



**MARTA COELHO  
PINTO**

**DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL CITOGÉNÉTICO:  
O IMPACTO DAS NOVAS TECNOLOGIAS**





**MARTA COELHO  
PINTO**

**DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL CITOGENÉTICO:  
O IMPACTO DAS NOVAS TECNOLOGIAS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Marques Carreira, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



## **o júri**

presidente

**Professora Doutora Helena Silva**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Joana Barbosa de Melo**

Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Professora Doutora Isabel Marques Carreira**

Professora Associada, com Agregação, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira**

Professora Associada, com Agregação, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Agradeço à Professora Doutora Isabel Marques Carreira, minha orientadora científica e diretora de serviço, a oportunidade de realização do trabalho no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC). Agradeço-lhe a disponibilidade, compreensão e amizade, assim como o seu exemplo de dinamismo e perseverança.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, co – orientadora do meu trabalho na Universidade de Aveiro, gostaria de expressar a minha gratidão pelo incentivo, compreensão e total disponibilidade, não só para a orientação do trabalho, como para a resolução de qualquer assunto relacionado com o curso de mestrado.

Aos meus colegas do LCG-FMUC agradeço a compreensão pelas minhas ausências, as salutares discussões e sugestões.

Aos amigos, muito obrigada pela vossa capacidade de compreender e desculpar algumas faltas.

Por fim, agradeço à minha família, pais, irmãs, Miguel, o amor, o incentivo e a confiança que depositam em mim. Obrigada pela vossa presença constante!





## palavras-chave

Diagnóstico pré-natal (DPN), líquido amniótico (LA), cariótipo, despiste rápido de aneuploidias (DRA), MLPA, FISH

## resumo

Os testes de despiste rápido das aneuploidias mais comuns (DRA) - dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y - são utilizados, como rotina, em diagnóstico pré-natal (DPN), como complemento do estudo do cariótipo. Para tal utiliza-se a FISH (*fluorescence in situ hybridization*) e o MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) que possibilitam diagnósticos que, embora direcionados, são mais rápidos, permitindo uma intervenção clínica mais atempada e reduzindo a ansiedade dos progenitores.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o impacto que a substituição do cariótipo pelas técnicas de DRA, como método preferencial de diagnóstico, teria no DPN, em todas ou, apenas, nalgumas indicações clínicas, com benefício de tempo e custos.

Procedeu-se ao estudo retrospectivo das amostras de líquido amniótico recebidas no laboratório, de 2006 a 2010. Comparou-se a capacidade de deteção das alterações, diagnosticadas pelo estudo convencional, pelas técnicas de DRA utilizadas no laboratório (FISH e MLPA) e avaliou-se a concordância de resultados entre o estudo do cariótipo e o MLPA, se ambos tivessem sido realizados, com sucesso, no total de amostras.

Das alterações previamente diagnosticadas pelo estudo convencional a FISH detetaria 61,4% e o MLPA 47,9%, embora em 8,5% levantasse a suspeita de alteração. Sendo ambas metodologias direcionadas, o MLPA é mais económico em termos de tempo e custos. No estudo que avalia a concordância entre o cariótipo e MLPA, considerando o total de amostras, o primeiro teria identificado 241 alterações cromossómicas. O MLPA detetaria 117 (48,5%) destas alterações e em 8,3% levantaria a suspeita de alteração. A percentagem de concordância entre as duas metodologias foi de 98,5%, com 1,5% de resultados falsos negativos, sendo que, destes, 41,3% apresentavam risco elevado ou desconhecido de associação a manifestações fenotípicas. As várias indicações para o teste, individualmente, revelaram valores variáveis de falsos negativos: entre 1% (nas idades maternas avançadas) e 53,1% nos casos em que um dos progenitores é portador de alteração. Estes resultados eram antecipados e estão em concordância com outros já reportados.

Embora as técnicas de DRA apresentem grande sensibilidade para despistar as aneuploidias comuns, sejam económicas e permitam um resultado mais rápido, a sua aplicação em substituição do cariótipo implicaria falhas de diagnóstico, com prejuízo emocional e económico para as famílias e, também, para o próprio Estado. São, no entanto, tecnologias complementares importantes para o diagnóstico



**keywords**

Prenatal diagnosis (PD), amniotic fluid (AF), karyotype, rapid aneuploidy testing (RAT), MLPA, FISH

**abstract**

Rapid common aneuploidy testing (RAT) – for chromosomes 13, 18, 21, X and Y - are widely used in prenatal diagnosis (PD) as a complement of karyotyping. FISH (fluorescence *in situ* hybridization) and MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) can be used for that purpose. Although designed for detection of specific chromosomes, both enable faster results, allowing earlier clinical intervention and reducing parental anxiety.

The aim of this work was to evaluate the impact of karyotyping substitution, by RAT, in PD as a stand-alone test for all the referrals or just for certain ones, with costs and time benefits.

The amniotic fluid (AF) samples received in the laboratory, from 2006 to 2010, were reviewed. FISH and MLPA ability to detect alterations, previously diagnosed by conventional cytogenetics, was compared. Was, also, determined the concordance between results that would have been obtained, by karyotyping and MLPA, if both were applied, successfully, to all the AF samples.

From the known diagnosed alterations (by karyotyping) FISH would have identified 61,4% and MLPA 47,9%. In 8,5% of samples MLPA also suspected the presence of abnormality. Being both designed for detection of specific chromosomes, MLPA is more cost and time effective than FISH. Concerning to the study that determines the concordance between karyotype and MLPA results, considering all the samples, the first would have identified 241 chromosome alterations. The MLPA would have detected 117 (48,5%) of these and, in 8,3% of cases, a suspicion of alteration would have existed. The concordance between the two technologies was 98,5%, with 1,5% of false negative results, having 41,3% of the latter a high or unknown clinical significance. The referrals for the prenatal study, analysed individually, revealed variable values of false negative results: ranging from 1% (in advanced maternal age) to 53,1% in cases where one of the parents was a carrier. These results were expected and are in agreement with those previously reported.

The RAT techniques are highly sensitive for the common aneuploidies, are economic and provide faster results. Although, their application in substitution of traditional karyotyping will, also, lead to a wrong diagnosis, with emotional and economic prejudice for not only the affected child's family but also for the State. These techniques are useful and they should be applied as a diagnostic complement.



## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Índice de Figuras</b>	iii
<b>Índice de Tabelas</b>	v
<b>Lista de Abreviaturas</b>	vii
<b>Capítulo 1 Introdução</b>	1
1.1 Diagnóstico Pré-Natal	2
1.2 Os cromossomas	5
1.3 Alterações cromossómicas	9
1.4 Citogenética	14
1.5 Evolução na Citogenética Humana	19
<b>Capítulo 2 Objetivos</b>	23
<b>Capítulo 3 Materiais e Métodos</b>	25
3.1 Estudo	26
3.2 Amostras	26
3.3 Citogenética Convencional	27
3.4 Hibridização <i>in situ</i> em amniócitos não cultivados	29
3.5 MLPA ( <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> )	32
3.5.1 <i>SALSA MLPA kit P095-A2 Aneuploidy</i>	34
3.6 Classificação das alterações cromossómicas	35
<b>Capítulo 4 Resultados</b>	37
<b>Capítulo 5 Discussão</b>	51
<b>Capítulo 6 Conclusão e Perspetivas Futuras</b>	65
<b>Capítulo 7 Bibliografia</b>	73



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Legenda</b>	<b>pág.</b>
1	Estrutura do cromossoma	7
2	Cariograma com os cromossomas organizados por grupos	8
3	Ideogramas do cromossoma 4, com vários níveis de resolução	9
4	Alterações cromossómicas estruturais	12
5	Mecanismos mais comuns de formação do cromossoma em anel e do isocromossoma	14
6	Análise de marcadores polimórficos por QF-PCR	18
7	Representação esquemática das várias etapas do processamento das amostras na citogenética convencional	28
8	Cariograma de um feto do sexo masculino, com bandas GTG	29
9	Localização das sondas do painel <i>AneuVysion</i> e respetivas cores de marcação	30
10	Ilustração das diferentes etapas da FISH	31
11	Núcleos em interfase mostrando os sinais de hibridização de um feto do sexo masculino com síndrome de Down	32
12	Etapas da reação de MLPA	33
13	Descrição das sondas do painel P095 e sua localização nos cromossomas	34
14	Indicações para o diagnóstico pré-natal citogenético das 7089 análises de LA realizadas no período de 2006 a 2010	38
15	Quadro resumo dos resultados obtidos nas 7089 amostras de LA recebidas no LCG-FMUC	39





## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Legenda</b>	<b>pág.</b>
1	Indicações para estudo citogenético de Líquidos Amnióticos	27
2	Classificação das alterações cromossômicas, de acordo com o significado clínico	35
3	Amostras de LA (com resultados normais e com alteração) de acordo com a indicação para o teste	40
4	Resumo das alterações numéricas encontradas nas amostras de LA	42
5	Resumo das alterações estruturais encontradas nas amostras de LA	43
6	Resumo das alterações numéricas e estruturais, em simultâneo, encontradas nas amostras de LA	43
7	Capacidade de detecção das 236 alterações pelas técnicas de DRA	44
8	Cálculo da percentagem de concordância e de falsos negativos entre o estudo convencional e a técnica de MLPA nos 7035 casos	47
9	Significado clínico das alterações encontradas nos 104 casos de falsos negativos	48



## LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH - *Microarray-based comparative genomic hybridization*

AC – alteração cromossômica

ACIU – atraso de crescimento intra-uterino

AFP - *alfa fetoprotein*

ANC – amniócitos não cultivados

CBG – Banda C

CNV – *copy number variation*

Cr - cromossoma

dn – *de novo*

DRA – despiste rápido de aneuploidias

DUP – dissomia uniparental

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*

GTG – Banda G

$\beta$ -hCG - *human chorionic gonadodrophin*

HUGO – *Human Genome Organization*

IMA – idade materna avançada

LA – líquido amniótico

MLPA – *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

NOR - *nucleolar organizer regions*

PAPP-A - *pregnancy-associated protein A*

PCR – *Polymerase chain reaction*

QF-PCR - *Quantitative fluorescent polymerase chain reaction*

STRs – *short tandem repeats*

TN – translucência da nuca

uE3 - *unconjugated estriol*

wcp – *whole chromosome painting*



**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO**

## 1.1 DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL (DPN)

O termo diagnóstico pré-natal refere-se a todas as modalidades de diagnóstico que permitam obter informação acerca do embrião ou feto. Na sua utilização mais comum o termo refere-se à identificação, no período pré-natal, de doenças genéticas (Wieacker e Steinhard, 2010).

O diagnóstico pré-natal (DPN) adquiriu relevância em 1966, quando Steele e Breg mostraram que a constituição cromossômica do feto podia ser determinada pela análise de células, obtidas a partir da cultura de líquido amniótico (LA). Uma vez que a relação entre a idade materna avançada e o risco acrescido de síndrome de Down era já reconhecida, aquela descoberta promoveu o desenvolvimento e implementação do DPN na prática clínica (Nussbaum et al, 2004).

A possibilidade de detetar alterações no feto, no período pré-natal, permite aos progenitores a decisão informada acerca da progressão daquela gestação e, no caso da não interrupção, possibilita a preparação psicológica do casal, assim como do parto e acompanhamento pós-natal de uma criança afetada. Permite também, em casais com elevado risco de gerarem um feto com determinada patologia, e que de outro modo não arriscariam uma gravidez, a possibilidade de iniciarem uma gestação com o conhecimento de que a presença ou ausência dessa patologia será determinada (Nussbaum et al, 2004).

A par do desenvolvimento do DPN verificou-se, também, uma evolução nas técnicas utilizadas na terapia fetal. Atualmente é possível intervir na correção de algumas anomalias congénitas (malformações cardíacas, como a estenose pulmonar, hérnia diafragmática congénita ou obstruções do trato urinário, por exemplo) antes ainda do nascimento (Nussbaum et al, 2004).

O conhecimento de que as mulheres com mais de 35 anos apresentam um risco aumentado de aneuploidia fomentou o desenvolvimento dos métodos de rastreio.

Gestações com aneuploidia fetal estão associadas a concentrações alteradas de certos marcadores serológicos maternos, incluindo a AFP (*alfa fetoprotein*),  $\beta$ -hCG livre (*human chorionic gonadodrophin*), PAPP-A (*pregnancy-associated protein A*), inibina A e uE3 (*unconjugated estriol*). Para a trissomia 21 a taxa de deteção é de 60- 65%, no rastreio incluindo a idade materna e os marcadores AFP e  $\beta$ -hCG livre (teste duplo), aumentando para 70-75% se incluir também a inibina A e o uE3 (teste quadruplo) (Nicolaidis, 2010).

A medição da translucência da nuca (TN), resultante da acumulação de fluido subcutâneo na parte posterior do pescoço do feto, constitui outro método de rastreio para a trissomia 21 e outras aneuploidias. O valor da TN encontra-se aumentado naquelas alterações, estando igualmente associado a defeitos cardíacos e a um conjunto de malformações fetais e síndromes genéticas (Nicolaidis, 2010).

O período ideal para a medição da TN ocorre entre as 11 e as 13 semanas e 6 dias. Nesta altura existem igualmente outros marcadores ecográficos, sensíveis para o rastreio da trissomia 21, como a medição do osso nasal, o exame Doppler para a válvula tricúspide e *ductus venosus* e o cálculo do ângulo facial (Wieacker e Steinhard, 2010).

A medição dos marcadores bioquímicos, da TN e de outros marcadores ecográficos, juntamente com a idade materna, constituem o rastreio combinado do primeiro trimestre para o cálculo de risco de trissomia 21. Este rastreio tem-se mostrado igualmente importante na determinação dos riscos de outras aneuploidias, como as trissomias dos cromossomas 13 e 18 e de triploidias (Nicolaidis, 2010).

No rastreio ecográfico do segundo trimestre é possível identificar outras alterações, uma vez que determinadas cromossomopatias apresentam um padrão específico de alterações detetáveis. Cerca de metade das alterações cromossómicas raras revelam anomalias fetais na ecografia, como malformações cardíacas e cerebrais, restrição de crescimento (mais comum nas deleções) e higroma cístico, hidropsia e TN aumentada (frequentemente associadas a trissomias e duplicações) (Gardner e Sutherland, 2004).

Os parâmetros acima referidos permitem, de forma não invasiva, o cálculo do risco associado a certas cromossomopatias, numa gestação. Contudo, tratando-se de métodos de rastreio, não permitem o diagnóstico nem a exclusão da existência de uma alteração cromossómica.

Através de procedimentos invasivos é possível recolher amostras de material fetal e, assim, analisar os cromossomas. A colheita de líquido amniótico através da amniocentese tem sido, desde há várias décadas, a metodologia preferencial. No entanto, outras técnicas têm vindo a ser desenvolvidas, desde a colheita de amostras de vilosidades coriônicas, de sangue fetal (através de cordocentese), diagnóstico pré-implantatório (na sequência de fertilização *in vitro*), até outras metodologias, ainda em fase experimental (como a análise de DNA fetal presente na circulação materna) (Gardner e Sutherland, 2004).

A utilização destes procedimentos está associada a risco de perda fetal, pelo que a sua utilização está indicada apenas para alguns grupos de risco. O diagnóstico pré-natal invasivo é atualmente recomendado em gestações de grávidas com idade igual ou superior a 35 anos, após deteção de malformações ecográficas ou quando surgem sinais ecográficos de alerta (como a TN aumentada), após rastreio bioquímico positivo, em casais portadores de cromossomopatia ou a casais a quem foi detetada uma alteração cromossómica fetal numa gestação anterior ou que tenham um filho anterior com cromossomopatia, em situações de elevada ansiedade materna ou sempre que é recolhido líquido amniótico para outro teste de diagnóstico.

A amniocentese é a tecnologia mais utilizada, sendo realizada preferencialmente entre as 15 e as 17 semanas de gestação e constitui um procedimento seguro para o feto e para a mãe, não existindo descrições de complicações maternas ou fetais resultantes de trauma direto. A cultura de células de líquido amniótico apresenta uma elevada taxa de sucesso e representa uma fonte fiável de material fetal. É, no entanto, necessário considerar a possibilidade de contaminação com material materno, resultante do próprio procedimento, embora esta não ocorra com grande frequência, bem como a possibilidade de mosaicos fetais de baixa expressão não serem detetados, uma vez que apenas um pequeno número de células é recolhido e examinado (Gardner e Sutherland, 2004).

As desvantagens deste procedimento residem no risco de perda fetal que varia entre 0,5 e 1% e no tempo que decorre até à obtenção dos resultados, entre as 15 a 21 dias (Gardner e Sutherland, 2004).

A recolha de amostras de vilosidades coriónicas constitui um procedimento do primeiro trimestre, sendo realizado preferencialmente às 10-11 semanas de gestação. Por ser realizado mais cedo, permite uma intervenção mais precoce, o que constitui uma vantagem, principalmente em grupos de risco elevado. Dificuldades relacionadas com este procedimento resultam, principalmente, da contaminação materna e da ocorrência de mosaicismo confinado à placenta. O risco de perda fetal é superior ao da amniocentese, variando entre os 1 e 2%; contudo, trata-se de um procedimento relativamente seguro, quando realizado por profissionais experientes (Gardner e Sutherland, 2004).

