderão existir variantes desta síndrome, em que para além do cromossoma X supranumerário poderá existir também um cromossoma Y supranumerário (ex. 48,XXXYY ou 48,XXYY) ou mosaicos [36]. Na idade adulta, a maior preocupação é a fertilidade limitada e esterilidade [37].



Figura 7 | Cariograma de Síndrome de Klinefelter. Imagem cedida por CGM.

**Síndrome de Turner (ST)** - Anomalia cromossômica sexual mais comum em mulheres e considerada a única monossomia compatível com a vida. Esta síndrome caracteriza-se pela ausência completa ou parcial de um cromossoma sexual, resultando num cariótipo 45,X em 40% a 50% dos casos diagnosticados [38]. A não-disjunção meiótica está na sua origem e em 80% dos casos o cromossoma X presente é de origem materna. Nos restantes casos poderão ser de origem paterna ou corresponderem a uma perda pós-zigótica. Para além da sua forma clássica existem variantes mais complexas da ST como o mosaico, com uma linhagem celular normal e outra linhagem com monossomia sexual (15-25%), isocromossoma (20%), cromossoma em anel ou até presença de fragmentos do Y (10-12%) [38], [39]. As principais manifestações fenotípicas envolvem baixa estatura, pescoço alado e amenorreia primária com ausência de caracteres sexuais secundários. Estes doentes não apresentam indícios de défice intelectual ao longo da vida e são pessoas válidas e não-dependentes no dia-a-dia [38].

### 2.3.2 | Estruturais

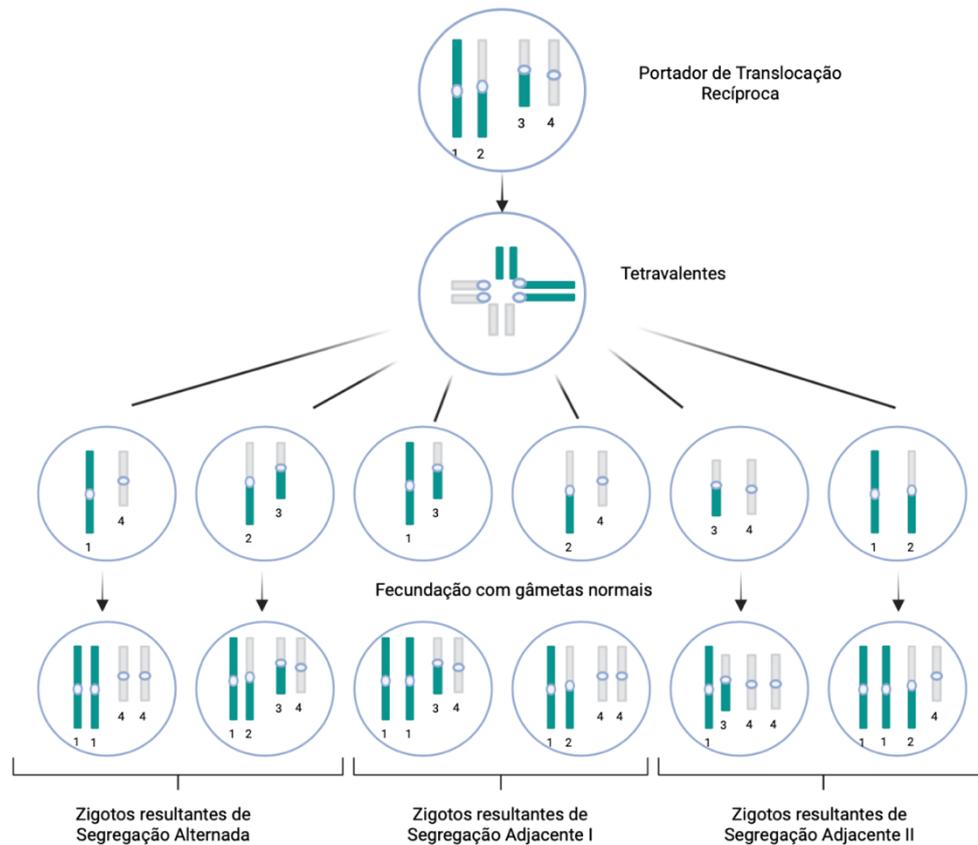
As alterações estruturais resultam de pontos de quebra cromossômicos com posterior perda ou rearranjo anormal dos segmentos cromossômicos. A recombinação homóloga alélica é um dos eventos celulares fundamentais tanto na segregação cromossômica durante a meiose, como para processos de reparação do DNA. No entanto, a recombinação não alélica, suscetível a qualquer parte do genoma, produz diferentes alterações na estrutura do genoma [40]. A célula está programada para detetar estes erros e atuar sobre eles, através de mecanismos de *checkpoint* ou através de senescência celular, impedindo que os mesmos sejam transmitidos às células-filhas. Quando tal não acontece, devido a envelhecimento celular ou a falhas no mecanismo de deteção, poderão ser originadas anomalias estruturais equilibradas como desequilibradas [19], [40].

O portador de uma anomalia estrutural equilibrada não apresenta alterações no conteúdo genético final mesmo que os segmentos cromossômicos tenham diferido de posição. O portador deste tipo de alterações, por norma, não apresenta manifestações fenotípicas significativas, no entanto, apresenta risco aumentado de descendência anormal uma vez que esta alteração pode interferir no processo meiótico. Contrariamente, as anomalias estruturais desequilibradas estão diretamente associadas a um balanço genético final aumentado/reduzido e, conseqüentemente, a um fenótipo anormal [41]. As anomalias estruturais podem ser herdadas ou podem ocorrer em eventos *de novo*. Estima-se que 75% a 80% das alterações estruturais clássicas são de origem paterna, em contraste com as trissomias que são maioritariamente de origem materna [19].

#### **Equilibradas**

**Translocação recíproca:** a translocação recíproca é a alteração cromossômica estrutural mais comum na espécie humana, encontrada em 1 em 600 recém-nascidos [42]. Consiste na quebra de segmentos cromossômicos não homólogos e mútua troca entre os mesmos, levando à formação de dois cromossomas reorganizados denominados cromossomas derivativos [43]. Indivíduos com translocação recíproca são, na sua maioria, fenotipicamente normais, quando não existe ganho ou perda de material genético na região do ponto de quebra. No entanto, este tipo de alteração pode interferir no processo meiótico e, conseqüentemente, na descendência destes portadores (figura 8), fazendo com

que infertilidade e perda recorrente de gravidez estejam significativamente associadas a estes portadores. No sexo masculino, translocações que envolvam o cromossoma X está propensa a interrupção completa da espermatogênese, devido à inativação incompleta do cromossoma X [44].



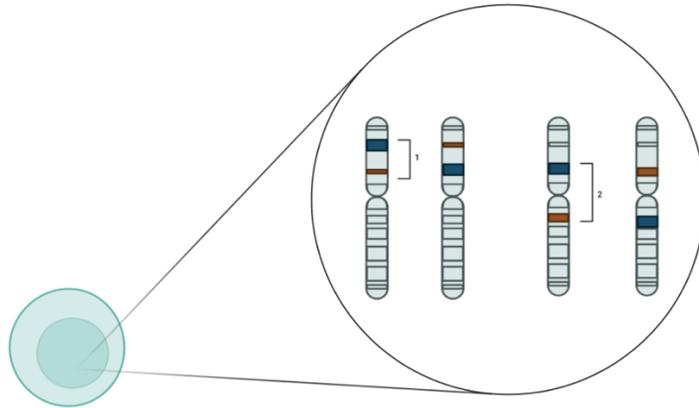
**Figura 8 | Translocação recíproca.** Representação dos zigotos resultantes dos diferentes tipos de segregação cromossômica. Segregação Alternada resulta em gametas normais e equilibrados. Segregação Adjacente I e Adjacente II resultam em gametas desequilibrados, com um cromossoma derivativo cada. Adaptado de [45]. Imagem criada em *Biorender*.

**Translocação Robertsoniana:** a translocação Robertsoniana ocorre quando dois cromossomas acrocêntricos se fundem perto do centrômero e apresenta uma frequência de 0.1% na população em geral, 1,1% em pacientes com perda gestacional recorrente e 3% em homens com infertilidade. Rearranjos que envolvam os cromossoma 13 e 14 ( $der(13;14)(q10;q10)$ ) são os mais comuns representando 75% das translocações

Robertsonianas [44]. O cromossoma resultante é um derivativo com a presença dos dois braços longos de cromossomas acrocêntricos. Apesar de um balanço final de 45 cromossomas o cariótipo é igualmente equilibrado. A perda dos braços curtos de cromossomas acrocêntricos será fenotipicamente neutra uma vez que, os braços curtos dos cinco pares de cromossomas acrocêntricos transportam múltiplas cópias de genes de RNA ribossômico (rRNA), não fazendo deste evento um evento deletário. No entanto, permanece o risco de produção de gâmetas desequilibrados. O risco de descendência desequilibrada varia de acordo com os cromossomas envolvidos na translocação, os pontos de quebra e o sexo do progenitor portador. As mulheres portadoras têm maior risco de transmitir a translocação à descendência afetada [46].

**Inserção:** As inserções cromossômicas podem ser de origem intercromossômica ou intracromossômica. A inserção intracromossômica ocorre quando um segmento de DNA é inserido num local não-homólogo dentro do mesmo cromossoma. As inserções intercromossômicas envolvem a passagem de material entre cromossomas não-homólogos. O segmento retirado de um cromossoma é inserido num cromossoma diferente, seja na sua orientação normal ou invertida. A incidência destas inserções é estimada em 1/80.000, sendo que cerca de 85% são herdadas [18]. As inserções intercromossômicas envolvem três quebras cromossômicas, duas no cromossoma de origem e uma no cromossoma destinatário. A segregação anormal num portador de inserção pode produzir descendentes com duplicação ou deleção do segmento inserido, bem como descendentes normais e portadores equilibrados. O risco médio de descendência anormal é elevado, até 50%, e o diagnóstico pré-natal é indicado para estes casos [18], [46].

**Inversão:** As inversões resultam de dois pontos de quebra cromossômica e posterior inversão em 180° do segmento resultante em relação à sua orientação normal. As inversões são divididas em dois tipos: pericêntricas e paracêntricas (figura 8). As inversões pericêntricas implicam que as duas quebras aconteçam nos dois braços do cromossoma (p e q), incluindo desta forma o centrómero. Nas inversões paracêntricas as duas quebras cromossômicas abrangem apenas um braço do cromossoma fazendo com que o centrómero não seja incluído na inversão do segmento [18].



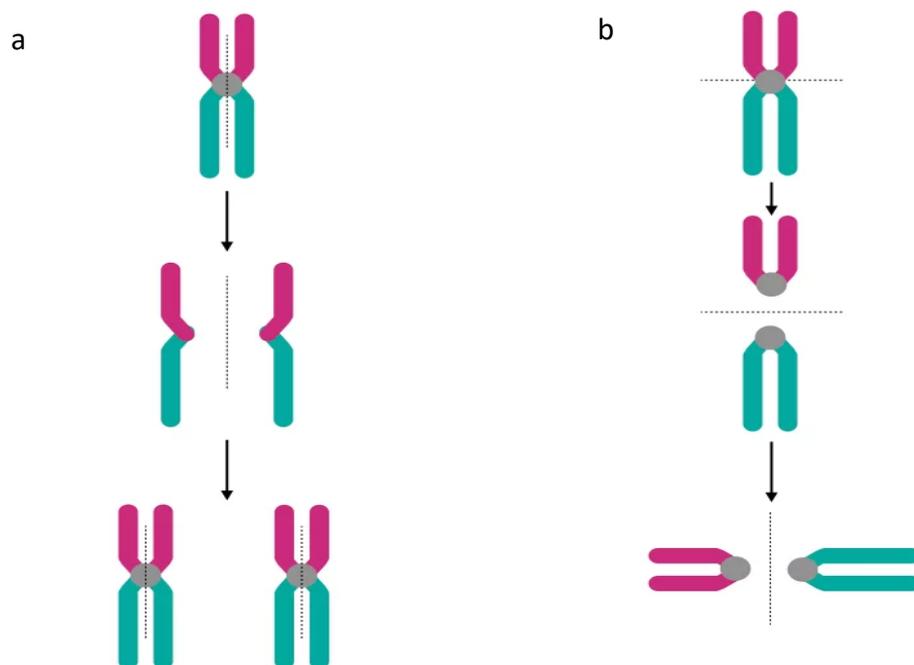
**Figura 9 | Representação esquemática dos diferentes tipos de inversão.** (1) Inversão paracêntrica, não inclui o centrômero (2) Inversão pericêntrica, inclui o centrômero. Imagem criada em *Biorender*.

As inversões são anomalias estruturais equilibradas pois não existe alteração de material genético final e não se prevêem alterações fenotípicas no portador [47]. A descendência de portadores de inversões pode ficar comprometida na medida em que: durante a meiose I o emparelhamento entre homólogos leva a um *loop* de inversão, na inversão paracêntrica os gametas formados geralmente apresentam uma cópia normal ou equilibrada do cromossoma e produtos *crossing-over* acêntricos ou dicêntricos (inviáveis). Na inversão pericêntrica os gametas formados podem ser normais, equilibrados ou desequilibrados. Se o cruzamento ocorrer dentro do *loop* de inversão então os gametas formados podem apresentar duplicações ou deleções do material que flanqueia o segmento invertido [18], [46]. As inversões podem ser *de novo* ou herdadas e as manifestações clínicas associadas a este tipo de anomalia estrutural dependem do ponto de quebra cromossômico e da presença, ou ausência, de um gene de expressividade afetado nesse mesmo local. Estas alterações estão diretamente relacionadas com abortos recorrentes ou nascimento de descendência com anomalias congênitas [47].

## Desequilibradas

**Deleção e duplicação:** As variações do genoma humano podem assumir diferentes formas, desde grandes anomalias cromossômicas a variações ao nível de resolução do nucleótido. As variações do número de cópias (CNVs) correspondem a alterações, como deleções e duplicações, de material genético que ocorrem no genoma humano [48]. Os mecanismos inerentes a CNVs são na sua maioria, erros durante a replicação do DNA que levam a troca desigual de material entre cromátides-irmãs. As deleções de material têm a prevalência de 1 em 7000 nascimentos e envolvem a perda de um segmento cromossômico. O portador de uma deleção é monossômico para a informação genética perdida e os progenitores devem ser alvo de estudo. As deleções podem ser denominadas terminais, quando envolvem uma quebra cromossômica, ou intersticiais, quando envolvem duas quebras cromossômicas. O fenótipo neste tipo de alteração estrutural está muitas vezes associado a indivíduos com atraso do desenvolvimento intelectual [49]. As duplicações podem ser apresentadas tanto em *tandem* como numa posição cromossômica diferente. Por norma, apresentam uma correlação genótipo-fenótipo menos severo do que as deleções [50].

**Isocromossomas:** Um isocromossoma é um cromossoma formado pela ausência de um dos braços e a duplicação em forma de imagem em espelho do restante braço. Os mecanismos subjacentes a estes fenómenos decorrem na meiose II por erros de segregação cromossômica. Os cromátídeos sofrem um processo de segregação transversal, em vez de longitudinal, resultando num cromossoma com duas cópias de um dos braços (figura 10) [19]. Um portador de isocromossoma com balanço cromossômico final de 46 cromossomas tem, portanto, uma única cópia do material genético de um dos braços dos cromossomas envolventes (monossomia parcial) e três cópias do material genético do outro braço de outro cromossoma (trissomia parcial). Este tipo de alteração estrutural ocorre mais frequentemente no cromossoma X em estado de mosaico [51].



**Figura 10 | Isocromossomas.** a) Segregação Longitudinal, formação de cromossomas normais; b) Segregação Transversal, formação de isocromossomas. Adaptado de [45].

**Marcador e anel:** Os cromossomas marcadores supranumerários (sSMCs) são referentes a qualquer material cromossómico supranumerário que não pode ser caracterizado por técnicas de citogenética convencional, como as bandas G. As anomalias são detetadas em preparações cromossómicas, frequentemente em mosaico. Estas anomalias estruturais são usualmente constituídas por heterocromatina centromérica e resultam de um ou dois braços cromossómicos, cerca de 70% dos casos são derivados de cromossomas acrocêntricos [52]. São detetados em diferentes formas, incluindo o anel, *centric minute* e duplicação. Os cromossomas em anel surgem quando duas quebras ocorrem num só cromossoma e as extremidades resultantes da quebra se fundem. Estes são raramente vistos e ocorrem tipicamente como eventos *de novo* [46]. Os mecanismos cromossómicos subjacentes aos sSMCs incluem trissomia e monossomia *rescue* e erros pós-zigóticos. Os sSMCs não são identificáveis por citogenética convencional, apenas técnicas moleculares permitem a caracterização destes cromossomas devido ao seu pequeno tamanho e poder de resolução das bandas G. A técnica molecular FISH auxilia na caracterização destes marcadores por meio de sondas centroméricas e de pintura cromossómica total [53].

## 2.4 | Nomenclatura

A passagem de informação e de dados entre a comunidade científica é de extrema importância tanto em áreas de investigação como no diagnóstico clínico. Desta forma é crucial que esta informação siga *guidelines* específicas e normas internacionalmente aceites para uma correta interpretação da mesma (Wan et al., 2017). O Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenómica Humana (ISCN) veio auxiliar essa comunicação através de um conjunto de normas universais na comunidade que ditam como os cariótipos devem ser escritos perante um resultado considerado normal ou com alterações. As normas descritas pelo ISCN são atualizadas a cada 4 anos, sendo que a última edição é referente ao ano 2020. O ISCN 2020 descreve que a nomenclatura deve reportar o número total de cromossomas, seguido do complemento sexual e a descrição de qualquer anomalia encontrada [54].

## 2.5 | Diagnóstico Pré-Natal

Os primeiros relatórios sobre os componentes químicos do líquido amniótico e o estabelecimento do número cromossómico humano exato, foram os grandes impulsionadores da nova era do diagnóstico. Anos mais tarde, com a associação das anomalias cromossómicas numéricas a fenótipos específicos e com a evolução dos métodos de colheita de amostra fetal rapidamente se expandiu a vertente do diagnóstico ao pré-natal. A otimização destes métodos - invasivos e não invasivos - e os avanços tecnológicos na citogenética e na biologia molecular, complementaram estes feitos e permitiram a ampliação do espectro de doenças genéticas possíveis de serem diagnosticadas [55].