A cordocentese constitui o procedimento utilizado para obter uma amostra de sangue fetal, diretamente do cordão umbilical, sendo realizada, normalmente, entre as 19 e as 21 semanas (Nussbaum et al, 2004). É de grande importância quando é necessário um



resultado rápido tarde na gestação, por exemplo após detecção de malformações na ecografia morfológica, entre as 20 e as 22 semanas (Wieacker e Steinhard, 2010). O resultado é obtido entre 3 a 5 dias, o que permite uma intervenção dentro do prazo legal para a interrupção médica da gravidez, que decorre até às 24 semanas de gestação.

Sempre que uma grávida é referida para DPN invasivo é dever dos clínicos informar, de forma clara, as vantagens e limitações dos testes envolvidos. De igual modo, se uma alteração é detetada, é necessário discutir detalhadamente com a grávida/ casal as implicações dessa anomalia para que o(s) progenitor(s) possa(m) tomar uma decisão, de forma completamente autónoma, acerca da progressão, ou não, da gestação.

## **1.2 OS CROMOSSOMAS**

O genoma humano é constituído por 46 cromossomas, organizados em 23 pares (22 autossomas e um par de cromossomas sexuais). Em cada par um dos cromossomas (homólogo) é herdado da mãe e outro do pai (Gardner e Sutherland, 2004).

É durante a mitose, particularmente em pro-metáfase ou metáfase, que os cromossomas, face ao grau de condensação, são observados ao microscópio ótico; nas restantes etapas do ciclo celular apresentam-se despiralizados no núcleo (Gardner e Sutherland, 2004).

A primeira observação de cromossomas remonta ao séc. XIX. Contudo, só a partir de 1952, após um ocasional mas devidamente documentado “erro” de laboratório (em que as células foram lavadas com uma solução altamente hipotónica), foi possível observar, com clareza, os cromossomas humanos. Em 1955 relacionou-se, pela primeira vez, o complemento cromossómico com a condição clínica, quando Lejeune e seus colaboradores verificaram a existência de um cromossoma extra em pacientes com síndrome de Down (Gardner e Sutherland, 2004). Em 1959 foi reportada a monossomia do cromossoma X em pacientes com síndrome de Turner, por Ford e colaboradores e, no mesmo ano, Jacobs e Strong associaram a constituição cromossómica 47,XXY com a síndrome de Klinefelter. Em 1960 foram reportadas duas novas síndromes trissómicas que adotaram os nomes dos respetivos autores: síndrome de Patau e síndrome de Edwards (trissomia do cromossoma 13 e 18, respetivamente) (Smeets, 2004). Em 1963 foi identificado, por Lejeune e

colaboradores, a primeira síndrome de deleção herdada – síndrome de *Cri du chat* (OMIM #123450) (Trask, 2002).

Os cromossomas apresentam uma estrutura linear, constituída por dois braços, separados pelo centrómero. O braço mais curto é designado por **p** (do francês *petit*) e o braço longo por **q** (Fig.1) (Gardner e Sutherland, 2004).

O centrómero, ou constrição primária, é uma região especializada do DNA, cuja heterocromatina contém DNA satélite (Gardner e Sutherland, 2004). Na terminação da prófase formam-se, em cada centrómero, complexos multiproteicos – os cinetocoros - responsáveis pela ligação entre os microtúbulos constituintes do fuso mitótico e os cromossomas. Na anafase, os microtúbulos do cinetocoro acionam a separação dos cromátídeos, promovendo a segregação dos cromossomas (Strachan e Read, 2011).

As extremidades dos cromossomas são seladas e protegidas pelos telómeros, constituídos por várias repetições da sequência TTAGGG, que previnem a degradação da cromatina e a sua fusão com a de outros cromossomas (Gardner e Sutherland, 2004). Durante a síntese de DNA a enzima DNA polimerase é insuficiente para que ocorra a replicação completa na região dos telómeros, que sofrem uma redução a cada ciclo de divisão. Estas reduções limitam o ciclo de vida da célula, determinando o fim da sua capacidade de divisão e atuando como “relógios biológicos”. A manutenção dos telómeros é conseguida, durante a divisão celular, por uma ribonucleoproteína com atividade de transcriptase reversa – a enzima telomerase (Nussbaum et al, 2004). Em humanos o tamanho dos telómeros é muito variável e a atividade da telomerase significativamente diminuída nas células adultas, com exceção de células específicas, existentes em tecidos altamente proliferativos (ex. sangue, gónadas, intestino). Esta diminuição, com o consequente encurtamento progressivo dos telómeros, tem sido relacionada com a senescência celular e envelhecimento (Strachan e Read, 2011).

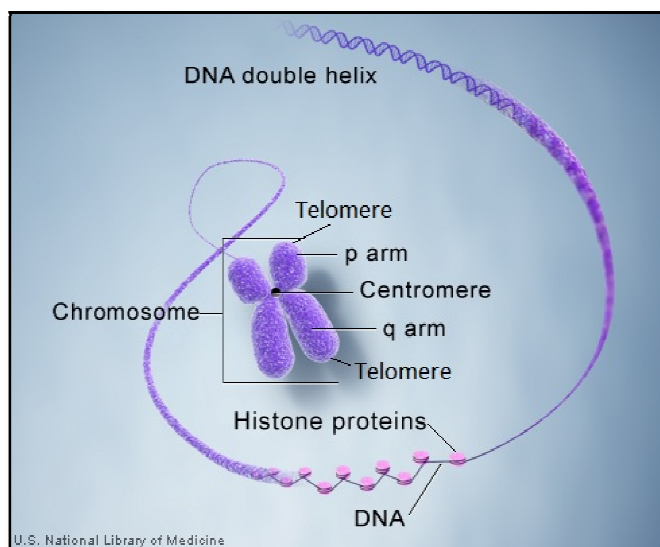


Figura 1 – Estrutura do cromossoma (adaptado do site <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/chromosome>)

É a constituição cromossômica de um indivíduo (ex. 46,XX) que se atribui a designação de cariótipo, sendo a imagem da sua representação, com os cromossomas organizados em pares, o cariógrama (Strachan e Read, 2011). Nestes, os cromossomas são classificados de acordo com a posição do centrómero, tamanho e padrão de bandas (Fig.2). No que respeita ao primeiro critério, são considerados metacêntricos os cromossomas com o centrómero localizado praticamente a meio do seu comprimento (Fig.2, grupo F), acrocêntricos, aqueles em que centrómero se encontra muito próximo de uma das extremidades do cromossoma (Fig.2, grupo D) e submetacêntricos, os cromossomas cujo posicionamento do centrómero permite a identificação de dois braços, com comprimentos diferentes (Fig.2, grupo C) (Cross e Wolstenholme, 2001). O ISCN 2009 (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) distribui os cromossomas (cr) por 7 grupos, de A a G, estando o cromossoma X, face às suas características, alocado no grupo C e o cromossoma Y, apesar de metacêntrico, integrado no grupo G (pequenos acrocêntricos) (Shaffer et al, 2009).

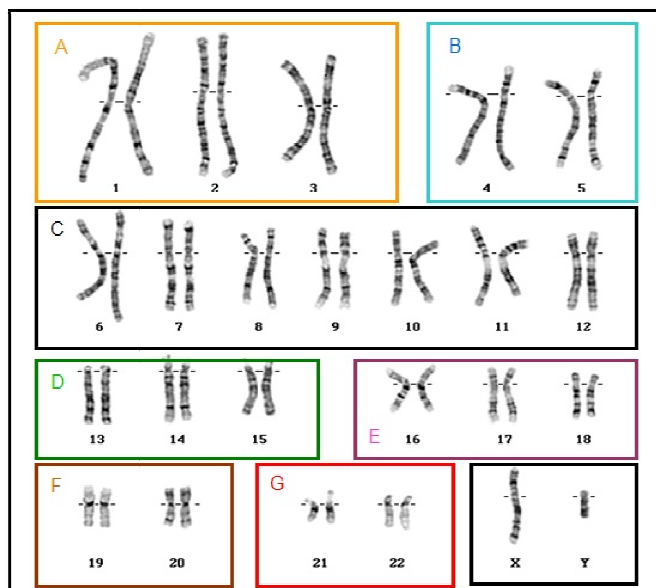


Figura 2 – Cariograma com os cromossomos organizados em sete grupos, de A a G, de acordo com o seu tamanho e posição do centrómero (adaptado do site <http://www.biorede.pt/page.asp?id=276>)

Após coloração, os cromossomos apresentam um padrão de bandas, únicas para cada par. Cada banda é definida pelo ISCN como sendo uma parte do cromossoma que se distingue claramente dos segmentos adjacentes, aparecendo clara ou escura na bandagem (GTG, por exemplo) (Shaffer et al, 2009). Foi com base neste padrão que o ISCN definiu a nomenclatura de referência para a citogenética.