As anomalias cromossómicas na gravidez são relativamente comuns, especialmente no início da gravidez. Estes fenómenos estão estimados em aproximadamente 50% dos abortos reconhecidos no primeiro trimestre, dois terços dos abortos espontâneos numa gravidez não reconhecida e em cerca de 5% dos nados-mortos. Sensivelmente 1 em 150 recém-nascidos apresenta algum tipo de anomalia cromossómica que resulta num fenótipo fetal ou neonatal anormal [19].

Os testes pré-natais envolvem um conjunto de procedimentos de rastreio e diagnóstico durante a gravidez, com o objetivo de detetar anomalias congénitas - estruturais, morfológicas, funcionais ou moleculares - que possam afetar o desenvolvimento do feto, tanto ao nascimento como numa fase mais tardia. O diagnóstico numa fase prematura da gravidez é fundamental pois torna possível a avaliação de risco de anomalias externas ou internas, esporádicas ou hereditárias, únicas ou múltiplas [56]. Desta forma, as consultas de aconselhamento genético são essenciais, pois permitem um estudo personalizado do casal, levando a intervenção médica precoce com orientação familiar sobre o prognóstico e eventual tratamento disponível, e ainda um acompanhamento obstétrico adaptado [57].

A necessidade de realização de diagnóstico pré-natal (DPN) é avaliada consoante a história clínica da grávida. O DPN é oferecido quando se verifica uma das seguintes condições: feto/filho anterior portador de cromossomopatia; progenitor portador de cromossomopatia equilibrada; marcadores ecográficos e rastreio bioquímico positivo; NIPT positivo; história familiar de cromossomopatia ou de doença ligada ao X; risco elevado de efeito teratogénico (infecioso, medicamentoso ou outro); idade materna avançada (> 35 anos); ansiedade materna [58].

Os resultados dos testes de diagnóstico citogenético são relevantes, pois permitem ao casal, em situações de resultado anormal, refletir a decisão de prosseguir uma gravidez ou não. Atualmente, a Lei Portuguesa (nº16/2007 de 17 de Abril) permite a interrupção médica de gravidez (IMG) até às 24 semanas de gestação, se o nascimento previsto virá a sofrer de forma incurável de grave doença ou malformação congénita. Pode também ser realizada em ocasiões excecionais em qualquer fase da gestação quando verificada inviabilidade fetal ou quando a saúde da progenitora estiver comprometida [59].

## **Invasivo**

**Biópsia das vilosidades coriônicas:** Realizada entre a 10<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> semanas, as vilosidades placentárias podem ser obtidas através do acesso transcervical ou transabdominal à placenta, sem interferir com o saco amniótico. As vilosidades são derivadas do trofoblasto, a parte extra-embriónica do blastocisto [60]. Em comparação com a amniocentese, este método providencia maior vantagem em relação à fase da gestação em que os resultados podem ser gerados. Os resultados disponíveis numa fase mais

precoce da gravidez, reduzem o período de incerteza e de ansiedade materna, permitindo que a interrupção, caso seja eleita, seja realizada no primeiro trimestre e em regime ambulatorio. O aumento da taxa de perda fetal devido à CVS é de aproximadamente 1%, para além do risco basal de 2% a 5% em qualquer gravidez de 7 a 12 semanas de gestação. A taxa de sucesso associada a esta técnica é semelhante à amniocentese, cerca de 99% de sucesso na deteção de anomalias cromossómicas [46].

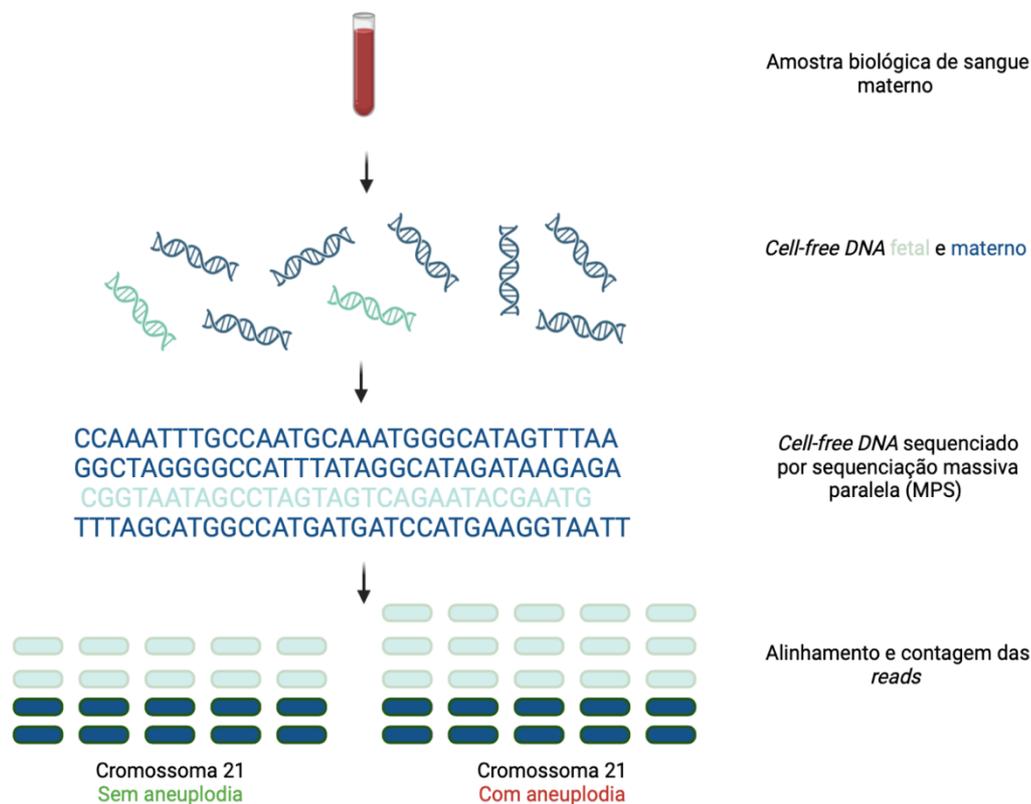
**Amniocentese:** Realizada entre a 15<sup>a</sup> e a 20<sup>a</sup> semana de gestação, a obtenção de amostra de líquido amniótico para DPN pode ser conseguida por meio da inserção transabdominal de uma agulha fina até ao saco amniótico, sob orientação ultrassonográfica contínua. A amniocentese pode ser igualmente realizada numa fase mais tardia da gravidez, no entanto, grande parte das células recolhidas já não se encontram viáveis para procedimentos de cultura e diagnóstico [61]. Este é um método de referências em diagnóstico pré-natal e apresenta elevada taxa de sucesso na deteção de anomalias através da análise por cariótipo. Atualmente, apesar da probabilidade de perda de gravidez por métodos DPN invasivos ser muito baixa, este não deixa de ser o maior risco associado a este método. A taxa de perda de gravidez está estimada em 0.1% a 0.3% nos procedimentos realizados por profissionais de saúde experientes [60].

**Cordocentese:** Realizada no segundo e terceiro trimestre de gravidez, a obtenção de amostras (percutâneas) de sangue do cordão umbilical pode ser conseguida por punção direta da veia umbilical perto da sua inserção placentária, com recurso a agulhas finas que são guiadas através de um ecógrafo. Este método é secundário à amniocentese e CVS e pode ser realizado em casos extraordinários em que nomeadamente: seja necessário a confirmação de resultados de mosaicismo, quando a amniocentese falha, quando é necessário um resultado de cariótipo urgente (gravidez à volta das 24 semanas) e quando há restrição de crescimento intra-uterino severo. A incidência de complicações relacionadas com o procedimento, incluindo hemorragia no local de punção do cordão umbilical e uma frequência cardíaca fetal anormal, variam de 5% a 30% [62].

## **Não invasivo**

Atualmente, o teste pré-natal não invasivo (NIPT) tem vindo a ser desenvolvido e aprimorado de maneira a reduzir os riscos de aborto espontâneo associados a métodos DPN. Com a contínua evolução das tecnologias moleculares ao longo dos anos, cada vez são mais NIPTs implementados, com elevada taxa de sucesso na deteção de cromossomopatias. Estes testes funcionam como testes de rastreio pré-natal e não são substitutos de DPN. Envolvem três grandes áreas da ciência tais como: Imagiologia, Bioquímica e a Genética Molecular.

Na genética molecular e genómica o maior avanço dos NIPTs foi a partir do *cell-free fetal DNA* (cffDNA), pequenos fragmentos de DNA que são libertados no plasma como resultado do *turnover* celular fisiológico (apoptose e necrose). Na mulher grávida, a partir da sétima semana de gestação, uma proporção do DNA livre é derivada da camada externa de trofoblasto celular da placenta, que normalmente reflete o genótipo fetal [63], [64]. Contudo, a maioria do cffDNA é de natureza fragmentada e de origem materna tornando-se por vezes difícil isolar uma fração fetal suficiente para análise e realização do teste, principalmente nas semanas mais precoces de gestação. Apesar desta limitação na deteção de anomalias fetais, foi recentemente demonstrado o estudo de cffDNA para o rastreio de aneuploidias fetais, com uma taxa de deteção de 99% para síndrome de Down e de <1% de falso-positivo, com utilização de tecnologias Next-Generation Sequencing (NGS) [65]. Atualmente, os NIPTs são aplicados para a determinação do sexo fetal, determinação do genótipo *RHD* fetal, aneuploidias e doenças monogénicas [66].



**Figura 11 | Sequenciação massiva paralela (MPS) na detecção de aneuploidia fetal.** A amostra de plasma materno é obtida. O DNA fetal (verde) circula entre uma elevada quantidade de DNA materno (azul). Sequenciação de milhões de *reads* do genoma fetal e materno. Alinhamento e contagem das *reads* em comparação com uma amostra euploide de referência. Imagem criada em *Biorender*.

## 2.6 | Diagnóstico Pós-Natal

O diagnóstico citogenético pós-natal refere-se à realização de testes genéticos depois do nascimento do indivíduo. O sangue periférico é o tipo de amostra mais utilizado no laboratório. A biópsia de pele também é usada, principalmente em casos de suspeita de mosaicismos celulares. As amostras da mucosa bucal são um meio para análise cromossômica em células em interfase meio da técnica FISH possibilitando um modo de colheita menos invasivo e mais simples [67]. A realização de estudo citogenético pós-natal inclui algumas das seguintes indicações clínicas [68]:

- **História familiar** de: cromossomopatia, atraso cognitivo ou psicomotor, anomalias congénitas e malformações *major* de origem genética;
- **Casais** com: cromossomopatia; filho anterior com cromossomopatia; infertilidade idiopática; azoospermia ou oligospermia severa;
- **Pacientes** com: dimorfismos ou fenotipicamente anormais; atraso mental ou atraso do desenvolvimento psicomotor; anomalias congénitas múltiplas; doença recessiva ligada ao X em paciente do sexo feminino; alterações de crescimento; malformações *major*; amenorreia primária ou secundária;

A importância do estudo citogenético pós-natal prende-se com a possibilidade de fornecer ao paciente a identificação de anomalias cromossómicas subjacentes à presença de características clínicas sugestivas de doença genética. Consoante os resultados do teste de diagnóstico é possível intervir de forma precoce e direcionada ao alvo associado. A identificação das causas latentes permite a orientação de um planeamento familiar personalizado em consultas de aconselhamento genético, em situações de infertilidade. Atua, de igual forma, no prognóstico e tratamento em doentes oncológicos e permite a deteção de mosaicismo celular que pode estar na base de muitas doenças de manifestação tardia [69].

## 2.7 | Elaboração do Relatório Clínico

A elaboração do relatório clínico é um passo crítico e de extrema importância num laboratório de citogenética clínica, visto ser o meio pela qual a informação recolhida em laboratório é transmitida ao médico e por sua vez ao paciente em estudo. Desta forma, existem *guidelines* universais recomendadas pela *American College of Medical Genetics* (ACMG) que devem ser aplicadas na construção do mesmo.

O relatório clínico deve ser o mais *standardizado*, inequívoco e informativo possível, de maneira a facilitar a compreensão e interpretação por parte de um não-especialista na área da citogenética. Relativamente aos dados identificativos, deverá incluir elementos como: nome e endereço do laboratório, nome completo do paciente, número interno da amostra, data de nascimento do paciente, nome do médico ou pessoa

autorizada a requisitar o teste, tipo de amostra, data de receção em laboratório, data de emissão do relatório, indicação clínica e testes solicitados. Os testes anteriores deverão estar documentados de forma a evitar repetições e reconhecer possíveis alterações previamente detetadas. Os resultados deverão ser descritos de forma clara e emitidos de acordo com o ISCN em vigor. No caso da citogenética, o número de células contadas, o nível de resolução utilizada e o tipo de bandagem deverão ser incluídos. Se necessário recorrer à literatura, mais atualizada possível, para relacionar os resultados obtidos com a informação clínica fornecida. Recomendações também poderão ser incorporadas, como realização de testes complementares ou DPN. Em caso de resultado alterado, imperativo encaminhar para uma consulta de genética. Por fim, a assinatura de um profissional qualificado [19].

No serviço de Citogenética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães (CGMJM), todos os resultados são executados e validados por duas profissionais independentes que emitem o relatório que segue para o médico, com base nas *guidelines* acima descritas.

## 3 | Citogenética Molecular

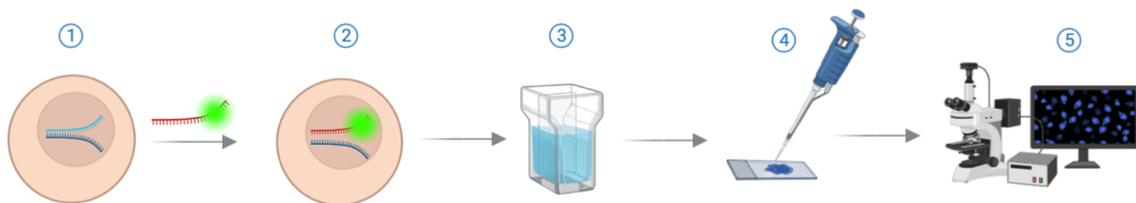
### 3.1 | Fluorescence *in situ* Hybridization

Os avanços na biologia molecular e genética molecular abriram novos caminhos através do desenvolvimento de ferramentas no apoio ao diagnóstico genético. A confluência da citogenética com a molecular foi desenvolvida com o objetivo de colmatar o baixo limite de resolução no estudo por cariótipo e ainda incluir o estudo em núcleos interfásicos. Esta vertente da citogenética, abrange técnicas que permitem a deteção de alterações cromossómicas submicroscópicas [70].

A *Fluorescence in situ Hybridization*, FISH, é uma técnica simples com múltiplos fins, tanto no diagnóstico como na investigação. Utiliza um princípio claro que permite detetar uma vasta gama de alterações cromossómicas numéricas e estruturais, equilibradas e desequilibradas, com um maior grau de resolução relativamente ao cariótipo. Permite obter informação a nível molecular e celular em simultâneo, através da visualização de sequências específicas no seu ambiente celular e cromossómico [70]. Além de células em metafase, utiliza também células em interfase ou tecidos morfológicamente preservados e permite a obtenção de resultados em apenas dois dias. Como qualquer outra técnica laboratorial, apresenta limitações. A deteção de segmentos de DNA duplicados em *tandem*, é uma limitação da técnica FISH. Embora a maior limitação se prenda com o facto de ser uma técnica dirigida a um alvo específico, pelo que, não deteta outras alterações estruturais desconhecidas que possam existir no mesmo estudo [71].

## Princípio da técnica

Reside na utilização de sondas curtas de oligonucleótidos (18 a 25 bp) complementares à sequência de DNA-alvo. As sondas são marcadas com fluorocromos que lhes confere a fluorescência necessária no momento de detecção [71]. A amostra com o DNA-alvo é fixada numa lâmina e após a aplicação da sonda marcada, são ambas desnaturadas e hibridadas no local, *in situ*. A lâmina de experiência percorre uma etapa de lavagens por soluções salinas (SSC) que permitem remover o excesso de resíduos e de sonda não hibridada. Para a detecção do sinal é feito o contraste com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). O DAPI é um contrastante, utilizado como coloração nuclear para células em cultura ou tecido. O DAPI liga-se a regiões de DNA ricas em AT com cor de contraste diferente da fluorescência, permitindo assim a detecção dos sinais de hibridação [72]. Por fim, a análise do sinal é feita em sistemas *Leica Biosystems* próprios de microscopia de fluorescência (figura 9) (Chrzanowska et al., 2020).



**Figura 12 | Principais etapas da técnica de FISH.** (1) Desnaturação do DNA-alvo e da sonda; (2) Hibridação da sonda marcada com fluorocromo; (3) Lavagens Pós-Hibridação; (4) Contraste com DAPI; (5) Análise cromossômica. Imagem criada em *Biorender*.

## Tipos de sondas

**Sondas de sequência única** - São utilizadas na detecção de um *locus* específico e originadas por meio de clonagem molecular. Incluem a detecção de deleções, duplicações, translocações, trissomias, monossomias, inversões, e outras anomalias. São frequentemente utilizadas no diagnóstico de diversas síndromes de microdeleção. Se a região de DNA alvo estiver ausente, então a sonda não se ligará e não haverá sinal

fluorescente nessa região, indicativo da microdeleção. Podem ser sondas do tipo fusão ou de dupla cor, utilizadas também em estudos de oncologia/hematologia [19], [70].

**Sondas de DNA alfa-satélite**- Sondas de sequências repetitivas marcam regiões heterocromáticas dos cromossomas, sequências curtas de DNA altamente repetitivo, como os centrômeros. Podem auxiliar na contagem em núcleos interfásicos de cromossomas específicos ou na identificação de cromossomas marcadores resultando num sinal forte e facilmente visível. Para além das regiões pericentroméricas, o DNA satélite é também específico para as regiões qh dos cromossomas 1, 9, e 16 e para os braços curtos dos cromossomas acrocêntricos e região Yq distal [19], [70].

**Sondas de pintura cromossômica** – Sondas obtidas por meio de citometria de fluxo ou microdissecação de bandas. Estas sondas contêm sequências únicas e repetitivas de um cromossoma inteiro. Permite que os 23 pares sejam pintados simultaneamente e detetados numa única lâmina. Permitem identificar visualmente a presença de alterações estruturais como translocações, deleções ou duplicações e geralmente são usadas em análise metafásica, apresentando uma fluorescência de sinal moderado a forte [70], [73]. As sondas de pintura são também utilizadas em *Multicolor FISH* (M-FISH) e *Spectral Karyotyping* (SKY) [70].

## 4 | Genómica

### 4.1 | Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – MLPA

Uma resolução e detecção mais detalhada das múltiplas variações no número de cópias do genoma humano foi possível fruto dos longos anos de investigação no campo da genómica. O *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), desenvolvido e patenteado pela entidade MRC-Holland® em 2002 e permite a análise de vários *loci* do genoma em simultâneo. Este método semiquantitativo é baseado na técnica de PCR e permite o estudo direcionado de variações no número de cópias (CNVs) do genoma, tais como deleção ou duplicação do material genético [74].

A técnica de MLPA recorre à utilização de quantidades mínimas de DNA (50 a 200ng) para amplificação de até 55 alvos moleculares numa única reação (*multiplex*) e permite detetar pequenas alterações ao nível de um único exão [75]. Não é necessária a realização de culturas celulares para a sua aplicação, contribuindo assim para uma execução rápida e resultados em apenas dois dias. No entanto, é uma técnica que não permite a detecção de rearranjos equilibrados, assim como não deteta alterações de ploidia, mosaicismo de baixo grau e apresenta um elevado grau de sensibilidade a contaminação por inibidores de PCR [76]. Esta técnica é, nos dias de hoje, uma ferramenta utilizada nos laboratórios de diagnóstico na detecção de aneuploidias, síndromes comuns de microdeleção, alterações subteloméricas e identificação de cromossomas marcadores, tanto a partir de amostras de pré-natal (produtos de abortamento) como de pós-natal (sangue periférico). Os resultados obtidos devem ser confirmados por outras técnicas moleculares, como por exemplo a FISH [69], [76].

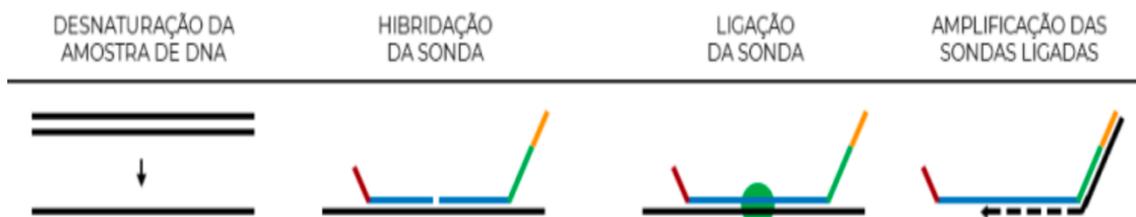
#### Princípio da Técnica

A técnica semiquantitativa de MLPA utiliza duas hemi-sondas de oligonucleótidos que, por complementaridade, se ligam à sequência de DNA-alvo. Uma delas sintética e outra derivada do bacteriófago M13 que contém a sequência *stuffer* incluída (figura 10). A sequência *stuffer* vai auxiliar na detecção e identificação permitindo variar os tamanhos para cada sonda específica de região [77].



**Figura 13 | Representação da sequência *Stuffer* derivada de bacteriófago M13.** A sequência *stuffer* apresenta diferentes tamanhos para os diferentes tipos de sondas, de forma a que seja possível distinguir os fragmentos no momento de análise. Adaptado de [78]. Imagem criada em *Biorender*.

O MLPA tem a peculiaridade de apenas amplificar as sondas ligadas, ao invés da amplificação direta da sequência de DNA de interesse, descrita em muitas outras técnicas. Após a ligação, por meio da ligase, de ambos os oligonucleótidos num único segmento de sonda, estas são amplificadas por PCR. A eletroforese capilar é empregue para separar e quantificar os produtos da reação PCR, que são por fim analisados por meio de um gráfico de picos, o eletroferograma [79]. De realçar que, a técnica de MLPA é relativa, o que indica que a análise apenas será bem-sucedida quando comparada com os resultados de uma amostra controlo (MRC Holland, 2019). Atualmente mais de 300 painéis de sondas de MLPA para diferentes alvos genéticos já se encontram comercialmente disponíveis, permitindo assim uma maior abrangência na detecção de alvos sugestivos de síndromes patológicas [69].



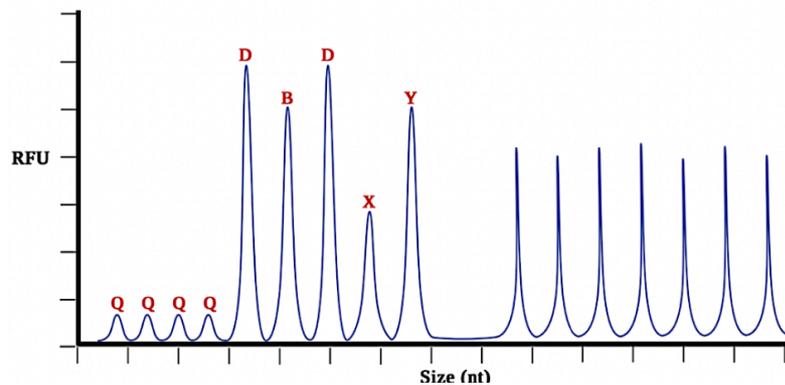
**Figura 14 | Representação esquemática das principais etapas da técnica de MLPA.** Adaptado de [78].

Na análise, a diminuição do número de cópias de uma ou mais sequências de DNA-alvo é visível como uma diminuição relativa da altura do pico enquanto um

aumento da altura relativa do pico reflete um aumento do número de cópias. Os resultados do eletroferograma são interpretados em função do rácio de cada sonda, considerando-se os valores: **0,5 (deleção); 1 (normal); 1,5 (duplicação)**.

## Painéis de sondas

O MLPA recorre a um vasto conjunto de painéis de sondas comerciais para o estudo de alterações no número de cópias de diversas síndromes, todos eles possuem um conjunto de fragmentos de controlo de qualidade dos resultados obtidos durante o ensaio, de forma a minimizar os erros de análise (Figura 11).



**Figura 15 | Representação gráfica dos fragmentos de controlo de qualidade presentes nos painéis de MLPA.** De forma a obter resultados válidos, é necessária a quantificação e interpretação inicial do tamanho destes picos. Caso haja alterações de tamanho não justificáveis é necessário a repetição da técnica de MLPA. Adaptado de [78].

Se os picos apresentados não corresponderem ao tamanho referência respetivo de cada um destes fragmentos significa que a veracidade dos resultados obtidos pode estar comprometida levando a resultados falsos positivos ou falsos negativos. 1) *Q-fragments* permitem avaliar a quantidade de DNA utilizado na técnica; 2) *Benchmark* necessários para comparar a qualidade com outros fragmentos de controlo; 3) *D-fragments* permitem avaliar a eficácia dos níveis de desnaturação; 4) fragmentos X e Y utilizados como controlos dos cromossomas sexuais (MRC Holland, 2019).

## **CAPÍTULO II | Objetivos**

---

O presente relatório foi efetuado na Unidade de Citogenética do Centro de Genética Médica (CGM) Doutor Jacinto Magalhães, Centro Hospitalar Universitário de Santo António, no âmbito da unidade curricular estágio para a obtenção do grau de Mestre em Genética Clínica Laboratorial pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

O CGM é dividido em quatro unidades principais: Citogenética, Genética Molecular, Bioquímica Genética e Genética Médica. O Serviço de Citogenética, localizado no terceiro piso do CGM, exerce a sua atividade no ensino pré-graduado e pós-graduado, no diagnóstico clínico e na investigação científica. Atua em apoio à comunidade, onde dão entrada amostras biológicas provenientes de diversos centros hospitalares e clínicas privadas de Portugal continental e ilhas. Este serviço preza a qualidade pedagógica, técnica e científica, apostando de forma notória na formação e profissionalismo daqueles que o formam. Atualmente, a unidade de citogenética do CGM está ao encargo da Doutora Natália Olívia-Teles.

## **1 | Diagnóstico Citogenético**

O principal objetivo deste estágio consistiu na obtenção de experiência em laboratório de Citogenética pela aplicação e realização autónoma de técnicas de Citogenética convencional e Molecular em diversos tipos de amostras biológicas de diagnóstico pré-natal e pós-natal.

- ✓ Realização de culturas celulares de curto e longo prazo, sincronização, manipulação, espalhamento e técnicas de bandagem (G e C) e coloração AgNOR;
- ✓ Identificação de cromossomas e organização de kariogramas;
- ✓ Realização de técnicas de Citogenética Molecular: FISH;
- ✓ Realização de técnicas genómicas: MLPA;
- ✓ Extração e quantificação de DNA;
- ✓ Análise e discussão de resultados com a restante equipa;

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

O segundo grande objetivo deste estágio prendeu-se com a aquisição de métodos de rotina em meio laboratorial, para maior poder de adaptação num futuro emprego como profissional da citogenética.

- ✓ Cooperação no setor de criopreservação de amostras biológicas;
- ✓ Preparação de reagentes;
- ✓ Submissão de posters científicos e assiduidade em seminários da UMIB;
- ✓ Colaboração na Mostra Universidade do Porto 2023;
- ✓ Integração de novos estagiários na rotina do laboratório;

## **3 | Elaboração do relatório de estágio**

Por fim, o último objetivo reside no culminar de todos os objetivos descritos num documento escrito, o relatório de estágio, com recurso a referências bibliográficas, imagens e tabelas para melhor perceção de tudo o que foi realizado durante nove meses.

## CAPÍTULO III | Materiais e Métodos

---

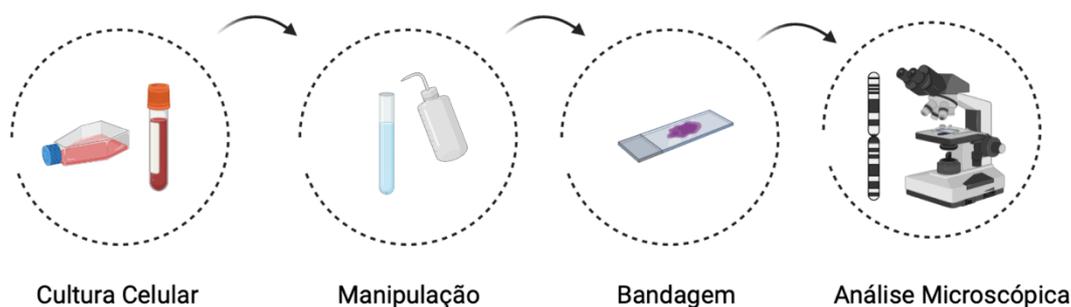
## **5 | Registo das amostras biológicas**

A fase pré-analítica é a primeira fase de todo o processo que antecede a análise laboratorial. Tem início na recolha das amostras biológicas que dão entrada no CGM e consoante prescrição médica seguem para os devidos departamentos. Inicialmente é realizado o registo do utente no sistema informático com dados pessoais do próprio e informações adicionais que podem ser relevantes na interpretação dos resultados e são emitidas etiquetas para a identificação dos tubos de amostra.

O material biológico que dá entrada no Departamento de Citogenética do CGM compreende três principais estudos - cariótipo, FISH e MLPA - e pode ser categorizado em dois setores: pré-natal e pós-natal. As amostras biológicas referentes ao pré-natal englobam: líquidos amnióticos, vilosidades coriônicas, tecidos placentários, biópsia de peles fetais e produtos de abortamento. As amostras biológicas referentes ao pós-natal englobam: sangue periférico, biópsia de peles ou mucosa bucal. As amostras dão entrada em tubos de armazenamento próprios consoante o tipo de amostra e tipo de técnica a realizar. Por norma, nos tubos de sangue periférico para realização de técnicas citogenéticas são utilizados anticoagulantes como heparina sódica ou lítio e em tubos com requisição de técnicas moleculares/genómicas é utilizado o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) [80]. Dada a correta entrada do material biológico, a amostra está pronta para prosseguir para a fase analítica.

## **6 | Citogenética Convencional**

A principal base de estudo da citogenética é o cromossoma humano. Os cromossomas apenas são visíveis ao microscópio ótico quando se encontram em metafase, fase de maior condensação cromossómica [81]. Para tal, é necessário criar em laboratório as condições ótimas para a célula dividir, através de estimulação e ambiente controlado, a fim de obtenção dos mesmos. O processo laboratorial para a obtenção de cromossomas metafásicos compreende as seguintes etapas:



**Figura 16 | Principais etapas laboratoriais em citogenética convencional.** Imagem criada em *Biorender*.

## 6.1 | Cultura celular

A citogenética convencional requer células em divisão ativa conseguidas através de técnicas de culturas celulares que permitem fornecer *in vitro* as condições idênticas às *in vivo* [82]. Os meios de cultura aquosos são a ferramenta primária para que tal aconteça. Estas soluções salinas de mistura de sais e glucose, são enriquecidas com fontes básicas de crescimento e divisão celular: L-Glutamina (aminoácido essencial), fitohemaglutinina (estimulador mitótico de linfócitos), antibióticos (penicilina/ estreptomicina), soro vitelo fetal (nutrientes e fatores de crescimento) e as condições físicas fundamentais criadas em laboratório de temperatura e humidade [82], [83].

A primeira fase laboratorial consiste na incubação da amostra nos meios de cultura e é realizada em câmaras de fluxo laminar de uso exclusivo, em condições rigorosas de assepsia. O CGM segue as *guidelines* definidas pela European Cytogenetics Association e no laboratório utiliza meios de cultura distintos ou de diferentes lotes comerciais, e se possível manipulação por dois operadores independentes, com objetivo de minimizar riscos de contaminação, erro de cultura ou erro humano.

### 6.1.1 | Culturas de curto prazo

O sangue periférico é o tecido mais utilizado para o diagnóstico de anomalias cromossômicas, uma vez que é um tecido de fácil obtido através de uma simples punção venosa e permite resultados rápidos e relativamente pouco dispendiosos. Os linfócitos

são as únicas células do sangue que interessam aos citogeneticistas, uma vez que são de fácil divisão sob condições apropriadas e além de que, tanto os eritrócitos como as plaquetas são destituídas de núcleo [84].

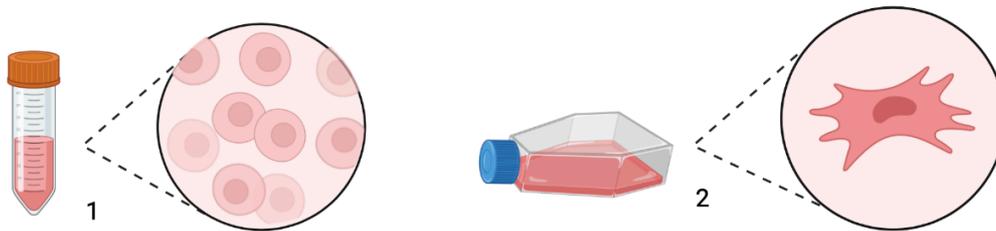
A cultura de sangue periférico é feita em tubos estéreis com suspensão celular em meios de cultura específicos para linfócitos e em sistemas fechados. Os sistemas fechados caracterizam-se pela ausência de trocas gasosas com a atmosfera envolvente, não sendo, portanto, necessário o recurso a estufas de CO<sub>2</sub>. As culturas celulares de curto prazo têm como vantagem o crescimento de material celular em larga escala e a diminuta probabilidade de contaminação microbiana devido ao tipo de sistema utilizado [83], [85].

No CGM são utilizados dois meios de cultura comercialmente disponíveis, *Karyotyping*® e *Synchroset*®. Após sementeira da amostra em meio próprio, colocam-se os tubos numa estufa a 37°C por um período de 48h a 72h. Os tubos são colocados na estufa com inclinação aproximada de 35 graus para proporcionar um aumento da superfície de atuação celular.

### **6.1.2 | Culturas de longo prazo**

As culturas celulares de longo prazo requerem a capacidade proliferativa de células em monocamada e são utilizadas em amostras de líquidos amnióticos e de tecidos sólidos, a partir de fibroblastos e células epiteliais [86]. Este tipo de cultura é realizado em sistemas abertos através de caixas de cultura que permitem a adesão das células à sua matriz interna. A cultura de longo prazo permite o estudo do comportamento da célula em ambiente semelhante ao do seu tecido de origem [85], [86].

As amostras de tecidos sólidos devem ser desagregadas antes da sua sementeira e tratadas enzimaticamente com colagenase ou tripsina. Os líquidos amnióticos são previamente centrifugados e as amostras de vilosidades coriônicas são tratada à lupa com auxílio de agulhas estéreis, para remoção cuidadosa de resíduos maternos excedentários. No CGM é utilizado o meio *BioAMF*® para este tipo de cultura, e o crescimento celular é acompanhado em microscópio invertido durante todo o período de cultura. O meio é mudado frequentemente para facilitar o crescimento celular. Após a obtenção de um número significativo de células aderidas faz-se a ressuspensão celular com tratamento com tripsina e o meio é recolhido para manipulação, subcultura ou criopreservação.



**Figura 17 | Modelos ilustrativos de diferentes tipos de culturas celulares.** 1) Cultura celular de curto prazo em tubo, células em suspensão; 2) Cultura celular de longo prazo em caixa, células em adesão. Ilustração criada em *Biorender*.

## 6.2 | Manipulação

A manipulação permite a obtenção de células em metafase para que seja possível a análise dos cromossomas ao microscópio. O processo de manipulação é semelhante entre as diferentes amostras biológicas e consiste na sincronização celular, tratamento hipotónico, fixação e espalhamento em lâmina.

## 6.3 | Sincronização

A primeira etapa de sincronização dos linfócitos abrange a incorporação de timidina que vai inibir a estimulação celular, de modo que as células interrompam o ciclo na fase S [84]. São adicionados 100µL de timidina a todos os tubos com meio *Karyotiping*<sup>®</sup>. Aos tubos com meio *Synchroset*<sup>®</sup> é adicionada solução A, análogo da timidina. Após adição os tubos são incubados na estufa a 37°C durante um período de 16 horas.