Cada cromossoma é dividido em várias regiões, numeradas sequencialmente a partir do centrómero; 4q2, por exemplo, refere-se à região 2 do braço longo do cromossoma 4. Cada banda, existente numa região, é numerada em sequência sendo que a 1 representa a banda mais próxima do centrómero (designado como q10); 4q21 refere-se, portanto, à banda 1 da região 2 do braço longo do cromossoma 4. O aumento do poder de resolução das técnicas de bandagem permitiu subdividir as bandas em sub-bandas. Por convenção é adicionado um ponto entre a banda e a sub-banda - 4q21.2. Nalgumas situações poderá ser necessário adicionar um novo número para definir bandas entre as sub-bandas (Fig.3) (Cross e Wolstenholme, 2001).

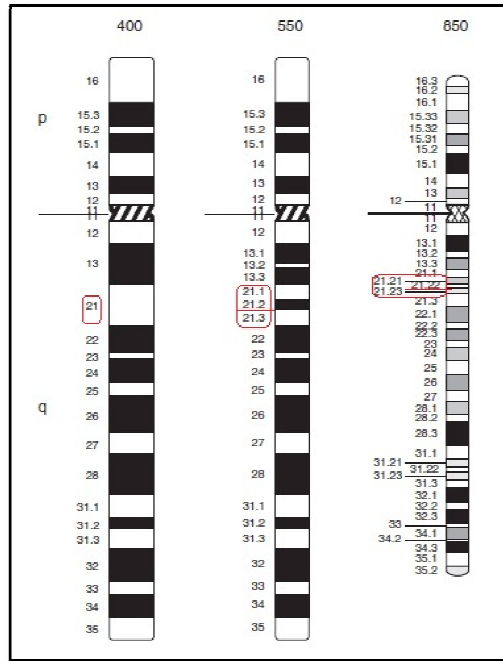


Figura 3 – Ideogramas do cromossoma 4, com vários níveis de resolução (400 a 850 bandas) (adaptado, ISCN 2009 (Shaffer et al, 2009))

### 1.3 ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As alterações cromossômicas, numéricas e estruturais, são detetadas em cerca de 1% dos recém-nascidos e metade delas tem implicações fenotípicas. Estas são, em grande parte, a causa de atraso mental e, em muitos casos, de malformações estruturais que causam deficiência física e funcional. Por vezes só na adolescência ou na idade adulta são detetadas, quando não ocorre um normal desenvolvimento pubertário ou quando é reconhecida a infertilidade (Gardner e Sutherland, 2004).

Uma alteração cromossômica presente no momento da concepção (tendo origem num erro da meiose, na gametogénese) e que envolve todos os tecidos diz-se alteração constitucional. Se, pelo contrário, existe apenas em alguns tecidos, tendo resultado provavelmente de um erro pós-zigótico (ocorrido na mitose), diz-se alteração em mosaico. Nestes casos, a influência da alteração no fenótipo depende do tecido afetado e da percentagem de alteração nesse tecido (Gardner e Sutherland, 2004).

As cromossomopatias podem dever-se a uma alteração no número (alteração numérica) ou estrutura dos cromossomas (alteração estrutural) e podem envolver um ou mais autossomas, cromossomas sexuais ou ambos.

Uma aneuploidia trata-se de uma alteração numérica envolvendo o ganho (trissomia) ou perda (monossomia) de um cromossoma. Ocorre por não-disjunção na meiose ou na mitose ou, ainda, por atraso na migração do cromossoma durante a anafase (*anafase lagging*), sendo a não-disjunção meiótica o mecanismo mais comum (Teixeira e Carreira, 2005). Representa a forma mais frequente das anomalias cromossômicas, sendo a maior causa de aborto espontâneo e morte neonatal (Nicolaidis, 2011).

O risco de aneuploidia numa gestação aumenta com a idade da grávida, por ser mais elevada, também, a predisposição para a não-disjunção na meiose I (Gardner e Sutherland, 2004). O risco estimado para a ocorrência de fetos com trissomias dos cromossomas 21, 18 e 13, em mulheres com 20 anos às 12 semanas de gestação é de cerca de 1/1000, 1/2500 e 1/8000, respetivamente. O mesmo risco, calculado para mulheres com 35 anos, é de 1/250, 1/600 e 1/1800 (Nicolaidis, 2011).

A alteração numérica pode, igualmente, envolver todo o complemento cromossômico sendo a situação mais frequente a triploidia ( $3n$ ), embora tenham já sido reportadas situações de tetraploidia ( $4n$ ). Ambas as situações resultam em abortos espontâneos ou, no caso das triploidias, em morte neonatal (Nussbaum et al, 2004).

As trissomias dos cromossomas 13 (síndrome de Patau), 18 (síndrome de Edwards), 21 (síndrome de Down) e a monossomia do cromossoma X (síndrome de Turner) constituem as aneuploidias mais comuns, juntamente com as triploidias e a síndrome de Klinefelter (47,XXY), representam 80% das alterações cromossômicas, com significado clínico, detetadas em pré-natal (Faas et al, 2011).

Os rearranjos estruturais poderão existir na forma equilibrada ou desequilibrada. Na forma equilibrada toda a informação genética está presente, embora organizada de modo diferente. Estas alterações estão, na maioria dos casos, associadas a fenótipos normais, embora representem um risco acrescido para a descendência, uma vez que os seus portadores podem produzir gâmetas desequilibrados (Teixeira e Carreira, 2005).

Os rearranjos equilibrados poderão, contudo, estar associados a fenótipos patológicos. Apesar de toda a informação estar presente a alteração da sua organização poderá interferir com alguma sequência genética importante (Teixeira e Carreira, 2005), provocando a disrupção do gene ou a sua ativação/ inativação inapropriada (Gardner e Sutherland, 2004).

São rearranjos equilibrados as inversões (Fig.4), que ocorrem quando um cromossoma sofre duas quebras e o segmento entre elas é recolocado numa sequência invertida. Se incluem o centrómero dizem-se pericêntricas; se ocorrem num dos braços do cromossoma, não envolvendo o centrómero, são paracêntricas (Teixeira e Carreira, 2005).

As inserções (Fig.4), outro tipo de alteração cromossômica equilibrada, implicam a ocorrência de três quebras, sendo um segmento removido da sua posição original e inserido noutra cromossoma, podendo a sua orientação ser direta ou invertida (Teixeira e Carreira, 2005).

As translocações (Fig.4) envolvem a troca de segmentos entre cromossomas não-homólogos e podem classificar-se em dois tipos: recíprocas e Robertsonianas. Nas primeiras, uma vez que a troca é recíproca, o número total de cromossomas não é alterado. São relativamente comuns tendo uma incidência de cerca de 1/500 recém-nascidos (Teixeira e Carreira, 2005).

As translocações Robertsonianas envolvem dois cromossomas acrocêntricos que se fundem próximo do centrómero, com perda dos seus braços curtos. Apesar do cariótipo resultante ser constituído, apenas, por 45 cromossomas a fusão destes não é, geralmente, nociva para os portadores. Os braços curtos dos acrocêntricos codificam para RNA ribossómico e apenas 6 a 8 dessas regiões precisam de estar ativas para um correto funcionamento (Teixeira e Carreira, 2005).

O problema das translocações é o inerente a todos os rearranjos equilibrados: estão associados a um elevado risco de originarem gâmetas desequilibrados e, conseqüentemente, descendência afetada. As translocações Robertsonianas são de grande relevância clínica, principalmente quando envolvem o cromossoma 21, uma vez que os seus portadores apresentam um risco elevado de gerar descendência com síndrome de Down, possuindo 46 cromossomas (Nussbaum et al, 2004). Na meiose I, de portadores de translocações, os cromossomas com segmentos em comum formam uma estrutura quadrivalente. Na anafase a segregação pode ocorrer de várias maneiras diferentes - alternada, adjacente I ou II, 3:1 ou 4:0 - determinando a distribuição dos homólogos nos gâmetas. Na segregação alternada cada centrómero do quadrivalente é atraído, alternadamente, para polos opostos, produzindo gâmetas normais e gâmetas com a alteração estrutural equilibrada. Este tipo de segregação é o único que permite, a portadores de translocações, gerar descendência normal. Da segregação adjacente, 3:1 e

4:0 resultam sempre gâmetas desequilibrados. Na adjacente I os centrômeros homólogos são atraídos para polos opostos e, na adjacente II, para o mesmo polo. Na segregação 3:1 três dos cromossomas são atraídos para uma célula e um para outra e no tipo 4:0 todos os cromossomas são segregados para a mesma célula (Gardner e Sutherland, 2004).

Nos rearranjos desequilibrados citogenéticos – deleções, duplicações, cromossomas em anel, isocromossomas e cromossomas dicêntricos - por ocorrer ganho ou perda de informação genética, o fenótipo é geralmente afetado.

As deleções (Fig.4) envolvem a perda de um segmento cromossômico, sendo comparáveis a monossomias parciais. O portador de uma deleção, com um homólogo normal e outro deletado, é monossômico para a informação genética constante nesse segmento apresentando, normalmente, haploinsuficiência para o gene(s) afetado(s). As consequências clínicas dependem do tamanho do segmento deletado e do número e função dos genes nele presentes (Nussbaum et al, 2004).

Duplicações (Fig.4) envolvem ganho de um segmento cromossômico, constituindo trissomias parciais e, geralmente, apresentam um efeito menos devastador que as deleções (Nussbaum et al, 2004).

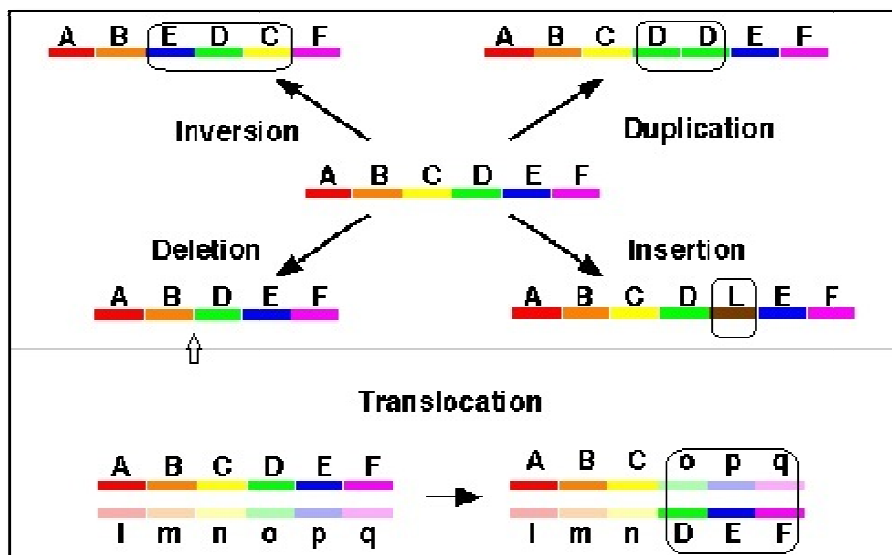


Figura 4 – Alterações cromossômicas estruturais (adaptado do site [http://carolguze.com/text/442-5-chromosome\\_abnormalities.shtml](http://carolguze.com/text/442-5-chromosome_abnormalities.shtml))



As deleções e as duplicações têm muitas vezes origem em portadores de alterações estruturais equilibradas, como por exemplo inversões e translocações recíprocas, após segregação anómala (Teixeira e Carreira, 2005). A segregação do tipo 3:1 em portadores de translocações pode, também, dar origem a cromossomas derivativos na descendência, que são definidos, de acordo com o ISCN 2009, como cromossomas estruturalmente alterados resultantes de rearranjo envolvendo dois ou mais cromossomas ou por múltiplas alterações num único cromossoma (Shaffer et al, 2009).

Os cromossomas em anel (Fig.5) são resultantes, normalmente, de duas quebras com perda da porção distal de um cromossoma seguida de fusão das duas extremidades coesivas, numa estrutura em anel. Com o centrómero incluído na estrutura os anéis deveriam ser estruturas estáveis, contudo apresentam instabilidade mitótica, estando sujeitos a quebra mecânica. Os cromossomas em anel são raros, embora tenham já sido detetados em todos os cromossomas (Nussbaum et al, 2004). Por envolverem perda de segmentos cromossómicos os anéis estão associados a situações de deleção, pelo que os fenótipos dos seus portadores apresentam normalmente malformações e atraso mental (Teixeira e Carreira, 2005).

Os isocromossomas (i) (Fig.5) constituem uma duplicação, em espelho, de um dos braços do cromossoma, estando o outro braço ausente. Os portadores são monossómicos para a região ausente e trissómicos para o conteúdo do braço envolvido na formação do isocromossoma. Embora tenham sido descritos para vários autossomas os mais comuns envolvem os braços curtos dos cromossomas 18, i(18p), 12, i(12p) e braço longo do cromossoma X, i(Xq). Praticamente todos os isocromossomas têm origem materna, sendo resultantes da não-disjunção na meiose II, seguida de uma divisão centromérica transversal (Teixeira e Carreira, 2005).

Um cromossoma dicêntrico forma-se quando dois segmentos cromossómicos cada um com um centrómero, resultantes de quebra em dois cromossomas, se fundem com perda dos seus fragmentos acêntricos. Devido à existência de dois centrómeros estes cromossomas tendem a quebrar durante a divisão celular quando os centrómeros são atraídos para polos opostos. Por vezes ocorre a inativação de um dos centrómeros ficando o cromossoma, apenas, com um centrómero funcional (Teixeira e Carreira, 2005).

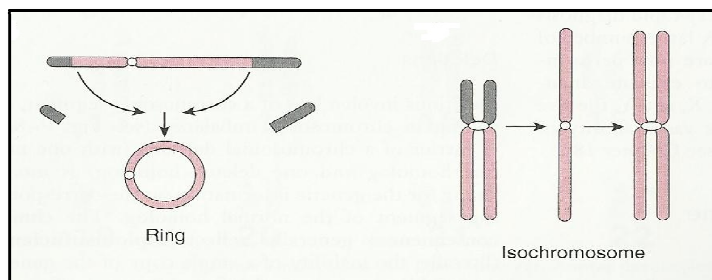


Figura 5 – Mecanismos mais comuns de formação do cromossoma em anel (esquerda) e do isocromossoma (direita) (adaptado, Nussbaum et al, 2004)

Sempre que uma alteração estrutural é detetada num indivíduo é obrigatório o estudo citogenético dos progenitores, para determinar a origem e mecanismo de formação do rearranjo. Esta informação é necessária para determinar o risco de recorrência e, conseqüentemente, oferecer o DPN em gestações futuras, assim como para identificar e estudar os familiares em risco.

Sendo a alteração herdada de um progenitor portador é possível presumir a correlação genótipo-fenótipo. Todavia, se um rearranjo equilibrado ocorre *de novo* (dn) poderá ser difícil atribuir a causalidade de determinada alteração ao fenótipo do indivíduo. Quando uma cromossomopatia é detetada em pré-natal a previsão do fenótipo poderá não ser possível. Situações em que é identificada uma alteração, sem que existam malformações ecográficas ou em que o quadro clínico descrito para determinada alteração é muito variável (de assintomático a gravemente afetado) representam grandes dificuldades para o aconselhamento genético.

## 1.4 CITOGENÉTICA

A citogenética diz respeito ao estudo dos cromossomas, da sua estrutura, morfologia, patologia e comportamento (Lawce e Brown, 1997).

As cromossomopatias representam uma grande fração das doenças genéticas. Anomalias cromossômicas específicas são responsáveis por mais de 100 síndromes bem descritos e identificáveis; estão presentes em mais de 1% dos recém-nascidos, em cerca de 2% das gestações de mulheres com idade superior a 35 anos e praticamente em metade dos produtos de abortamento do primeiro trimestre (Nussbaum et al, 2004).

Para um estudo de rotina em citogenética convencional as células recolhidas são colocadas em cultura, em meio apropriado. Após alguns dias em cultura (que variam de acordo com o tipo de célula e/ou método de cultura) é necessário bloquear a divisão celular em metafase e tratar as células com uma solução hipotónica, para dispersar os cromossomas, que são então fixados, espalhados em lâminas de vidro e corados, utilizando uma de várias técnicas disponíveis, de acordo com a preferência do laboratório ou necessidade do estudo. Os cromossomas podem, por fim, ser analisados e o cariograma construído.

O estudo citogenético convencional possibilita uma visualização direta do genoma como um todo. A observação das metafases revela não só alterações no número e estrutura dos cromossomas, como fornece informação acerca de outras doenças genéticas. A instabilidade do DNA associada à Anemia de Fanconi (OMIM#227650), por exemplo, é caracterizada por um aumento de quebras cromossómicas nas células em metafase. A síndrome de Roberts (OMIM#268300), caracterizada pela disjunção prematura dos centrómeros, também é identificada no estudo citogenético convencional (Bangs e Donlon, 2005).

Os cromossomas, no núcleo, encontram-se em interfase. À medida que os estados da divisão celular progridem da prófase para a metafase os cromossomas vão-se condensando em estruturas progressivamente mais curtas. No início da década de setenta a análise citogenética convencional era realizada em cromossomas com uma resolução de 300 a 400 bandas (por *set* haploide). Em 1976 foi reportada a primeira de várias técnicas para a obtenção de cromossomas mais compridos, bloqueando a divisão celular em pro-metáfase (na transição da prófase para a metafase). O aumento da resolução para 550 a 850 bandas permitiu o reconhecimento de novas síndromes, associadas a pequenas deleções e a possibilidade de definir, com maior exatidão, os pontos de quebra de outros rearranjos estruturais (Lawce e Brown, 1997).

Atualmente o estudo do cariótipo permite diagnosticar aneuploidias, cromossomas marcadores (cromossoma de estrutura anómala, que não é possível caracterizar pela citogenética convencional, tendo, geralmente, tamanho igual ou inferior ao cromossoma 20 da mesma placa em metafase (Liehr et al, 2008)), triploidias, rearranjos estruturais, equilibrados e desequilibrados, superiores a 5-10 Mb (mega bases) e mosaicismo (Faas et al, 2011; Jong et al, 2011).