No início do dia seguinte procede-se à adição de deoxicidina-2 que permite a retoma das células no ciclo celular por desbloqueio do ciclo em fase S [87]. São adicionados 100µL de deoxicidina-2 a todos os tubos com meio *Karyotiping*<sup>®</sup>. Aos tubos com meio *Synchroset*<sup>®</sup> é adicionada solução B, análogo da deoxicidina-2. Após adição os tubos são incubados na estufa a 37°C durante 4 horas.

A solução Colcemide<sup>®</sup> é adicionada às culturas celulares para que ocorra um bloqueio da mitose em metafase [84]. A colcemide liga-se à tubulina e atua como um

inibidor mitótico impedindo que as cromátides-irmãs se separem em anafase. Um tratamento prolongado aumentará o índice mitótico, porém um tratamento demasiado prolongado levará a que haja uma fração mais elevada de células com cromossomas condensados. O tempo ótimo em colcemide é crucial para um comprimento cromossômico adequado [88]. Na cultura de linfócitos, os cromossomas são expostos a esta solução na estufa a 37°C durante um período de 7 minutos.

## 6.4 | Choque hipotónico

O tratamento hipotónico é o passo realizado após a atuação da Colcemide®. Este passo é executado por meio de uma solução salina, cloreto de potássio (KCl), que levará a turgescência da célula, essencial para o correto espalhamento da amostra numa fase posterior. O KCl apresenta uma concentração inferior à concentração do citoplasma celular, permitindo que por fenómenos de osmose haja a entrada de água na célula, aumentando assim o seu volume [89]. O tempo de ação do KCl sobre a amostra é crucial, tempo a mais poderá levar a lise celular e perda de material. No CGM o tempo ótimo de atuação do KCl na cultura de linfócitos, é calculado em 15 minutos na estufa a 37°C e posterior centrifugação.

## 6.5 | Fixação

Na fixação é utilizada a solução de *Carnoy* na proporção de 3:1, três partes de metanol para uma parte de ácido acético glacial [89]. Nos líquidos amnióticos a concentração difere para uma proporção de 2:1 de solução *Carnoy*. O processo de fixação das amostras tem como principal objetivo provocar a paragem da ação hipotónica por remoção de água das células, desnaturação e lavagem de todos os organelos celulares não necessários à preparação cromossômica final [88], [89]. No laboratório do CGM são efetuadas quatro lavagens com fixador intercaladas com centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. A solução de *Carnoy* deve ser sempre preparada de fresco e aplicada lentamente sob agitação contínua do *vortex* durante as primeiras duas lavagens. Caso contrário, poderão ser formados coágulos no fundo do tubo, indicativos de perda de material e maus resultados.

## 6.6 | Espalhamento

Por fim, na última etapa de manipulação é realizado o espalhamento. O espalhamento consiste na colocação da amostra tratada em lâminas de análise. Existem diversas técnicas de espalhamento nos laboratórios de citogenética, mas o princípio subjacente é o mesmo. As células, previamente túrgidas e frágeis, quando em contacto com a lâmina vão permitir a evaporação gradual do fixador. Este processo levará a que haja uma pressão acrescida da célula contra a lâmina, levando a lise celular que favorecerá o espalhamento dos cromossomas [88]. Assim, com este passo, são esperados um grande número de metafases, com cromossomas bem individualizados e não sobrepostos. O espalhamento é realizado num compartimento com condições ideais de temperatura (20°C-25°C) e de humidade (50%-60%) importantes para uma preparação cromossómica desprovida de citoplasma, ruído de fundo e dispersão alongada dos cromossomas. As lâminas são previamente limpas com álcool 96% para facilitar a adesão celular. São realizados dois espalhamentos por lâmina e colocadas em placa pré-aquecida a 50°C. Por fim, as preparações cromossómicas são incubadas *overnight* em estufas a 60°C permitindo aos cromossomas envelhecerem antes da aplicação das técnicas de bandagem e adquirirem a robustez necessária para os processos de coloração seguintes.

## 6.7 | Bandagem

Os cromossomas são analisados em metafase através de um padrão de bandas claras intercaladas com bandas escuras em todo o seu comprimento. Existem diversas metodologias de bandagem cromossómica de acordo com a região de interesse e estudo a ser realizado.

A bandagem GTL é o mais comum em laboratórios de citogenética clínica por constituir um método simples que através da bandagem cromossómica divide o seu conteúdo genético em bandas claras e bandas escuras. Através da ação da enzima proteolítica tripsina os cromossomas vão ser digeridos por desnaturação das proteínas envolvidas na formação da cromatina, permitindo que o corante *Leishman* atue sobre o DNA [89]. O tempo de tripsina é o passo crucial nas técnicas de bandas G, uma vez que está intimamente relacionado com a qualidade cromossómica obtida para análise

posterior. Cromossomas com pouco tempo de tripsina apresentam um formato comprido e escuro, não identificáveis de forma clara ao microscópio. Cromossomas com tempo a mais de tripsina apresentam uma forma degradada e translúcida. O tempo de tripsina compreende os milissegundos e é interrompido pela ação do tampão fosfato pH 6.8. Posteriormente é realizada a coloração com corante *Leishman* durante 4 minutos por precipitação horizontal, seguida de um curto período de secagem. Assim, as lâminas estão prontas para serem analisadas.



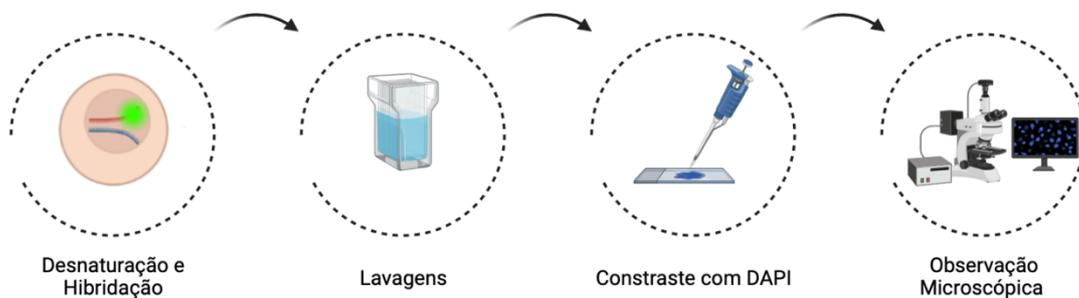
**Figura 18 | Etapas da bandagem GTL.** Preparação da solução corante: *Leishman* e tampão *Gurr* na proporção de 1:4. Lâminas posicionadas no suporte para coloração por precipitação horizontal. Imagens captadas pelo autor.

## 6.8 | Análise dos resultados

As lâminas são analisadas num microscópio de campo claro e as metafases captadas pelo sistema de análise de imagem computadorizado, *Cytovision*. Após análise e contagem de metafases, em que o número de células contadas depende da indicação clínica, são captadas 5 metafases e os cromossomas são organizados em cariógramas.

## 7 | Citogenética Molecular

A técnica FISH permite a análise em interfase ou cromossomas para detecção de alterações numéricas e estruturais e é realizada através de diferentes etapas. Os procedimentos e tempos seguidos variam de acordo com o tipo de sonda a ser utilizada, mas na sua generalidade compreendem os seguintes passos: espalhamento, desnaturação e hibridação, lavagens pós-hibridação, contraste com DAPI e análise em microscopia de fluorescência.



**Figura 19 | Principais etapas da técnica de FISH.** (1) Desnaturação e Hibridação; (2) Lavagens Pós-Hibridação; (3) Contraste com DAPI; (4) Observação microscópica. Ilustração criada em *Biorender*.

### 7.1 | Espalhamento

O espalhamento é realizado em lâmina de vidro, previamente limpa com metanol, e logo de seguida observado ao microscópio para avaliar a existência e qualidade do material cromossômico. A presença de metafases bem definidas e individualizadas vai influenciar a hibridação da sonda com o DNA alvo e, conseqüentemente, a qualidade do sinal de hibridação [71]. Após o espalhamento é realizada a desidratação da amostra através da passagem sucessiva em soluções com gradiente crescente de etanol (70%, 85% e 100%) à temperatura ambiente de forma a que haja maior fixação da amostra e uma melhor morfologia cromossômica no final do ensaio. Posteriormente, as lâminas são colocadas a secar ao ar.

## 7.2 | Sonda

Para a detecção do DNA alvo em microscopia de fluorescência é necessário o recurso a sondas fluorescentes marcadas com fluorocromos. Neste passo é fundamental o cuidado acrescido à exposição luminosa, visto que as mesmas são fotossensíveis [71].

**Tabela 1 | Sondas de sequência única do kit *CytoCell*® e respectiva região de detecção, utilizadas no CGM.**

<b>Estudo</b>	<b>Região</b>
DiGeorge	22q11.2
Neurofibromatose Tipo I	17q11.2
Gene <i>SRY</i>	Yp11.31
Gene <i>SHOX</i>	Xp22.33/Yp11.2
Prader Willi / Angelman	15q11.2
Charge	8q12.1-8q12.2
Williams-Beuren	7q11.23
Cri-Du-Chat	5p15.2
Monossomia 1p36	1p36.33
Rubinstein-Taybi	16p13.3
Smith-Magenis e Miller-Dieker	17p11.2/17p13.3

Foram também utilizadas sondas de sequência repetitiva para detecção de regiões pericentroméricas e sondas de sequência única para a detecção de regiões subteloméricas. Sondas de região pericentromérica requerem a *mix* prévia com solução de hibridação, também fornecida pelo *Kit CytoCell*®. As sondas são conservadas no congelador a -20°C e descongeladas momentos antes da sua utilização. Antes da sua aplicação sobre a amostra é fundamental homogeneização da sonda, a partir de agitação no vortex e posterior centrifugação. Após a suspensão de sonda sobre a amostra espalhada, a preparação cromossômica é finalizada e selada com cola borracha para evitar a evaporação/perda de material no passo seguinte.

### 7.3 Desnaturação e Hibridação

A desnaturação do DNA e a hibridação com a sonda são ambos realizados num aparelho molecular próprio denominando *ThermoBrite*. O aparelho simula uma câmara escura húmida que através de diferentes tempos e temperaturas fornece à amostra as condições necessárias para que ocorram os processos desejados. O aparelho é previamente humidificado com H<sub>2</sub>O tipo I e programado consoante as indicações da sonda comercial a ser utilizada. Por norma, é feito um aumento de temperatura a 75°C que estabiliza durante dois minutos para desnaturação da cadeia de DNA alvo e da sonda, e logo de seguida, um decréscimo gradual até aos 37°C permitindo a hibridação por complementaridade da sonda durante um período de *overnight*.



**Figura 20 | ThermoBrite.** Aparelho de desnaturação e hibridação utilizado na técnica FISH. Imagens captadas pelo autor.

### 7.4 | Lavagens Pós-Hibridação

Após a hibridação da sonda com o DNA alvo, a lâmina é sujeita a diversas lavagens em soluções salinas de citrato de sódio (SSC) e detergentes não iónicos (Igepal) que permitem a remoção de excesso de sonda não hibridada [90]. Inicialmente é retirada a lamela e a cola excendentária, com auxílio de uma pinça, para que a solução de lavagem

possa atuar de forma adequada. O SSC ou igeal utilizado assim como a sua concentração e tempo, variam de acordo com a sonda comercial a ser utilizada. Posteriormente, a lâmina é colocada a secar ao ar.

## **7.5 | Contraste com DAPI**

A visualização da preparação cromossômica é realizada em microscopia de fluorescência. Para tal, é necessário o recurso ao contrastante diamidino-2-phenylindole (DAPI) que permite a marcação azul do complemento cromossômico, facilitando desta forma a distinção do sinal de hibridação, que apresenta uma cor diferente [71]. São adicionados cerca de 5ul sobre a lâmina, que é coberta com uma lamela, para finalizar o ensaio. A lâmina segue para uma câmara escura e refrigerada e está pronta para ser analisada.

## **7.6 | Análise dos resultados**

As lâminas são observadas num microscópio de fluorescência e as imagens captadas pelo sistema de análise de imagem computadorizado, *Cytovision*. O número de células analisadas é dependente da indicação clínica.

## **8 | Genómica**

O MLPA é a técnica molecular semiquantitativa dedicada à deteção variações do número de cópias do genoma. Toda a técnica é realizada com recurso ao termociclador e um sistema de eletroforese capilar para a obtenção de resultados, juntamente com os painéis comerciais disponibilizados pela patente MRC Holland®. Os procedimentos práticos laboratoriais são idênticos em todos os painéis e envolvem as seguintes etapas: extração de DNA, desnaturação do DNA, hibridação da sonda, ligação da sonda, amplificação por PCR e separação dos fragmentos por eletroforese capilar.

## 8.1 | Extração do DNA

Precedente à realização do protocolo de MLPA é imperativa a obtenção de material de estudo - DNA - por meio de extração molecular. A extração de DNA é realizada de forma automatizada no Biorobot EZ1. Inicialmente são preparados todos os elementos do *kit* necessários para realização da técnica, que incluem: tubos de extração com a amostra alvo, tubos de eluição para armazenamento do DNA resultante, pontas de filtro para extração e cartuchos com partículas magnéticas, tampão de lise, tampão de lavagem e tampão de eluição. O aparelho é programado por aplicação de um cartão específico do tipo de amostra e são introduzidos os cartuchos por ordem indicada no Biorobot EZ1. O tipo de amostra mais usual é o sangue total podendo também incluir amostras como biópsia de tecidos ou sangue seco. O extrator automático permite extrair até seis amostras em simultâneo num período de 15 minutos. Logo de seguida, as amostras são armazenadas num refrigerador a uma temperatura de 4°C até utilização.



**Figura 21| Extração do DNA.** Aparelho Biorobot EZ1 para extração de DNA automatizada. Imagens captadas pelo autor.

A quantificação do DNA extraído permite validar a qualidade do procedimento anterior. Este passo é realizado no NanoDrop™, espectrofotómetro, que através de valores de absorvância fornece o grau de pureza da amostra e ausência de contaminantes como iões ou sais que influenciam o sucesso dos resultados da técnica de MLPA.

## 8.2 | Desnaturação do DNA e Hibridação da sonda

A primeira fase da técnica de MLPA envolve a abertura da cadeia de DNA para que seja possibilitada a ligação da sonda por complementaridade. O programa do termociclador é iniciado após colocação dos tubos de reação. Logo de seguida, ocorre um aumento de temperatura até aos 98°C que estabiliza por 5 minutos para que ocorra a desnaturação da cadeia de DNA. Posteriormente, é adicionado aos tubos a *mix 1* previamente preparada com solução tampão e sonda. O termociclador inicia um novo ciclo e diminui gradualmente a sua temperatura para os 60°C para que ocorra hibridação da sonda durante um período de 16 horas.

## 8.3 | Ligação da sonda

Para que ocorra a amplificação dos fragmentos, é primordial a ligação das duas hemi-sondas hibridadas através da enzima específica Ligase por adição da *mix 2*. A enzima ligase vai atuar sobre as duas hemi sondas e catalisar a formação de uma ligação covalente entre as mesmas [91]. Este passo é interrompido com o começo de um novo ciclo temporal, desnaturando e inativando a enzima Ligase a 98°C durante 5 minutos.

## 8.4 | Amplificação por PCR

A *mix 3*, que contém a DNA polimerase e os *primers* universais, é adicionada aos tubos com as amostras para que seja iniciado os 35 ciclos da reação de PCR e consequente amplificação das sequências de DNA hibridadas com as sondas de MLPA. Após a amplificação por PCR, as amostras estão prontas para o próximo passo.

## 8.5 | Separação dos fragmentos

Os produtos de amplificação de PCR são separados por eletroforese capilar de acordo com o seu tamanho específico, dependente da sequência *stuffer* das sondas marcadas [91]. A separação dos fragmentos é feita por introdução de uma placa

previamente preparada com solução de formamida desionizada, Rox 500 e amostra em cada um dos seus 96 poços, num sistema Thermo Fisher Scientific/Applied Biosystems AB 3130xlSize.

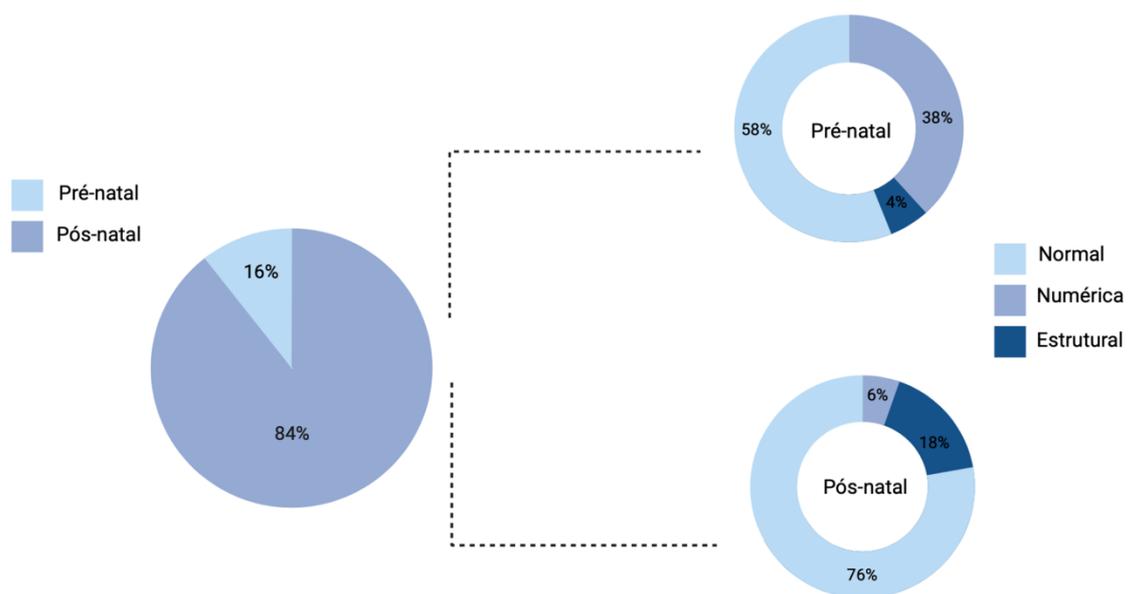
## **8.6 | Análise dos resultados**

Os resultados obtidos por eletroforese capilar são analisados com o *software* GeneMarker®. O sinal obtido por cada sonda é comparado com sinal obtido nas amostras controlo.