As limitações do estudo convencional residem no baixo poder de automatização (tanto os procedimentos práticos como a análise dos cromossomas requerem bastante experiência por parte de técnicos especializados) e no tempo de resposta, que envolve um período de 10 a 15 dias em pré-natal e 4 dias a um mês em pós-natal (dependendo da urgência do estudo).

Apesar de terem sido desenvolvidas metodologias para melhorar a qualidade dos cromossomas ocorrem, por vezes, microrrearranjos (inferiores a 5Mb) que não são detetáveis pelo estudo convencional. A associação da biologia molecular com a citogenética - citogenética molecular - possibilita o diagnóstico dessas alterações bem como o esclarecimento e definição de pontos de quebra de outros rearranjos, detetados no cariógrama.

A FISH (*fluorescence in situ hybridization*) permite averiguar a presença ou ausência de determinada sequência de DNA, através da hibridização com sondas de DNA específicas, marcadas com fluorocromos, que poderão ser de diferentes tipos, dependendo do objetivo do estudo. Existem sondas específicas para marcar todo o cromossoma (wcp), regiões específicas (sondas de sequência única associadas, por exemplo, a síndromes de microdeleção/ duplicação ou às regiões subteloméricas), regiões de DNA repetitivo, como ocorre nos centrómeros ou telómeros (sondas centroméricas e teloméricas) ou regiões NOR dos cromossomas acrocêntricos (acro-p-arm), por exemplo (Nussbaum et al, 2004).

A FISH é realizada, normalmente, em metafases fixadas, como complemento do estudo convencional, para diagnosticar ou elucidar uma alteração cromossômica, incluindo síndromes de microdeleção, microduplicações, translocações, rearranjos complexos ou determinar a origem de um cromossoma marcador (Faas, 2011).

Em diagnóstico pré-natal a FISH é utilizada, predominantemente, para despiste rápido das aneuploidias mais comuns, em núcleos em interfase de amniócitos não cultivados (ANCs) (Fig.11). Utilizando um painel de sondas comercial é possível obter um resultado em 24 – 48h. No entanto a capacidade de diagnóstico é limitada, por este se tratar de um estudo direcionado (Faas, 2011).

Outras técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas em DPN para despiste rápido de aneuploidias. Por não requererem cultura celular permitem a obtenção do resultado num curto intervalo de tempo.

Na técnica de QF-PCR (*quantitative fluorescent polymerase chain reaction*) marcadores polimórficos (STRs – *short tandem repeats*) nos cromossomas 13, 18, 21, X e Y são amplificados, num PCR *multiplex*, utilizando *primers* fluorescentes, flanqueadores dessas sequências (Shaffer e Bui, 2007).

A natureza polimórfica dos STRs relaciona-se com o número de repetições num determinado *locus*, originando vários alelos de diferentes tamanhos. Após amplificação por PCR são gerados picos de fluorescência, analisados por equipamento automático, proporcionais à quantidade de sequências-alvo existentes na amostra original (Faas, 2011).

Em indivíduos heterozigóticos normais as duas cópias de um cromossoma serão detetadas por dois alelos diferentes, num padrão de dois picos com áreas semelhantes na razão de 1:1 (Fig.6, A). Numa amostra trissômica os três alelos são evidentes pelo surgimento de três picos na razão de 1:1:1 (Fig.6, C) ou de dois, com áreas diferentes, na razão de 2:1 (Fig.6, D). Poderá ocorrer a situação de homozigotia para determinado STR, surgindo o alelo como um pico único, não informativo (Fig.6, B). Para minorar estas situações deverão ser incluídos vários marcadores para cada cromossoma a analisar na reação *multiplex* (Shaffer e Bui, 2007; Faas, 2011).

Relativamente à FISH em ANCs o QF-PCR tem a vantagem de ser mais económico, permitindo a análise simultânea de um maior número de amostras. É uma técnica menos laboriosa que a FISH e permite uma maior automatização; os produtos de PCR podem ser analisados automaticamente utilizando um aparelho de eletroforese capilar (Grimshaw et al, 2003). O tempo de resposta é semelhante ao da FISH, com resultados possíveis em 24-48h.

Em 2002 foi descrita uma outra técnica, que constitui uma variação à técnica de PCR - MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) – e que permite detetar variações no número de cópias de vários *loci*, numa única reação de PCR (Faas et al, 2011).

Esta metodologia baseia-se na hibridização de duas sondas adjacentes na sequência alvo que após ligação, por intermédio de uma ligase, são amplificadas por PCR. Os produtos gerados são separados e quantificados de acordo com o seu tamanho e intensidade de fluorescência, por eletroforese capilar. A quantidade relativa dos produtos amplificados é proporcional ao número de cópias na sequência alvo (Shaffer e Bui, 2007).

É a comparação entre as áreas dos picos dos produtos de amplificação gerados, nas várias amostras, que permite determinar a ocorrência de deleções ou duplicações.

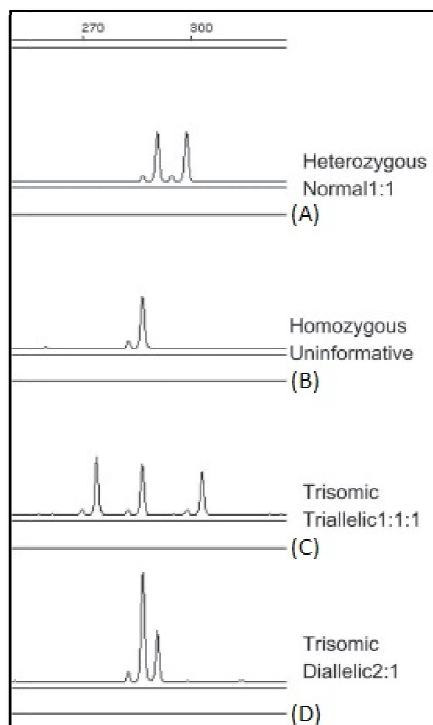


Figura 6 – Análise de marcadores polimórficos por QF-PCR. Em indivíduos heterozigóticos normais as duas cópias de um cromossoma surgem como 2 picos com áreas semelhantes, na razão de 1:1 (A). Devido à natureza polimórfica dos marcadores pode ocorrer, ocasionalmente, uma situação de homozigotia, com o surgimento de um único pico, tornando o marcador não informativo (B). Numa amostra trissômica as três cópias determinam a ocorrência de 3 picos (1:1:1) (C) ou de 2 picos com diferentes áreas na razão de 2:1 (D) (adaptado; Faas et al, 2011)

A técnica de MLPA pode ser utilizada em numerosas aplicações, dependendo do painel de sondas utilizado. Existem vários painéis disponíveis comercialmente que possibilitam, por exemplo, a avaliação de todas regiões subteloméricas, de vários síndromes de microdeleção ou das aneuploidias mais comuns (este especialmente desenhado para o DPN) (Faas et al, 2011).

O MLPA, como o QF-PCR e a FISH em ANC's não depende de cultura celular, pelo que o resultado pode ser obtido entre 1 a 2 dias após a receção da amostra. Como as anteriores não permite, igualmente, a deteção de alterações estruturais equilibradas. Contrariamente às outras, esta técnica, por ser de avaliação semi-quantitativa, não permite o diagnóstico de triploidias envolvendo fetos do sexo feminino (Shaffer e Bui, 2007). Por

permitir, numa reação, analisar várias sequências de várias amostras, é uma metodologia bastante económica e simples de executar.

## 1.5 A EVOLUÇÃO NA CITOGENÉTICA HUMANA

A primeira ilustração de cromossomas humanos foi publicada por Flemming em 1882, embora o termo “cromossoma” (do grego “corpo corado”) só tenha sido sugerido em 1888, por Waldeyer (Smeets, 2004).

Desde então e durante um longo período de tempo o estudo dos cromossomas apresentou poucos desenvolvimentos, devido às grandes limitações existentes. A cultura celular e a obtenção de preparações com alguma qualidade representavam procedimentos complicados, que tornavam difícil a sua reprodutibilidade. Os vários trabalhos publicados apontavam números diferentes para o complemento cromossómico, que foi considerado como sendo constituído por 48 cromossomas durante praticamente três décadas (Smeets, 2004).

No início dos anos cinquenta, no seguimento de um ocasional mas feliz “erro” de laboratório, devidamente documentado, Hsu concluiu que o tratamento das células com uma solução hipotónica, antes da fixação, permitia obter preparações com os cromossomas mais dispersos. Outra importante descoberta, que impulsionou definitivamente a citogenética, foi o efeito inibitório da colchicina sobre a polimerização da  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina do fuso mitótico, que possibilitou a paragem do ciclo celular e, conseqüentemente, a acumulação de células com cromossomas em metafase (Smeets, 2004).