## **CAPÍTULO IV | Resultados e Discussão**

---

A componente prática do ano de estágio envolveu o acompanhamento e a manipulação de amostras biológicas com diferentes indicações clínicas ao longo dos nove meses de estágio. Durante esse período foram realizados em laboratório os três principais estudos do serviço de citogenética do CGM: cariótipo, FISH e MLPA. Foram analisadas amostras de diagnóstico pré-natal e diagnóstico pós-natal, com diversas indicações clínicas associadas e cromossomopatias detetadas. De todas as amostras acompanhadas e/ou manipuladas, foram filtradas 150 amostras com base nos resultados registados ao longo do estágio e as cromossomopatias detetadas (figura 1).



**Figura 22: Representação gráfica do estudo de 150 amostras filtradas durante o período prático laboratorial.** Às amostras de pré-natal e pós-natal foi realizado estudo de cariótipo, FISH ou MLPA, consoante a requisição clínica. Imagem criada em *Biorender*.

**Tabela 2** – Principais indicações clínicas referentes às amostras de diagnóstico pós-natal (esquerda) e pré-natal (direita) analisadas durante o período de estágio.

<b>Principais Indicações Clínicas</b>	
<b>Pós-natal</b>	<b>Pré-natal</b>
Infertilidade	Morte fetal intra-uterina (MFIU)
História familiar de cromossomopatia	História familiar de doença ligada ao X
Banco de gâmetas	Marcadores ecográficos alterados
Suspeita de síndromes genéticas	NIPT com risco aumentado de anomalia cromossômica
Dismorfismos	Restrição de crescimento intra-uterino
Déficit Cognitivo	Rastreamento Combinado de 1º e 2º trimestre alterado
Malformações <i>major</i>	Idade Materna Avançada (IMA)
Procriação Medicamente Assistida	Feto anterior com cromossomopatia
Atraso Desenvolvimento Psicomotor (ADPM)	Progenitor portador de alteração cromossômica estrutural

O presente relatório de estágio aborda 6 casos clínicos representativos de cada um dos estudos realizados na unidade de citogenética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães (CGMJM): cariótipo (caso clínico 1, 2 e 3), FISH (caso clínico 4 e 5) e MLPA (caso clínico 6). Estes casos foram selecionados de 150 casos clínicos que pude acompanhar ao longo dos nove meses de estágio e englobam nos seus resultados a descrição de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais detetadas. São acompanhados de referências à literatura e imagens captadas durante o estágio.

## Caso Clínico nº1

A amostra biológica que deu entrada no serviço do CGM foi um tecido placentário pertencente a uma gestante de 29 anos de idade e com sete semanas e quatro dias de gestação. A indicação clínica indicava uma perda gestacional recorrente. O estudo requisitado pelo clínico foi cariótipo da placenta.



**Figura 23:** Cariograma poliploide, 69,XXX obtido por bandagem GTL. Imagens cedidas pelo CGM.

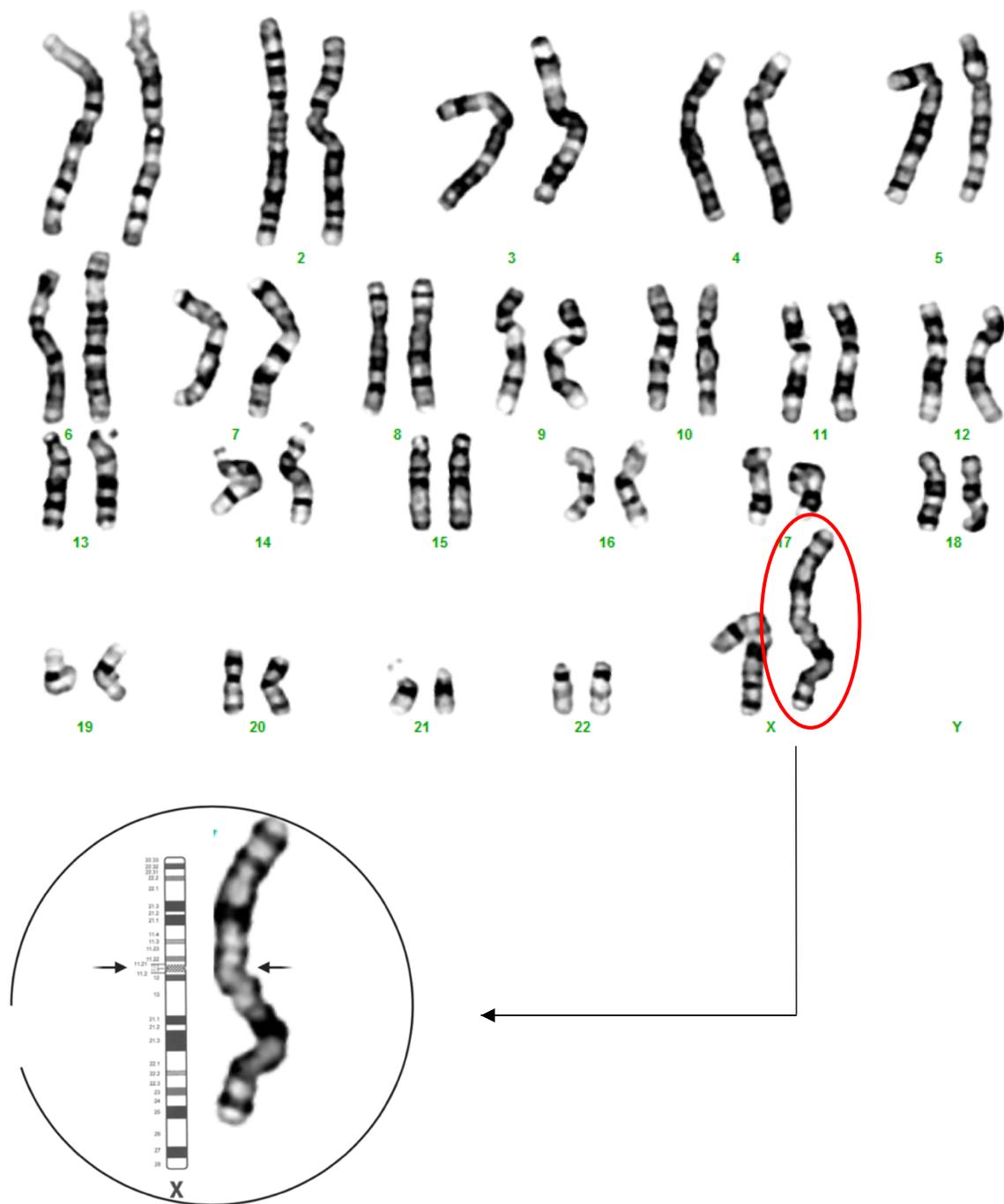
O estudo do cariótipo que foi obtido a partir de uma cultura celular em monocamada (utilizando frascos de cultura específicos) com aplicação de bandas GTL e análise microscópica mostrou a presença de uma anomalia cromossômica numérica, uma triploidia. Foram contadas 15 metafases, das quais, 5 foram captadas pelo sistema *CytoVision* para análise. O cariótipo segundo as regras de nomenclatura ISCN 2020 foi descrito como: 69,XXX.

As alterações numéricas poliploides estão diretamente associadas a perda gestacional espontânea precoce, no primeiro e segundo trimestre de gravidez, e a clínica identifica estes casos como não compatíveis com a vida humana. O complemento

cromossômico triploide resulta de um conjunto cromossômico extra haploide de origem paterna (triploidia diântrica) ou origem materna (triploidia digínica). Erros em meiose I e II são a causa subjacente mais comum de triploidia digínica, causada pela fertilização de um espermatozoide haploide com um oócito diploide. Ao contrário da maioria das alterações cromossômicas numéricas, fenômenos triploides não estão relacionados com a idade materna avançada. No entanto, a literatura prevê que a distribuição diântrica e digínica esteja relacionada com a idade gestacional. Triploidia de origem paterna predomina nos abortos do primeiro trimestre, enquanto os fetos triploides viáveis no segundo ou terceiro trimestre são geralmente de origem materna [24]. Ao casal foi recomendado consultas de aconselhamento genético para aquisição de informação e orientação no planejamento familiar, e oferta de DPN em gestações futuras.

## **Caso Clínico nº2**

Uma mulher de 26 anos foi referenciada para estudo citogenético com indicação clínica de suspeita de síndrome de Turner. As manifestações clínicas envolviam baixa estatura e obesidade, pescoço alado, amenorreia primária, puberdade tardia, dificuldades de aprendizagem e nenhuma patologia do foro endocrinológico foi detetada. A amostra biológica de sangue periférico que deu entrada no serviço foi requisitada para estudo de cariótipo com bandas de alta resolução (BAR), incluindo cultura celular sincronizada.



**Figura 24:** Cariograma 46,X,psu idic(X)(p11.2) obtido por bandagem GTL e ideograma do cromossoma X normal para correlação com as bandas do cromossoma X detetado no estudo. Imagens cedida pelo CGM.

O estudo citogenético revelou um cariótipo feminino anormal. Foram contadas 24 metafases e 6 foram analisadas e captadas pelo sistema *CytoVision* para análise. O cariótipo segundo as regras de nomenclatura ISCN 2020 foi descrito como: 46,X,psu idic(X)(p11.2), representativo de uma alteração cromossômica estrutural desequilibrada num dos cromossomas sexuais X. A alteração foi encontrada em todas as células em duas culturas independentes.

De acordo com as *Guidelines* Internacionais da Síndrome de Turner de 2017 a síndrome na sua forma clássica é descrita por um cariótipo 45,X, podendo porém existir diversas variantes associadas, por partilharem correlações genótipo-fenótipo idênticas entre si. Outros tipos incluem [1] deleções do braço curto (Xp) ou do braço longo (Xq), [2] cromossoma em anel (rX), [3] isocromossoma (Xi) e [4] mosaïcismo, em que uma linha celular com monossomia X (45,X) é acompanhada por uma ou mais linhas celulares com um cromossoma X completo normal ou estruturalmente anormal. O caso apresentado, 46,X,psu idic(X)(p11.2) representa um cromossoma sexual X isodicêntrico com um único centrómero ativo resultante de uma quebra e reunião em Xp11.2 (deleção de uma região distal a Xp11.2 e duplicação de uma região de Xp11.2 até ao telómero Xq). A inativação de um dos centrómeros ou a tendência destes funcionarem como um só devido à sua proximidade (*psu*-pseudo) confere estabilidade destes cromossomas durante o processo meiótico [92]. O cromossoma sexual X pseudo-isodicêntrico embora pouco comum é uma das variantes da síndrome de Turner, considerado um *Turner-Like*, pelo que este resultado se encontra de acordo com a indicação clínica fornecida.

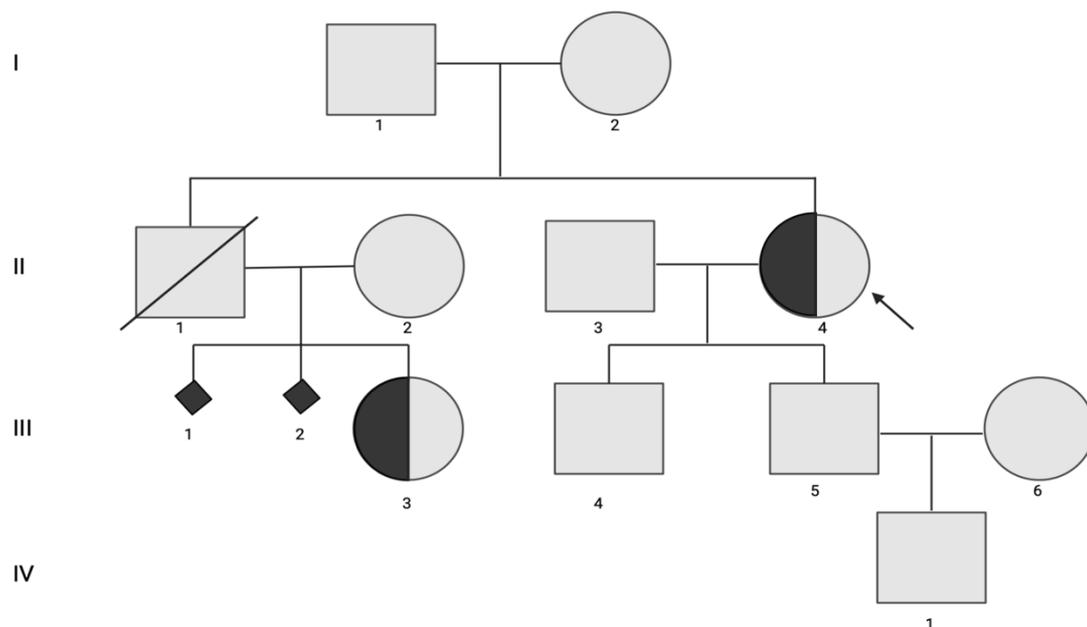
A paciente apresenta trissomia para o segmento Xp11.2-->Xqter e monossomia para Xp11.2-->Xpter. A deleção de Xp numa mulher é uma causa típica de baixa estatura e insuficiência ovárica, características mais comuns em pacientes com Turner. A haploinsuficiência associada ao gene *SHOX*, localizado na região pseudoautosómica do braço curto de ambos os cromossomas sexuais, é descrita como a principal causa de restrição de crescimento em pacientes com síndrome de Turner [93]. A bibliografia reporta que os genes para as características físicas e cognitivas se encontram no Xp, enquanto os genes para a função ovárica estão presentes tanto no Xp como no Xq. O braço curto está intimamente relacionado com a função ovárica por proteínas específicas como USP9X e BMP15 localizadas nas regiões Xp11.4 e Xp11.2, respetivamente [94]. No entanto, casos reportados de pacientes com deleção parcial do Xp vieram demonstrar que a puberdade pode ocorrer espontaneamente com um desenvolvimento mamário

normal e muitos destes pacientes são igualmente férteis [95]. Este facto, demonstra a necessidade de serem realizados estudos adicionais de correlação genótipo-fenótipo das variantes de Turner, ainda não bem estabelecida, para melhorar a compreensão do prognóstico.

A paciente foi aconselhada a consultas de genética médica e de endocrinologia. No entanto é de salientar que o acompanhamento das pacientes com deleção Xp deve ser orientado de forma diferente das Turner clássicas, uma vez que as variantes da síndrome de Turner são hereditárias para a descendência, enquanto as formas clássicas são esporádicas e devidas a erros meióticos [96]. Numa possível gestação futura é oferecido DPN e especial vigilância cardíaca de rotina devido ao risco acrescido de complicações cardiovasculares durante a gravidez.

### Caso Clínico nº3

O caso N3 é referente a uma mulher de 59 anos com história familiar de translocação Robertsoniana entre o cromossoma 14 e 22. A alteração estrutural foi descoberta na família através do estudo do cariótipo que foi pedido por ocorrerem perdas gestacionais recorrentes. Não foram reportadas manifestações clínicas significativas.



**Figura 25:** Representação esquemática da árvore genealógica da família em estudo. Os familiares II-4 e III-3 são ambos portadores da alteração der(14;22). Imagem criada em *Biorender*.

O estudo da amostra de sangue periférico foi requisitado pelo clínico com pedido de cariótipo, obtido com cultura de células sincronizadas de linfócitos.



**Figura 26:** Cariograma 45,XX,der(14;22)(q10;q10) obtido por bandagem GTL. Imagens cedida pelo CGM.

A análise por cariótipo detetou a alteração estrutural em estudo nos cromossomas da paciente. Após a contagem de 15 metafases e análise e captação de imagem de 5 metafases, o cariótipo reportado segundo as regras de nomenclatura do ISCN 2020 é descrito como 45,XX,der(14;22)(q10;q10).

As translocações Robertsoniana são as cromossomopatias estruturais mais comuns resultantes da fusão de dois cromossomas acrocêntricos. A quebra dos cromossomas 14 e 22 na região q10 leva à perda do braço curto de ambos e formação de um cromossoma derivativo constituído pela fusão dos dois braços longos. Os braços curtos resultantes da translocação Robertsoniana são acêntricos e, portanto, acabam por se perder durante o processo mitótico. A perda destes braços não tem significado clínico apesar de cada braço curto transportar um número variável de clusters rDNA, locais de ligação de fatores de transcrição, genes codificadores de mRNA e genes de RNA não

codificantes [97]. O balanço cromossômico final, embora com um cromossoma a menos, é considerado equilibrado uma vez que a informação genética em falta não faz deste evento uma perda deletária. Assim, portadores de translocações Robertsoniana são compatíveis com um fenótipo normal, informação que está de acordo com a paciente em estudo.

No entanto, neste tipo de situações existe o risco acrescido da descendência resultante de uma gestação em que um dos progenitores é portador de uma translocação Robertsoniana  $t(14;22)$  ficar comprometida. A segregação desequilibrada destes cromossomas através da meiose pode resultar em abortos espontâneos e descendência aneuploide devido à produção de gâmetas desequilibrados. Neste caso, considerando que o parceiro da probanda é normal e consoante o tipo de segregação (alternada ou adjacente I ou II), existiria a probabilidade de originar zigotos normais ou equilibrados e zigotos aneuploides com trissomia/monossomia do cromossoma 22 ou trissomia/monossomia do cromossoma 14, não compatíveis com a vida humana ou nascimento de uma criança com malformações graves e atraso mental em caso de viabilidade. Estes fenómenos aneuploides podem ser justificativos dos abortos recorrentes indicados na Figura 10 (III1 e III2), embora não tenha sido feito estudo genético do irmão da probanda devido a morte do mesmo nem dos produtos de abortamento para confirmação da anomalia estrutural.