No seguimento daquelas descobertas, e com o desenvolvimento dos protocolos de cultura celular, Tjio e Levan, em 1956, demonstraram que o complemento cromossómico, no homem, era de 46 cromossomas. Nesse mesmo ano Ford e Hamerton confirmaram aquele número (Trask, 2002).

As diferenças de tamanho e posição da constrição primária (centrómero) entre os cromossomas permitiram a sua organização em 23 pares. Estes cariogramas, apesar de apresentarem todos os cromossomas com a mesma tonalidade, permitiram a descoberta de que algumas patologias estariam relacionadas com alterações no número ou morfologia dos cromossomas. Em 1959 Lejeune apontou a trissomia do cromossoma 21 como causa

da síndrome de Down; outras alterações foram prontamente reportadas, como as trissomias dos cromossomas 13 e 18 ou as variações no número dos cromossomas sexuais, como causa da síndrome de Turner (45,X) e Klinefelter (47,XXY). Foi igualmente reconhecido que a maioria dos abortos espontâneos era causada por alterações no número de cromossomas e, em 1966, Steele e Breg demonstraram que culturas celulares, provenientes de amostras de líquido amniótico, poderiam ser utilizadas para estudar a constituição cromossômica do feto, durante a gestação (Trask, 2002).

No final da década de sessenta foram reportados os primeiros protocolos de bandagem de cromossomas, que tinham por base a coloração com um corante fluorescente. Contudo a fluorescência decaía rapidamente, tornando esta metodologia pouco favorável para estudos de rotina. Outras técnicas de bandagem foram desenvolvidas, para diferentes aplicações. O desenvolvimento destas metodologias tornou possível a identificação dos cromossomas através de um padrão de bandas característico (Smeets, 2004).

Apesar de ser possível a identificação dos cromossomas o seu nível de resolução era, ainda, baixo. Esta situação alterou-se em 1976 quando Yunis reportou o protocolo de sincronização de culturas de linfócitos, que aumentava significativamente o número de células em pro-metáfase, com obtenção de cromossomas mais compridos, apresentando um maior número de bandas. Esta descoberta permitiu uma melhor caracterização de rearranjos conhecidos e a identificação de outros mais subtis, como pequenas duplicações ou deleções (Smeets, 2004).

A citogenética nos anos setenta envolvia muita fotografia, com longas horas de revelação e impressão das imagens. Os cromossomas tinham que ser recortados e colados, já alinhados, em folhas de papel (Wolstenholme e Rooney, 2010). A construção dos kariogramas utilizou esta metodologia durante várias décadas; a fotografia foi sendo substituída por sistemas simples de captura e impressão das imagens até ao desenvolvimento de sistemas informáticos mais sofisticados, que permitem a captura das metafases e identificação e organização dos cromossomas no kariograma.

Em 1982 surgiu uma nova técnica que revolucionou a citogenética – a FISH – e que permitia determinar a localização, no cromossoma, de sequências específicas de DNA. Esta técnica evoluiu a partir de outra já conhecida e que utilizava sondas com marcação radioativa. A utilização da fluorescência, na FISH, permitia uma utilização mais simples e mais segura das sondas, que podiam ser armazenadas por longos períodos de tempo;



aumentou o poder de resolução e permitiu a observação, em simultâneo, de mais do que uma sequência (utilizando fluorocromos diferentes) (Trask, 2002).

Outra grande vantagem da FISH era a possibilidade de analisar regiões cromossômicas em células que não se encontravam em divisão. Uma vez que, em interfase, os cromossomas se encontram despiralizados, rearranjos, como as microduplicações, puderam ser identificados (a sua observação em metafase é muito dependente da qualidade dos cromossomas) (Trask, 2002).

O desenvolvimento da FISH ocorreu rapidamente. A microscopia de fluorescência evoluiu e as investigações do Projeto do Genoma Humano (HUGO) tornaram disponíveis um número cada vez maior de sondas já mapeadas. No entanto, a FISH é uma técnica laboriosa, tanto na execução como na observação, e é limitada no número de sondas por hibridização (Smeets, 2004).

Outras técnicas foram exploradas e, no início dos anos noventa, foi desenvolvida uma nova tecnologia inovadora – *comparative genomic hybridization* (CGH). Nesta abordagem o DNA de referência e o do paciente são marcados com fluorocromos de cores diferentes (verde e vermelho), sendo posteriormente hibridizados em metafases com complementos cromossômicos normais. Utilizando um sistema informático adequado é possível observar a razão de fluorescência entre as duas cores, ao longo do cromossoma. As regiões cromossômicas onde ocorreu a hibridização equilibrada do DNA de referência e do paciente surgem a cor laranja; as regiões que surgem com marcação a vermelho ou a verde são indicativas da ocorrência de perdas ou ganhos de material. Esta técnica tem sido particularmente importante na citogenética do cancro (Trask, 2002).

Desde então têm-se desenvolvido novas técnicas de biologia molecular e genómica. Uma são direcionadas, como o MLPA, outras permitem avaliar a variação do número de cópias em todo o genoma, como o array-CGH (aCGH). O DNA do paciente é hibridizado, não em metafases como na CGH, mas num *chip* contendo milhares de segmentos de DNA, que cobrem todo o genoma. Esta técnica requer equipamento especial e *software* próprio para análise.

Mais recentemente têm vindo a ser reportadas novas tecnologias de sequenciação, entre as quais o *exome sequencing*. Esta técnica permite a captura, sequenciação e análise do 1% do genoma que contém as regiões codificantes. Foi pela primeira vez aplicada no estudo dos genes em 2009 e, desde então, tem determinado o aumento da identificação de

novas doenças genéticas, tendo vindo a desempenhar um papel de grande importância no estudo da etiologia do atraso mental (Topper et al, 2011).

**CAPÍTULO 2**  
**OBJETIVOS**

As alterações socioeconómicas, profissionais, entre outras, determinaram que um número crescente de casais optasse por ter filhos mais tardiamente, aumentando assim o número de grávidas com mais de 35 anos. Simultaneamente, e com a evolução dos métodos de rastreio de aneuploidias, principalmente da síndrome de Down, e o aumento da resolução das ecografias fetais, têm-se modificado as indicações clínicas para a realização do diagnóstico pré-natal invasivo. Como resultado foi sentida a necessidade da existência de métodos mais rápidos de diagnóstico, de modo a permitir intervenções mais precoces e reduzir a ansiedade dos progenitores.

O desenvolvimento de técnicas de citogenética e biologia molecular, como a FISH e o MLPA, e a sua introdução como complemento do cariótipo, utilizado como método de estudo preferencial no diagnóstico pré-natal, permitiram diagnósticos que, apesar de direcionados, são rápidos e de maior resolução. A grande disponibilidade comercial de sondas permite, com grande rapidez e fiabilidade detetar alterações, como as aneuploidias mais comuns.

No presente estudo pretendeu-se avaliar o impacto que a substituição do cariótipo pelas técnicas de despiste rápido de aneuploidias (DRA) teria no DPN, atendendo a questões como o risco de não deteção de cromossomopatias, a estratégia de estudo, o tempo de resposta e os custos associados. Pretendeu-se determinar se a realização do estudo citogenético convencional é imprescindível em todas as indicações clínicas ou se existem grupos em que a sua substituição pelas técnicas de DRA permitiria um diagnóstico fiável, com benefícios de tempo e de custos.

**CAPÍTULO 3**  
**MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 ESTUDO**

Neste estudo retrospectivo consideraram-se as amostras de líquido amniótico (LA) processadas e estudadas no Laboratório de Citogenética de Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC) no período de 2006 a 2010. Em todas as amostras com indicação para estudo citogenético foi estabelecida cultura celular.

No LCG-FMUC utilizou-se inicialmente a técnica de FISH em ANC's para despiste rápido de aneuploidias; a partir de 2008 o MLPA substituiu a metodologia anterior. A aplicação destas técnicas ocorreu por indicação clínica ou quando o Laboratório a considerou necessária, pelo que o estudo molecular não foi realizado em todas as amostras recebidas de 2006 a 2010.

Sendo o objetivo do trabalho avaliar o impacto das técnicas de despiste rápido de aneuploidias (DRA) no DPN invasivo, como método principal de diagnóstico, uma parte dos resultados (a que diz respeito à aplicação destas técnicas) representa uma extrapolação teórica, baseando-se no que seria expectável se as técnicas de FISH em ANC ou MLPA tivessem sido aplicadas, com resultados conclusivos, ao total das análises consideradas.

### **3.2 AMOSTRAS**

As 7089 análises de LA consideradas neste trabalho foram referidas pelas Equipas de Diagnóstico Pré-Natal das Maternidades Bissaya Barreto (Centro Hospitalar de Coimbra) e Daniel de Matos (Hospitais da Universidade de Coimbra) e pelo Centro Hospitalar da Cova da Beira, EPE.