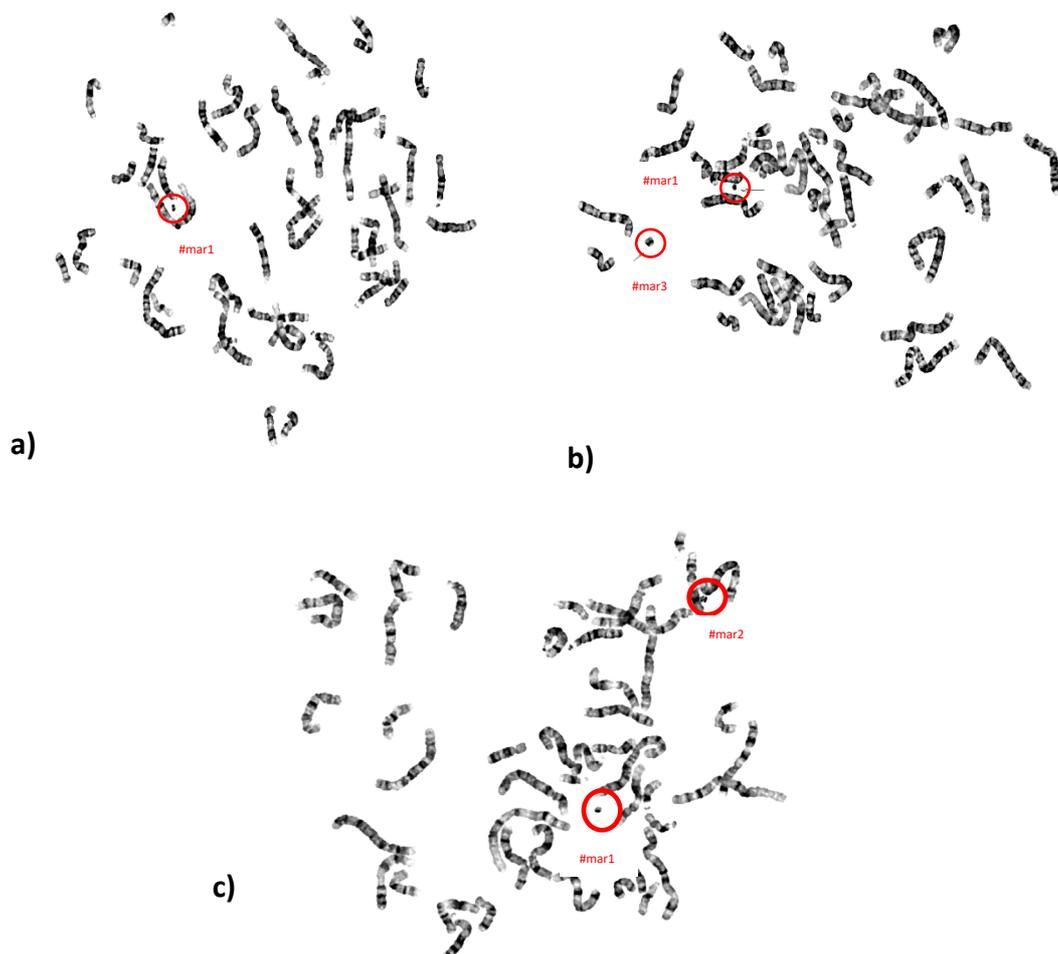
A dissomia uniparental (DUP) também é um aspeto a destacar neste estudo dado que no cromossoma 14 se sabe estarem genes sujeitos a *imprinting* genómico, o que pode levar a alterações fenotípicas nos portadores. Em casos gestacionais, a bibliografia destaca duas principais síndromes associadas à região de *imprinting* do cromossoma humano 14q32, síndrome de Kagami-Ogata e Temple, ambas relacionadas com perturbações do desenvolvimento intra-uterino e prematuridade. Os genes sujeitos a *imprinting* genómico são expressos predominantemente a partir de um único cromossoma parental, sendo a outra cópia silenciada. O padrão de expressão diferencial é definido durante a gametogénese e envolve fenómenos epigenéticos específicos de origem parental como a metilação do DNA e modificações covalentes nas caudas das histonas [98].

A esta utente foi recomendado o estudo dos seus progenitores, se possível, para perceber se a origem da alteração encontrada era paterna ou materna. Consultas de aconselhamento genético na família também são indicadas para avaliação de riscos e prognósticos em relação à translocação indicada. Para possíveis gestações futuras dentro

da família, é oferecido DPN para exclusão de anomalias cromossômicas, com eventual estudo de DUP.

### Caso Clínico nº4

Uma menina de 11 anos foi referenciada para estudo citogenético com indicação clínica de baixa estatura e cariótipo anormal realizado no exterior com a presença de vários cromossomas marcadores. Informações complementares mostravam que o cariótipo dos progenitores não indicava nenhuma alteração significativa e o estudo molecular por aCGH da criança e dos pais foi reportado como normal. Bossas frontais, face triangular com assimetria facial, pescoço curto, *pectus escavatum* e macrocefalia relativa eram alguns das manifestações síndromicas reportadas pelo clínico.



**Figura 27:** Metafases captadas com a presença dos três cromossomas distintos mar1, mar2 e mar3, encontrados nas imagens (a), (b) e (c). Imagens cedidas pelo CGM.

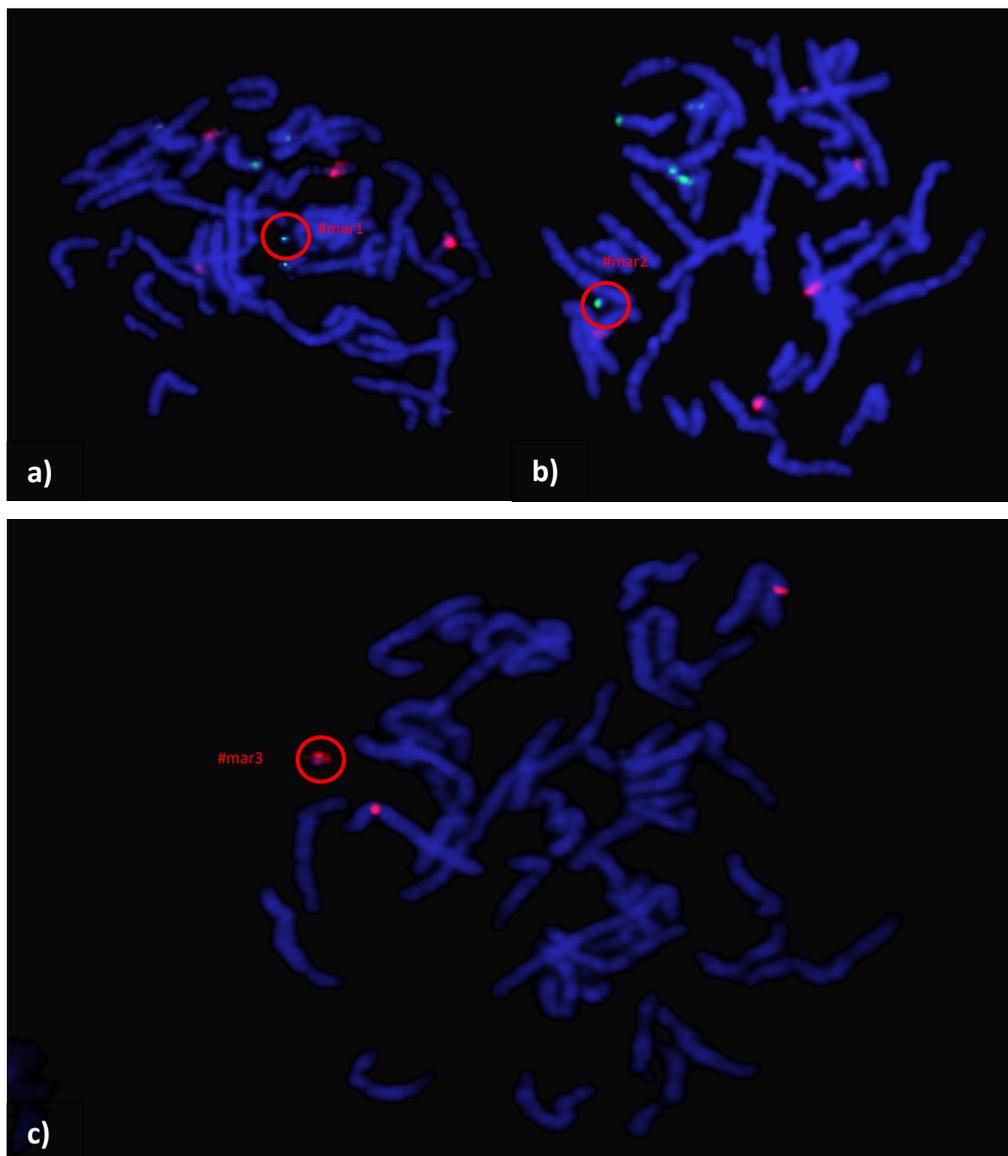
A análise microscópica de 90 metafases revelou a presença em mosaico de quatro linhas celulares, uma linha normal 46,XX em 12% das células analisadas e três linhas com a presença de três cromossomas marcadores distintos em 88% das restantes células. Os três cromossomas marcadores foram diferenciados com base no seu tamanho, sendo que um deles é visivelmente maior do que os outros dois. O cariótipo reportado segundo as normas de nomenclatura impostas pelo ISCN 2020 foi descrito por: mos 47,XX,+mar1[39]/48,XX,+mar1,+mar2[28]/48,XX,+mar1,+mar3[12]/46,XX[11]dn.

Os cromossomas marcadores supranumerários (sSMCs) são ocasionalmente observados em preparações cromossómicas, frequentemente na forma de mosaico. Estas estruturas são geralmente constituídas por heterocromatina centromérica e resultam de um ou dois braços cromossómicos, em mais de 70% dos casos são pertencentes a cromossomas acrocêntricos [52]. Os mecanismos cromossómicos dos sSMCs envolvem monossomia e trissomia *rescue* e erros meióticos pós-fertilização. Os sSMCs podem ser observados em diferentes formas, incluindo anel, *centric minute* e duplicação invertida [99].

A presença de cromossomas marcadores pode interferir com o processo meiótico, pelo que, nestes casos, é importante o estudo genético dos progenitores para determinar a origem destes cromossomas. Os progenitores apresentam cariótipo sem alteração, logo esta cromossomopatia encontrada na utente foi considerada *de novo*. Já os efeitos fenotípicos dos sSMCs dependem de diversos fatores como o tamanho, o conteúdo genético e o grau de mosaicismo. Apesar do cariótipo e do aCGH representarem duas técnicas cruciais no diagnóstico citogenético e no molecular, apresentam algumas limitações na caracterização de sSMCs: o cariótipo identifica apenas a presença de material supranumerário e o aCGH pode não detetar mosaicismo de baixa expressão, para além de que só deteta ganhos ou perdas (CNVs) de regiões codificantes, não conclusivos para o estudo em questão. Assim, na tentativa de identificar a origem molecular dos três cromossomas marcadores foi sugerida ao clínico a realização da técnica de FISH com recurso a sondas de região centromérica de todos os cromossomas.

Para além do FISH, foi também pedida a realização da técnica de MLPA para o gene *SHOX*. O gene *SHOX*, localizado na região pseudoautosómica do braço curto dos cromossomas sexuais é fundamental na determinação da estatura normal. Fenómenos de

haploinsuficiência caracterizados por microdeleções neste gene, estão intimamente relacionados com a baixa estatura característica de diversos síndromes genéticas, tais como síndrome de Turner e de Léri-Weill [100]. A técnica de MLPA por meio da utilização do painel *SALSA MLPA Probemix P036-E3* não detetou nenhuma alteração no gene *SHOX*, e o resultado foi dado como normal.



**Figura 28:** Imagens FISH captadas no microscópio de fluorescência com a presença dos três cromossomas distintos marcados com sinal de hibridação das sondas D13Z1/D21Z1+ (#mar1/sinal verde); D14Z1/D22Z1+ (#mar2/sinal verde); D4Z1+ (#mar3/sinal vermelho) (mar1; mar2; mar3). Imagens cedidas pelo CGM.

A técnica FISH com o uso de sondas de região centromérica para todos os cromossomas revelou um sinal de hibridação com a sonda específica para a região centromérica comum aos cromossomas 13/21 no mar1 (imagem a), hibridação com a sonda específica para a sonda centromérica com região comum aos cromossomas 14/22 no mar2 (imagem b) e hibridação específica para a sonda centromérica do cromossoma 4 no mar3 (marcador de maior dimensão, imagem C). As sondas de região centromérica comercialmente disponíveis para a identificação dos cromossomas 13/21 e 14/22 identificam regiões comuns aos centrómeros dos mesmos, fazendo com que a distinção entre estes cromossomas heterocromáticos não seja permitida. O resultado final do cariótipo foi: mos 47,XX,+mar1.ish der(13/21)(D13Z1/D21Z1+)/48,XX,+mar1.ish der(13/21)(D13Z1/D21Z1+),+mar2.ish der(14/22)(D14Z1/D22Z1+)/48,XX,+mar1.ish der(13/21)(D13Z1/D21Z1+),+mar3.ish der(4)(D4Z1+)/46,XX $dn$ .

Uma vez que os sSMCs são provenientes de diferentes origens, a correlação genótipo-fenótipo no diagnóstico não é fácil. Cromossomas marcadores supranumerário provenientes de cromossomas autossómicos, como o cromossoma 4, são encontrados em cerca de 30% a 40% de casos em indivíduos com um cromossoma marcador extra e o risco de um fenótipo anormal associado a marcadores autossómicos é de 28%. Estudos destacam o atraso no desenvolvimento e baixa estatura como manifestações clínicas encontradas nestes cromossomas marcadores [101]. Os cromossomas 6, 7, 14, 15, 16 e 20 contêm genes de *imprinting* e dissomia uniparental (DUP) destes cromossomas são mais frequentemente descritas em casos de sSMC. Quando os sSMCs contêm apenas regiões heterocromáticas, é necessário excluir por técnicas complementares se um cromossoma com *imprinting* está envolvido na DUP [102]Embora não se prevejam alterações fenotípicas significativas associadas a sSMCs formados exclusivamente de heterocromatina, o aumento de material centromérico e pericentromérico partilham a presença de uma família de satélites ricos em AT pode favorecer quebras e rearranjos entre cromossomas não homólogos [103].

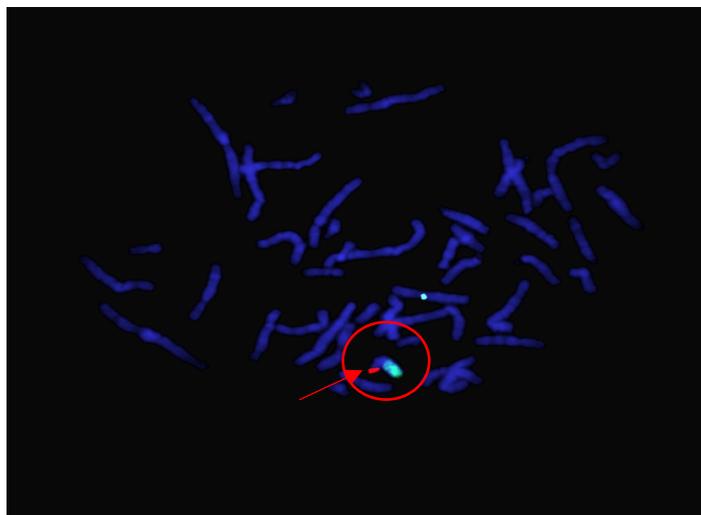
A presença de cromossomas marcadores pode interferir com o processo meiótico, pelo que, nestes casos, para além do estudo genético dos progenitores para determinar a origem destes cromossomas, se eventos *de novo* ou herdados, é importante num possível futuro reprodutivo, a oferta de diagnóstico pré-natal para a exclusão de anomalias cromossómicas.

## Caso Clínico nº5

A amostra biológica de sangue periférico que deu entrada no serviço do CGM pertencia a uma menina de 19 anos com indicação clínica de distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS). Foi realizado estudo citogenético no período neonatal por apresentar edema dos pés com suspeita de síndrome de Turner e foi detetada disgenesia gonadal completa com observação da presença de um cromossoma sexual Y em todas as linhas celulares.

Os distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) englobam diversos fatores congénitos ou hormonais associados a um desenvolvimento atípico das estruturas genitais internas e externas. Indivíduos afetados podem ser reconhecidos durante o período neonatal devido à ambiguidade dos genitais externos ou no pós-natal com sinais de puberdade atrasada/ausente, amenorreia ou infertilidade [104].

A determinação do sexo fetal durante o período de embriogénese é determinada pelos cromossomas sexuais. O gene *SRY*, gene determinante de sexo masculino localizado no braço curto do cromossoma Y, é uma região crítica no desenvolvimento de características sexuais masculinas em humanos. O testículo, uma vez formado por ação do *SRY*, produz testosterona que segrega para outros tecidos. Na ausência de *SRY*, a gónada diferencia-se em ovário e segrega estrogénio [105]. No presente caso, informações complementares relatavam a ausência de testículos, ovários não visíveis ecograficamente e amenorreia primária. De forma a detetar a presença do gene *SRY* no cromossoma sexual Y, foi realizada a técnica FISH para a deteção deste gene.



**Figura 29:** Imagem FISH captada no microscópio de fluorescência com sinal de hibridação da sonda do *SRY*, localizada na região Yp11.31 (sinal vermelho). Imagens cedidas pelo CGM.

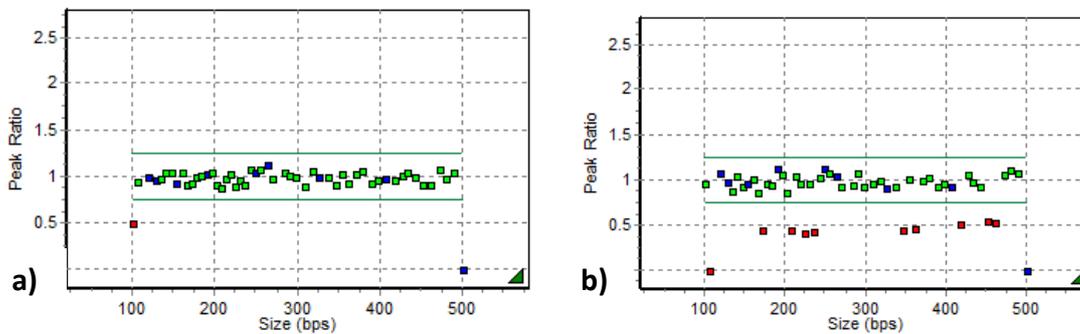
O resultado da técnica FISH reportado segundo as normas do ISCN 2020 foi: ish Yp11.3(SRYx1). O sinal vermelho deteta o gene *SRY* em estudo localizado em Yp11.31, a verdes estão sinalizadas as sondas controlo para o cromossoma X (DXZ1, Xp11.1-q11.1) e cromossoma Y (DYZ1, Yq12). Este estudo veio confirmar a presença do gene *SRY* no genoma da menina de 19 anos.

A disgenesia gonadal pura 46,XY, previamente conhecida como síndrome de Swyer, pode ser causada por uma mutação no gene *SRY* ou genes que estão envolvidos na regulação da sua expressão como *SOX9*, *DAX1*, *WT-1* e *SF1*. As mutações levam ao silenciamento na expressão destes genes e afetam o desenvolvimento testicular levando ao desenvolvimento de gónadas indiferenciadas, que não produzem a hormona anti-mulleriana ou androgénios. Assim, as trompas de Falópio, a vagina, o colo do útero e o útero desenvolvem-se, e os genitais externos são os das mulheres devido à ausência de ação dos androgénios [106]. A clínica orienta utentes femininas XY para tratamentos de gonadectomia profilática para prevenir a transformação maligna, terapia de substituição hormonal adequada (HRT) e aconselhamento psicológico [106].

## **Caso Clínico nº6**

As duas amostras biológicas de sangue periférico que deram entrada no serviço foram requisitadas para estudo de MLPA de um casal cujo filho foi diagnosticado com uma deleção da região 16p11.2 por aCGH. Nos progenitores não foram consideradas manifestações clínicas significativas e o cariótipo não apresentou alterações cromossómicas. Para a deteção da alteração foi necessário o recurso a técnicas de poder de resolução molecular. Antes da técnica de MLPA é necessário a extração de DNA de forma a avaliar a presença de contaminantes, e consequente qualidade do DNA. O painel de sondas comercial *SALSA MLPA Probemix P343 Autism-1* da patente MRC Holland®, é utilizada no estudo de deleções/duplicações de regiões relacionadas com Perturbações do Espectro do Autismo (PEA), entre elas 15q11-q13, 22q13 e 16p11.2. Para testar a qualidade da técnica o primeiro passo é a avaliação dos fragmentos controlos. Os

resultados da técnica de MLPA nas duas amostras requeridas, com recurso a sondas do painel *SALSA MLPA Probemix P343 Autism-1*, são representados na figura 8 e tabela 2.



**Figura 30:** Resultado obtido através da técnica de MLPA com recurso ao painel *SALSA MLPA Probemix P343 Autism-1*. Imagens cedidas pelo CGM.

**Tabela 3** – Resultados tabelados dos rácios correspondentes a cada sonda do painel *SALSA MLPA Probemix P343 Autism-1*. Imagens cedidas pelo CGM.

	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	X-Fragment	101.3	0.486
2	Y-Fragment	105.8	0.941
3	<b>4p13</b>	119.0	1.002
4	<b>3q26</b>	128.2	0.968
5	ATP10A EXON1	134.2	0.980
6	UBE3A EXON5	140.9	1.047
7	GABRB3 EXON9	147.4	1.047
8	<b>11q13</b>	154.4	0.925
9	UBE3A EXON7	160.3	1.040
10	KLF13 EXON2	167.0	0.920
11	HIRIP3 EXON3	172.5	0.921
12	NDNL2 EXON1	178.5	1.005
13	GABRB3 EXON7	184.6	1.007
14	<b>12q12</b>	190.3	1.034
15	UBE3A EXON6	196.7	1.043
16	APBA2 EXON14	202.2	0.918
17	SEZ6L2 EXON1	208.6	0.885
18	SNRPN-HB2-85 06	214.3	0.982
19	GABRB3 EXON12	219.8	1.032
20	DOC2A EXON4	225.6	0.893
21	SHANK3 EXON22	230.8	0.955
22	MAZ EXON5	237.0	0.911
23	UBE3A EXON12	244.1	1.073
24	<b>11q23</b>	250.1	1.043
25	UBE3A EXON9	256.1	1.082
26	<b>1p31</b>	264.4	1.126
27	ATP10A EXON16	269.5	0.986
28	CHRNA7 EXON4	285.1	1.045
29	GABRB3 EXON11	291.7	1.022
30	TJP1 INTRON1	299.3	1.000
31	SHANK3 EXON3	310.3	0.901
32	GABRB3 EXON8	318.8	1.069
33	<b>10q26</b>	327.3	1.004
34	CD2BP2 EXON4	337.6	0.996
35	MVP EXON5	346.8	0.912
36	GABRB3 EXON4	355.2	1.038
37	SPN EXON3	362.4	0.924
38	TRPM1 EXON27	372.6	1.029
39	GABRB3 EXON10	380.4	1.060
40	SHANK3 EXON14	390.3	0.935
41	14q32	398.7	0.956
42	<b>7p14</b>	407.5	0.975
43	MAZ EXON6	419.5	0.960
44	SCG5 EXON6	428.0	1.018
45	OCA2 EXON22	434.6	1.048
46	OCA2 EXON1	444.3	0.996
47	HIRIP3 EXON4	452.8	0.912
48	MAPK3 EXON5	463.1	0.915
49	SNRPN-HB2-85	471.8	1.083
50	LAT EXON4	479.7	0.985
51	SCG5 EXON3	489.7	1.053
52	<b>7q22</b>	499.8	0.000

Os fragmentos controlos detetados por eletroforese capilar no programa *GeneMarker®* encontram-se dentro do *threshold* 0.75 e 1.25 em ambos os casos, logo são considerados normais e viáveis. Logo de seguida é possível fazer uma avaliação dos gráficos obtidos por meio dos rácios e os valores tabelados correspondentes a cada sonda testada. A figura 8a) e tabela 2a) são correspondentes ao pai do utente e a partir dos valores tabelados para cada sonda testada é possível definir que todos eles têm valores aproximados a 1, indicativo de ausência de ganhos ou perdas de material em relação à amostra de referência. Neste ensaio o rácio do fragmento X é 0.486 uma vez que se trata de uma amostra biológica masculina. O resultado do MLPA do pai foi reportado como *rsa 16p11.2(P343-C3)x2*.

A figura 8b) e tabela 2b) é correspondente à mãe da criança e é possível identificar por meio do gráfico de rácio que alguns valores das sondas testadas estão abaixo dos valores de referência. *SNP*, *MAZ*, *MVP*, *SEZ6L2*, *HIRIP3*, *DOC2A*, *MAPK3* são

diferentes genes da região 16p11.2 e encontram-se perto dos valores de 0.5, indicativo de deleção para aquela região. O resultado do MLPA da mãe foi reportado como  $16p11.2(SNP, MAZ, MVP, SEZ6L2, HIRIP3, DOC2A, MAPK3) \times 1$ . Desta forma, o ensaio em trio mostrou-se conclusivo na identificação da origem da deleção 16p11.2, herdada pelo filho por via materna.

A região cromossômica 16p11.2, localizada no braço curto proximal do cromossoma 16, contém cerca de 29 genes e 500 a 600Kb. Esta região encontra-se localizada num dos cromossomas com maior número de genes e pseudogenes do genoma humano e é propícia a recombinação homóloga não-alélica. Como resultado de uma construção genómica instável, está altamente predisposto a desequilíbrios genómicos, tais como doenças genéticas raras e síndromes congénitas [107]. Deleções e duplicações da região cromossômica humana 16p11.2 estão entre as causas genéticas mais comuns associadas a várias alterações do desenvolvimento neurológico, incluindo perturbações do espectro do autismo e epilepsia [108]. Microdeleções do 16p11.2 são na sua maioria considerados eventos “*de novo*” e não herdadas. Neste caso, e de forma menos frequente, a deleção foi transmitida dos progenitores – via materna - para a descendência de forma autossômica dominante [109]. Contrariamente, duplicações nesta região são frequentemente herdadas e associadas a características dimórficas como microcefalia e baixo peso corporal, assim como a esquizofrenia [107]. Uma vez identificada num membro da família, é oferecido ao casal DPN numa possível futura gravidez e recomendado aconselhamento genético. A previsão fenotípica é um desafio, assim como o prognóstico.

## **CAPÍTULO V | Considerações Finais**

---

O laboratório de citogenética do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães (CGMJM) cumpre as normas certificadas pela ISO 9001:2000. Dá entrada de amostras biológicas de pré-natal e pós-natal provenientes de diversos centros clínicos/hospitalares de todo o país e ilhas para a realização de diagnóstico citogenético e molecular. A manipulação das amostras biológicas requer o cumprimento de normas bem definidas seguidas por todos os técnicos do laboratório.

Em citogenética convencional realizei o estudo dos cromossomas quanto ao número e estrutura, permitindo a identificação de anomalias cromossómicas com um limite mínimo de resolução de 5 a 10 Mb. O estudo convencional dos três primeiros casos detetou uma anomalia cromossómica numérica (caso 1), anomalia cromossómica estrutural desequilibrada (caso 2) e anomalia cromossómica estrutural equilibrada (caso 3). O estudo do cariótipo destes três pacientes permitiu estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo essencial à orientação clínica.

A citogenética molecular foi desenvolvida de forma a alcançar um maior poder de resolução cromossómico, não alcançado pela citogenética convencional. A técnica de FISH teve especial destaque nos casos clínicos 4 e 5, onde por meio de sondas específicas de região centromérica e sondas de sequência única, respetivamente, permitiu a identificação e caracterização de regiões cromossómicas não identificáveis por cariótipo. Nomeadamente no caso clínico 4, a FISH superou algumas das limitações associadas à citogenética convencional (cariótipo) assim como a técnicas genómicas avançadas (aCGH) permitindo desta forma enfatizar a contínua importância da citogenética molecular no diagnóstico genético.

A genómica está em contínua expansão nos dias atuais e os avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de novas ferramentas de alta precisão na deteção de alterações do número de cópias do genoma humano. A técnica de MLPA utiliza painéis de sondas específicos para a determinação de CNVs e está cada vez mais presente nos laboratórios de genética, especialmente no estudo de pacientes com atraso global do desenvolvimento (AGD) ou défice intelectual (DI). O último caso clínico relatado, caso clínico 6, apresenta um estudo em trio através dos progenitores de uma criança afetada com a deleção do 16p11.2, frequentemente associada a perturbações do espectro do autismo (PEA). Este estudo permitiu detetar a partir do painel de sondas SALSA MLPA Probemix P343 Autism-1 a origem da deleção em estudo. O MLPA é uma técnica molecular de simples execução e com resultados obtidos em menos de 48 horas.

A citogenética convencional, a citogenética molecular e a genómica funcionam entre si como técnicas complementares no diagnóstico genético. Alcançar um diagnóstico inequívoco com recurso a estas técnicas é fundamental para a obtenção de respostas sobre o prognóstico, sobre os riscos de recorrência e para direcionar o paciente a terapia específica, levando a que sejam minimizados os custos financeiros associados e até mesmo possibilitar a inclusão desses indivíduos na sociedade.

Os nove meses de estágio no CGM permitiram-me cumprir todos os objetivos propostos no início. No total de amostras acompanhadas foram aplicadas as diferentes técnicas do laboratório de citogenética entre elas: cultura celular, sincronização, manipulação, espalhamento, bandagem G, C e coloração AgNOR, montagem de kariogramas e execução da técnica de FISH. Dentro da vertente genómica acompanhei e realizei a extração e quantificação de DNA e a técnica de MLPA. Integrei a rotina de um laboratório de genética clínica em ambiente laboral e aprimorei as competências teóricas e práticas desenvolvidas ao longo da minha formação académica. Foi-me dada a oportunidade de submeter dois trabalhos em formato poster e colaborar na Mostra UP 2023 onde tive a oportunidade de divulgar ao público mais jovem um pouco do meu trabalho na citogenómica. Adicionalmente, acompanhei estagiários de outras faculdades na sua formação, contribuindo para uma melhor inclusão na rotina laboratorial.

Assim, é de salientar a importância deste ano na minha formação académica, neste que foi o laboratório que me acolheu de forma profissional e, também, humanista. Que me deu sempre margem para questionar e errar, com o propósito de crescer e me tornar uma profissional exemplar no futuro. Por estas razões e outras tantas, sou muito grata a toda a equipa do CGM por esta oportunidade.

## CAPÍTULO VI | Referências Bibliográficas

---

- [1] “THE CELL Molecular Biology of Sixth Edition,” 2015.
- [2] H. Harashima, N. Dissmeyer, and A. Schnittger, “Cell cycle control across the eukaryotic kingdom,” *Trends in Cell Biology*, vol. 23, no. 7. pp. 345–356, Jul. 2013. doi: 10.1016/j.tcb.2013.03.002.
- [3] R. Y. C. Poon, “Cell cycle control: A system of interlinking oscillators,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1342, pp. 3–19, Jan. 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-2957-3\_1.
- [4] J. Richard McIntosh, “Mitosis,” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 8, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a023218.
- [5] Z. Li and X. Zhang, “Kinases involved in both autophagy and mitosis,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 9. MDPI AG, Sep. 01, 2017. doi: 10.3390/ijms18091884.
- [6] R. L. Nussbaum, R. R. McInnes, H. F. Willard, and A. Hamosh, *Genetics In Medicine Seventh Edition*. 2007.
- [7] P. A. Hunt and T. J. Hassold, “Sex matters in meiosis,” *Science*, vol. 296, no. 5576. pp. 2181–2183, Jun. 21, 2002. doi: 10.1126/science.1071907.
- [8] B. de Massy, “Initiation of meiotic recombination: How and where? Conservation and specificities among eukaryotes,” *Annual Review of Genetics*, vol. 47. Annual Reviews Inc., pp. 563–599, 2013. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155423.
- [9] N. Hunter, “Meiotic recombination: The essence of heredity,” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no. 12, Dec. 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a016618.
- [10] D. F. C. M. Smeets, “Historical prospective of human cytogenetics: From microscope to microarray,” in *Clinical Biochemistry*, Elsevier Inc., 2004, pp. 439–446. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.03.006.
- [11] E. Experimental and D. E. Aula, “THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN I3y JOE HIN TJIO and iLBERT LEVAN,” 1956.
- [12] “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2005.
- [13] J. P. M. Geraedts and G. M. W. R. De Wert, “Preimplantation genetic diagnosis,” *Clinical Genetics*, vol. 76, no. 4. pp. 315–325, Oct. 2009. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01273.x.
- [14] J. R. Paulson, D. F. Hudson, F. Cisneros-Soberanis, and W. C. Earnshaw, “Mitotic chromosomes,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 117. Elsevier Ltd, pp. 7–29, Sep. 01, 2021. doi: 10.1016/j.semcd.2021.03.014.
- [15] T. Wako *et al.*, “Human metaphase chromosome consists of randomly arranged chromatin fibres with up to 30-nm diameter,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-65842-z.
- [16] K. Bloom and V. Costanzo, “Centromere Structure and Function,” *Progress in molecular and subcellular biology*, vol. 56. NLM (Medline), pp. 515–539, Jan. 01, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-58592-5\_21.
- [17] M. A. Giardini, M. Segatto, M. S. da Silva, V. S. Nunes, and M. I. N. Cano, “Telomere and telomerase biology,” in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Elsevier B.V., 2014, pp. 1–40. doi: 10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3.
- [18] S. L. Gersen and M. B. Keagle, “Clinical Cytogenetics SECOND EDITION EDITED BY Clinical Cytogenetics SECOND EDITION EDITED BY Includes Updated ISCN Guidelines,” 2005.
- [19] “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017.

- [20] T. S. K. Wan, E. K. C. Hui, and M. H. L. Ng, "Chromosome recognition," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1541, pp. 67–74, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6703-2\_7.
- [21] E. Jean McGowan-Jordan, O. Annet Simons, N. Michael Schmid, and K. Lumpur, "An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016) Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature Including New Sequence-Based Cytogenomic Nomenclature developed in collaboration with the Human Genome Variation Society (HGVS) Sequence Variant Description Working Group," 2016.
- [22] J. J. Zhu *et al.*, "C-banding and AgNOR-staining were still effective complementary methods to indentify chromosomal heteromorphisms and some structural abnormalities in prenatal diagnosis," *Mol Cytogenet*, vol. 12, no. 1, Sep. 2019, doi: 10.1186/s13039-019-0453-1.
- [23] Y. Van De Peer, E. Mizrachi, and K. Marchal, "The evolutionary significance of polyploidy," *Nature Reviews Genetics*, vol. 18, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 411–424, Jul. 01, 2017. doi: 10.1038/nrg.2017.26.
- [24] D. Massalska *et al.*, "Triploid pregnancy—Clinical implications," *Clinical Genetics*, vol. 100, no. 4. John Wiley and Sons Inc, pp. 368–375, Oct. 01, 2021. doi: 10.1111/cge.14003.
- [25] M. Barroso-Vilares and E. Logarinho, "Chromosomal instability and pro-inflammatory response in aging," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 182. Elsevier Ireland Ltd, Sep. 01, 2019. doi: 10.1016/j.mad.2019.111118.
- [26] S. Kojima and D. Cimini, "Aneuploidy and gene expression: Is there dosage compensation?," *Epigenomics*, vol. 11, no. 16. Future Medicine Ltd., pp. 1827–1837, 2019. doi: 10.2217/epi-2019-0135.
- [27] F. Taheri, H. Goudarzi, and E. Faghiloo, "Aneuploidy and oncoviruses," *Reviews in Medical Virology*, vol. 29, no. 6. John Wiley and Sons Ltd, Nov. 01, 2019. doi: 10.1002/rmv.2076.
- [28] J. Tosh, V. Tybulewicz, and E. M. C. Fisher, "Mouse models of aneuploidy to understand chromosome disorders," *Mammalian Genome*, vol. 33, no. 1. Springer, pp. 157–168, Mar. 01, 2022. doi: 10.1007/s00335-021-09930-z.
- [29] M. Mikwar, A. J. MacFarlane, and F. Marchetti, "Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age," *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, vol. 785. Elsevier B.V., Jul. 01, 2020. doi: 10.1016/j.mrrev.2020.108320.
- [30] F. Coppedè, "Risk factors for Down syndrome," *Archives of Toxicology*, vol. 90, no. 12. Springer Verlag, pp. 2917–2929, Dec. 01, 2016. doi: 10.1007/s00204-016-1843-3.
- [31] S. E. Antonarakis *et al.*, "Down syndrome," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 6, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41572-019-0143-7.
- [32] F. Z. Outtaleb, R. Errahli, N. Imelloul, G. Jabrane, N. Serbati, and H. Dehbi, "La trisomie 18 ou syndrome d'Edwards en post-natal: étude descriptive au Centre Hospitalier Universitaire de Casablanca et revue de littérature," *The Pan African medical journal*, vol. 37. NLM (Medline), p. 309, 2020. doi: 10.11604/pamj.2020.37.309.26205.
- [33] A. Cereda and J. C. Carey, "The trisomy 18 syndrome," 2012. [Online]. Available: <http://www.ojrd.com/content/7/1/81>

- [34] D. J. Adams and D. A. Clark, "Common Genetic and Epigenetic Syndromes," *Pediatric Clinics of North America*, vol. 62, no. 2. W.B. Saunders, pp. 411–426, 2015. doi: 10.1016/j.pcl.2014.11.005.
- [35] P. Bearely and R. Oates, "Recent advances in managing and understanding klinefelter syndrome [version 1; referees: 2 approved]," *F1000Research*, vol. 8. F1000 Research Ltd, 2019. doi: 10.12688/f1000research.16747.1.
- [36] M. Bonomi *et al.*, "Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism," *Journal of Endocrinological Investigation*, vol. 40, no. 2. Springer International Publishing, pp. 123–134, Feb. 01, 2017. doi: 10.1007/s40618-016-0541-6.
- [37] Z. Egertova and A. Stock Photo, "EJKGCT," 2017. [Online]. Available: [www.nhs.uk/Conditions/](http://www.nhs.uk/Conditions/)
- [38] M. Viuff, A. Skakkebaek, M. M. Nielsen, S. Chang, and C. H. Gravholt, "Epigenetics and genomics in Turner syndrome," *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, vol. 181, no. 1. Blackwell Publishing Inc., pp. 68–75, Mar. 01, 2019. doi: 10.1002/ajmg.c.31683.
- [39] C. H. Gravholt, M. H. Viuff, S. Brun, K. Stochholm, and N. H. Andersen, "Turner syndrome: mechanisms and management," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 15, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 601–614, Oct. 01, 2019. doi: 10.1038/s41574-019-0224-4.
- [40] S. Venkatesan, A. T. Natarajan, and M. P. Hande, "Chromosomal instability-mechanisms and consequences," *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 793. Elsevier B.V., pp. 176–184, Aug. 20, 2015. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.08.008.
- [41] B. Weckselblatt and M. K. Rudd, "Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements," *Trends in Genetics*, vol. 31, no. 10. Elsevier Ltd, pp. 587–599, Oct. 01, 2015. doi: 10.1016/j.tig.2015.05.010.
- [42] T. Kushnick, *Thompson & Thompson Genetics in Medicine (7th Edition)*. 1992.
- [43] J. Benet, M. Oliver-Bonet, P. Cifuentes, C. Templado, and J. Navarro, "Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: A review," *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 111, no. 3–4. pp. 281–290, 2005. doi: 10.1159/000086901.
- [44] S. J. Morin, J. Eccles, A. Iturriaga, and R. S. Zimmerman, "Translocations, inversions and other chromosome rearrangements," *Fertility and Sterility*, vol. 107, no. 1. Elsevier Inc., pp. 19–26, Jan. 01, 2017. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.013.
- [45] C. M. Moore and R. G. Best, "Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations," 2001. [Online]. Available: [www.els.net](http://www.els.net)
- [46] T. & Thompson, "GENETICS IN MEDICINE Seventh Edition," 2007.
- [47] R. Villoutreix, D. Ayala, M. Joron, Z. Gompert, J. L. Feder, and P. Nosil, "Inversion breakpoints and the evolution of supergenes," *Mol Ecol*, vol. 30, no. 12, pp. 2738–2755, Jun. 2021, doi: 10.1111/mec.15907.
- [48] C. L. Martin, B. E. Kirkpatrick, and D. H. Ledbetter, "Copy Number Variants, Aneuploidies, and Human Disease," *Clinics in Perinatology*, vol. 42, no. 2. W.B. Saunders, pp. 227–242, Jun. 01, 2015. doi: 10.1016/j.clp.2015.03.001.
- [49] A. Capalbo, L. Rienzi, and F. M. Ubaldi, "Diagnosis and clinical management of duplications and deletions," *Fertility and Sterility*, vol. 107, no. 1. Elsevier Inc., pp. 12–18, Jan. 01, 2017. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.11.002.

- [50] A. Macé, Z. Kutalik, and A. Valsesia, “Copy number variation,” in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2018, pp. 231–258. doi: 10.1007/978-1-4939-7868-7\_14.
- [51] K. Halahleh, R. P. Gale, and A. Nagler, “Isochromosome X in Myelodysplastic Syndrome,” *Acta Haematologica*, vol. 135, no. 1. S. Karger AG, pp. 37–38, Dec. 01, 2015. doi: 10.1159/000435829.
- [52] M. L. Sun *et al.*, “Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a small supernumerary marker chromosome (sSMC) inherited from her mosaic sSMC(15) mother and a literature review,” *Taiwan J Obstet Gynecol*, vol. 59, no. 6, pp. 963–967, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.tjog.2020.09.030.
- [53] T. Liehr, U. Claussen, and H. Starke, “Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans,” in *Cytogenetic and Genome Research*, 2004, pp. 55–67. doi: 10.1159/000079572.
- [54] Z. B. Abrams *et al.*, “CytoGPS: A web-enabled karyotype analysis tool for cytogenetics,” *Bioinformatics*, vol. 35, no. 24, pp. 5365–5366, Dec. 2019, doi: 10.1093/bioinformatics/btz520.
- [55] B. Levy and M. Stosic, “Traditional prenatal diagnosis: Past to present,” in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2019, pp. 3–22. doi: 10.1007/978-1-4939-8889-1\_1.
- [56] S. Dukhovny and M. E. Norton, “What are the goals of prenatal genetic testing?,” *Seminars in Perinatology*, vol. 42, no. 5. W.B. Saunders, pp. 270–274, Aug. 01, 2018. doi: 10.1053/j.semperi.2018.07.002.
- [57] C. H. Meller *et al.*, “Congenital heart disease, prenatal diagnosis and management,” *Arch Argent Pediatr*, vol. 118, pp. E149–E161, 2020, doi: 10.5546/aap.2020.eng.e149.
- [58] Peter Turnpenny Sian Ellard, “Emery’s Elements of Medical Genetics. 15th edition. Elsevier, 2017,” 2017.
- [59] Artigo, “Diário da República, 1. a série-N. o 75-17 de Abril de 2007,” 2007.
- [60] “AOG.0000000000001405-2,” 2016.
- [61] Z. Alfirevic, K. Navaratnam, and F. Mujezinovic, “Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis,” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2017, no. 9. John Wiley and Sons Ltd, Sep. 04, 2017. doi: 10.1002/14651858.CD003252.pub2.
- [62] N. C. Peddi, C. Avanthika, S. Vuppalapati, R. Balasubramanian, J. Kaur, and C. D. N., “A Review of Cordocentesis: Percutaneous Umbilical Cord Blood Sampling,” *Cureus*, Jul. 2021, doi: 10.7759/cureus.16423.
- [63] J. wei Wang *et al.*, “Cell-free fetal DNA testing and its correlation with prenatal indications,” *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 21, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12884-021-04044-5.
- [64] Y. Wang *et al.*, “Cell-free DNA screening for sex chromosome aneuploidies by non-invasive prenatal testing in maternal plasma,” *Mol Cytogenet*, 2020, doi: 10.1186/s13039-020-0478-5.
- [65] W. L. Cheng, C. H. Hsiao, H. W. Tseng, and T. P. Lee, “Noninvasive prenatal diagnosis,” *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2015. doi: 10.1016/j.tjog.2015.05.002.
- [66] G. Breveglieri, E. D’Aversa, A. Finotti, and M. Borgatti, “Non-invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA,” *Molecular Diagnosis and Therapy*. 2019. doi: 10.1007/s40291-019-00385-2.

- [67] J. E. Lai-Cheong, J. A. McGrath, and J. Uitto, “Revertant mosaicism in skin: Natural gene therapy,” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 17, no. 3. pp. 140–148, Mar. 2011. doi: 10.1016/j.molmed.2010.11.003.
- [68] B. A. Pletcher *et al.*, “Indications for genetic referral: A guide for healthcare providers,” *Genetics in Medicine*, vol. 9, no. 6. pp. 385–389, Jun. 2007. doi: 10.1097/GIM.0b013e318064e70c.
- [69] S. Z. Berisha, S. Shetty, T. W. Prior, and A. L. Mitchell, “Cytogenetic and molecular diagnostic testing associated with prenatal and postnatal birth defects,” *Birth Defects Research*, vol. 112, no. 4. John Wiley and Sons Inc., pp. 293–306, Mar. 01, 2020. doi: 10.1002/bdr2.1648.
- [70] T. Liehr, “Molecular Cytogenetics in the Era of Chromosomics and Cytogenomic Approaches,” *Frontiers in Genetics*, vol. 12. Frontiers Media S.A., Oct. 13, 2021. doi: 10.3389/fgene.2021.720507.
- [71] H. Frickmann *et al.*, “Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review,” *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 43, no. 3. Taylor and Francis Ltd, pp. 263–293, May 04, 2017. doi: 10.3109/1040841X.2016.1169990.
- [72] S. Omelon, J. Georgiou, and W. Habraken, “A cautionary (spectral) tail: Red-shifted fluorescence by DAPI-DAPI interactions,” *Biochem Soc Trans*, vol. 44, pp. 46–49, Feb. 2016, doi: 10.1042/BST20150231.
- [73] S. S. Xu, Z. Liu, Q. Zhang, Z. Niu, C. C. Jan, and X. Cai, “Chromosome painting by GISH and multicolor FISH,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1429, pp. 7–21, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-3622-9\_2.
- [74] A. S. Willis, I. van den Veyver, and C. M. Eng, “Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis,” *Prenatal Diagnosis*, vol. 32, no. 4. pp. 315–320, Apr. 2012. doi: 10.1002/pd.3860.
- [75] C. B. Moelans, L. Atanesyan, S. P. Savola, and P. J. van Diest, “Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA),” in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2018, pp. 537–549. doi: 10.1007/978-1-4939-7481-8\_27.
- [76] J. Bin Yan *et al.*, “Rapid screening for chromosomal aneuploidies using array-MLPA,” *BMC Med Genet*, vol. 12, May 2011, doi: 10.1186/1471-2350-12-68.
- [77] L. N. Sellner and G. R. Taylor, “MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions,” *Human Mutation*, vol. 23, no. 5. pp. 413–419, 2004. doi: 10.1002/humu.20035.
- [78] M. F. A. Funari and M. Br, “Análise de CNVs por MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification),” 2020. [Online]. Available: <https://www.mrcholland.com/products>
- [79] C. G. Bilancia, M. Ganapathi, and B. Levy, “Prenatal Diagnosis of Chromosome Abnormalities,” in *Fetal Medicine: Basic Science and Clinical Practice*, Elsevier, 2019, pp. 233-246.e3. doi: 10.1016/B978-0-7020-6956-7.00024-5.
- [80] G. Lippi, A. Von Meyer, J. Cadamuro, and A. M. Simundic, “Blood sample quality,” *Diagnosis*, vol. 6, no. 1, pp. 25–31, Mar. 2019, doi: 10.1515/dx-2018-0018.
- [81] “Meiosis,” *Nature*, vol. 146, no. 3700. pp. 433–434, 2015. doi: 10.1895/wormbook.1.178.1.
- [82] H. Xu, N. Wang, W. Cao, L. Huang, J. Zhou, and L. Sheng, “Influence of various medium environment to in vitro human T cell culture,” *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, vol. 54, no. 8, pp. 559–566, Sep. 2018, doi: 10.1007/s11626-018-0273-3.

- [83] J. M. Baust *et al.*, “Best practices in cell culture: an overview,” *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, vol. 53, no. 8, pp. 669–672, Sep. 2017, doi: 10.1007/s11626-017-0177-7.
- [84] M. Raulf, “T cell: Primary culture from peripheral blood,” in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2019, pp. 17–31. doi: 10.1007/978-1-4939-9591-2\_2.
- [85] C. K. Lincoln and M. G. Gabridget, “Cell Culture Contamination: Sources, Consequences, Prevention, and Elimination,” 1998.
- [86] M. A. Kisiel and A. S. Klar, “Isolation and culture of human dermal fibroblasts,” in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2019, pp. 71–78. doi: 10.1007/978-1-4939-9473-1\_6.
- [87] R. F. Wheater and S. H. Roberts, “An improved lymphocyte culture technique: Deoxycytidine release of a thymidine block and use of a constant humidity chamber for slide making,” *J Med Genet*, vol. 24, no. 2, pp. 113–114, 1987, doi: 10.1136/jmg.24.2.113.
- [88] S. E. Bates, “Classical Cytogenetics: Karyotyping Techniques,” in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 2011, pp. 177–190. doi: 10.1007/978-1-61779-201-4\_13.
- [89] I. Campos-Galindo, “Cytogenetics techniques,” in *Human Reproductive Genetics: Emerging Technologies and Clinical Applications*, Elsevier, 2020, pp. 33–48. doi: 10.1016/B978-0-12-816561-4.00003-X.
- [90] I. Molnár *et al.*, “Flow sorting of C-genome chromosomes from wild relatives of wheat *Aegilops markgrafii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. cylindrica*, and their molecular organization,” *Ann Bot*, vol. 116, no. 2, pp. 189–200, Aug. 2015, doi: 10.1093/aob/mcv073.
- [91] G. W. Shin, B. Chung, G. Y. Jung, and G. Y. Jung, “Multiplex ligase-based genotyping methods combined with CE,” *Electrophoresis*, vol. 35, no. 7, pp. 1004–1016, 2014, doi: 10.1002/elps.201300361.
- [92] T. Ogata *et al.*, “Turner Syndrome and Xp Deletions: Clinical and Molecular Studies in 47 Patients,” 2001.
- [93] P. Capkova, Z. Capkova, P. Rohon, K. Adamová, and J. Zapletalova, “Short stature and SHOX (Short stature homeobox) variants—efficacy of screening using various strategies,” *PeerJ*, vol. 8, Nov. 2020, doi: 10.7717/peerj.10236.
- [94] L. Liang *et al.*, “Turner syndrome with Xp deletions and rare endometrial abnormalities: A case report,” *Medicine (United States)*, vol. 100, no. 46, p. E27571, Nov. 2021, doi: 10.1097/MD.00000000000027571.
- [95] B. J. Ilagan *et al.*, “Maternal chromosome Xp deletion identified by prenatal cell-free DNA screening,” *Prenatal Diagnosis*, vol. 37, no. 9. John Wiley and Sons Ltd, pp. 935–937, Sep. 01, 2017. doi: 10.1002/pd.5103.
- [96] C. M. Armour, J. McGowan-Jordan, S. E. Lawrence, A. Lie Bouchard, M. Basik, and J. E. Allanson, “A patient with de-novo partial deletion of Xp (p11.4-pter) and partial duplication of 22q (q11.2-qter) Case report,” Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- [97] M. Poot and R. Hochstenbach, “Prevalence and Phenotypic Impact of Robertsonian Translocations,” *Molecular Syndromology*, vol. 12, no. 1. S. Karger AG, pp. 1–11, Mar. 01, 2021. doi: 10.1159/000512676.
- [98] M. Howard and M. Charalambous, “Molecular basis of imprinting disorders affecting chromosome 14: Lessons from murine models,” *Reproduction*, vol. 149,

- no. 5. BioScientifica Ltd., pp. R237–R249, May 01, 2015. doi: 10.1530/REP-14-0660.
- [99] T. Liehr, U. Claussen, and H. Starke, “Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans,” in *Cytogenetic and Genome Research*, 2004, pp. 55–67. doi: 10.1159/000079572.
- [100] M. Fukami, A. Seki, and T. Ogata, “SHOX Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Nonsyndromic Short Stature,” *Molecular Syndromology*, vol. 7, no. 1. S. Karger AG, pp. 3–11, Apr. 01, 2016. doi: 10.1159/000444596.
- [101] W. Jang *et al.*, “Identification of small marker chromosomes using microarray comparative genomic hybridization and multicolor fluorescent in situ hybridization,” *Mol Cytogenet*, vol. 9, no. 1, Aug. 2016, doi: 10.1186/s13039-016-0273-5.
- [102] S. Hu and X. Kong, “Molecular delineation of de novo small supernumerary marker chromosomes in prenatal diagnosis, a retrospective study,” *Taiwan J Obstet Gynecol*, vol. 62, no. 1, pp. 94–100, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.tjog.2022.06.018.
- [103] A. Plaja *et al.*, “Trisomy 18p caused by a supernumerary marker with a chromosome 13/21 centromere: A possible recurrent chromosome aberration,” *Am J Med Genet A*, vol. 161, no. 9, pp. 2363–2368, Sep. 2013, doi: 10.1002/ajmg.a.36102.
- [104] S. F. Witchel, “Disorders of sex development,” *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, vol. 48. Bailliere Tindall Ltd, pp. 90–102, Apr. 01, 2018. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.11.005.
- [105] R. Sekido, “The potential role of SRY in epigenetic gene regulation during brain sexual differentiation in mammals,” in *Advances in Genetics*, Academic Press Inc., 2014, pp. 135–165. doi: 10.1016/B978-0-12-800222-3.00007-3.
- [106] E. J. Jung *et al.*, “Female with 46, XY karyotype,” *Obstet Gynecol Sci*, vol. 60, no. 4, pp. 378–382, Jul. 2017, doi: 10.5468/ogs.2017.60.4.378.
- [107] B. Rein and Z. Yan, “16p11.2 Copy Number Variations and Neurodevelopmental Disorders,” *Trends in Neurosciences*, vol. 43, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 886–901, Nov. 01, 2020. doi: 10.1016/j.tins.2020.09.001.
- [108] K. J. Steinman *et al.*, “16p11.2 deletion and duplication: Characterizing neurologic phenotypes in a large clinically ascertained cohort,” *Am J Med Genet A*, vol. 170, no. 11, pp. 2943–2955, Nov. 2016, doi: 10.1002/ajmg.a.37820.
- [109] C. M. Taylor, R. Smith, and C. Lehman, “2 Recurrent Deletion,” 2009.
- [110] T. & Thompson, “GENETICS IN MEDICINE S e v e n t h E d i t i o n,” 2007.