As amostras de LA foram organizadas de acordo com a indicação para o estudo, segundo a nomenclatura descrita na Tabela 1. Em caso de sobreposição de indicações, considerou-se a mais relevante para a realização do estudo.

Tabela 1 - Indicações para estudo citogenético de amostras de Líquidos Amnióticos

<b>Motivo</b>	<b>Indicação clínica para o teste</b>
<b>A</b>	Idade materna avançada (IMA)
<b>B</b>	Malformações ecográficas
<b>C</b>	Sinais ecográficos de alerta (TN; ACIU, etc)
<b>D</b>	Progenitor portador de cromossomopatia
<b>E</b>	Filho/feto anterior com cromossomopatia
<b>F</b>	Rastreamento bioquímico positivo
<b>G</b>	Indicação para estudos moleculares
<b>H</b>	Ansiedade materna
<b>I</b>	Outros (avaliação de toxoplasmose, rubéola, etc)

### 3.3 CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL

Cada amostra de LA recolhida foi entregue no Laboratório em duas caixas de cultura a fim de, e obedecendo às recomendações da *European Cytogeneticists Association* (Hastings et al, 2012), serem processadas, de forma independente, utilizando diferentes equipamentos, reagentes e manuseadas por técnicos diferentes.

Após a receção e respetivo registo adicionou-se meio de cultura às amostras de líquidos amnióticos, colocando-se, de seguida, em incubadoras.

O meio de cultura é escolhido de acordo com as características das células a cultivar. No caso dos amniócitos, ao “meio basal” são adicionados L-glutamina, soro fetal (normalmente soro fetal bovino, rico em fatores de crescimento) e antibióticos, obtendo-se o “meio completo” que se adiciona às culturas (Boyle T e Griffin D, 2001; Lawce HJ e Brown MG, 1997). Estas são, normalmente, culturas abertas sendo possível a troca de gases com a atmosfera envolvente. Para tal utilizam-se incubadoras de CO<sub>2</sub> (a 5%), que permitem o ajuste do pH do meio, através do tampão bicarbonato aí presente (Lawce HJ e Brown MG, 1997).

Decorridos 6 a 7 dias após o início da cultura avaliou-se o seu desenvolvimento e procedeu-se à renovação de meio. O acompanhamento das culturas foi feito com regularidade até que estivessem prontas para o processamento (manipulação).

O protocolo de manipulação inclui três etapas básicas: inibição da mitose, tratamento hipotónico e fixação. A primeira etapa é conseguida pela adição de

Colcemida<sup>®</sup>, que impede a formação do fuso mitótico e, conseqüentemente, a separação dos cromátídeos para polos opostos. O tratamento hipotônico (normalmente com KCl) tem como objetivo aumentar o volume celular e facilitar a separação dos cromossomas. O processo de fixação induz o endurecimento e fortalecimento da membrana e cromatina e a preservação das estruturas (Lawce HJ e Brown MG, 1997).

A preparação de lâminas de vidro (espalhamento), com os cromossomas em metafase, constitui a etapa seguinte, após o que se procedeu à sua coloração (bandagem) (as etapas dos processos acima referidos estão esquematizados na Fig.7). Os cromossomas em metafase foram, por fim, estudados ao microscópio ótico (campo brilhante) e o cariógrama construído (Fig.8).

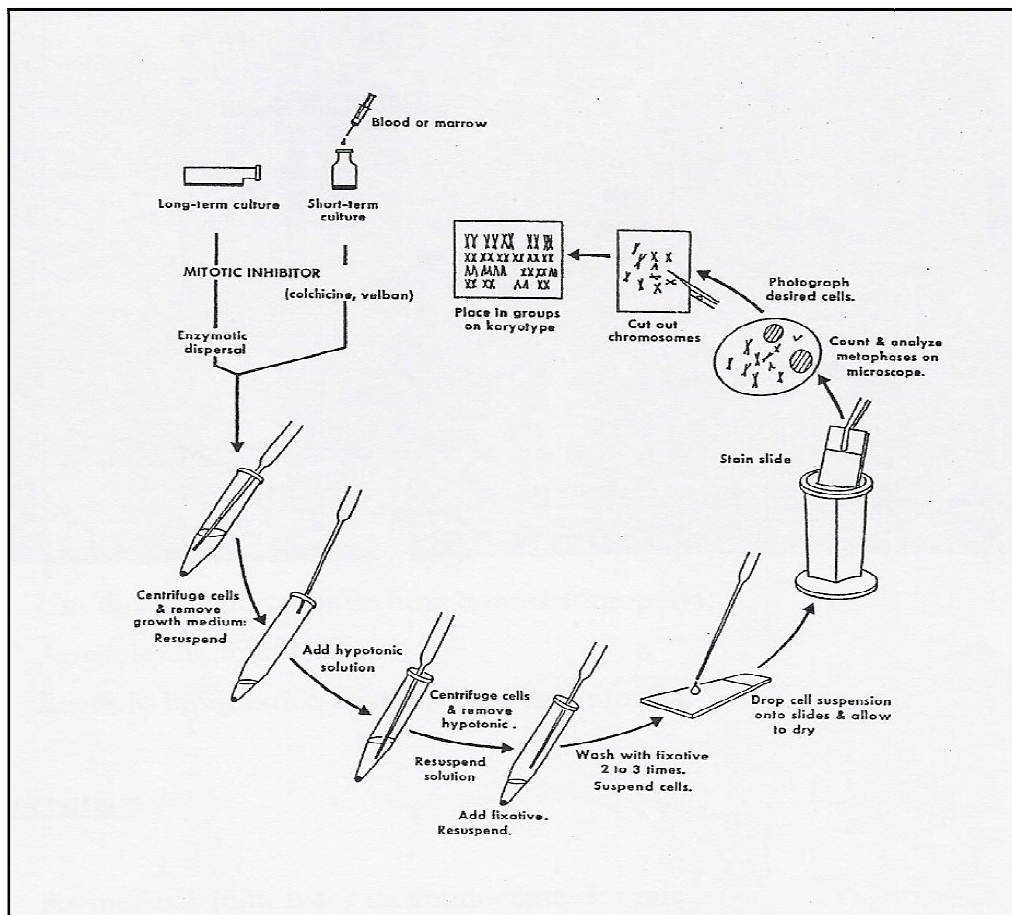


Figura 7 – Representação esquemática das várias etapas do processamento das amostras na citogenética convencional (in, Lawce HJ e Brown MG, 1997)



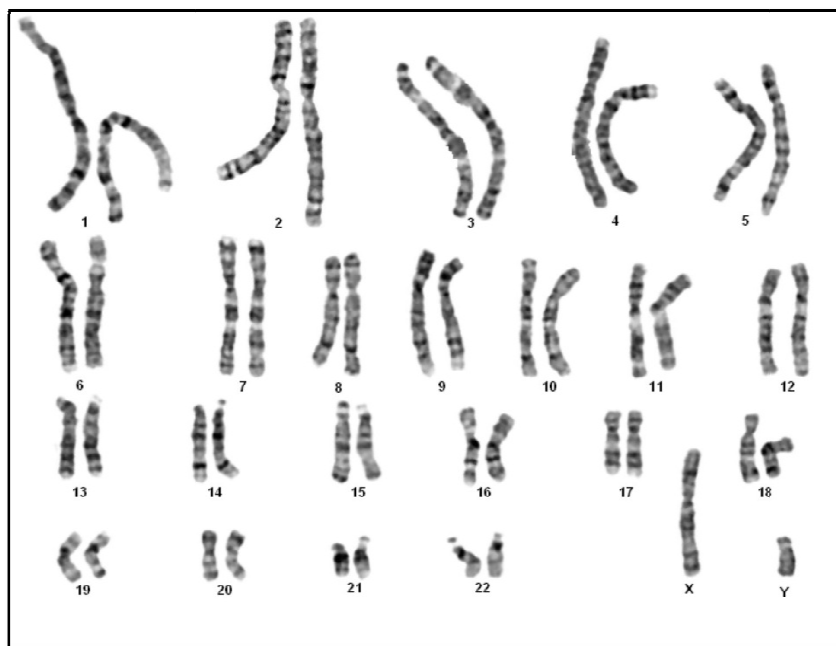


Figura 8 – Cariograma de um feto do sexo masculino (46,XY) com bandas GTG (imagem cedida pelo LCG-FMUC)

No presente estudo as culturas de líquido amniótico foram estabelecidas e as metafases obtidas e coradas (Bandas G – GTG), seguindo os procedimentos de rotina do Laboratório de Citogenética e Genômica da FMUC, sendo os protocolos adaptados a partir do manual *Current Protocols in Human Genetics* (Dracopoli *et al.*, 1994). O estudo das metafases ao microscópio obedeceu, igualmente, ao protocolo estabelecido para o efeito, adaptado das recomendações propostas por Hsu e Benn (1999) e de acordo com as *General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics*, propostas pela *European Cytogeneticists Association* (Hastings *et al.*, 2012). Através de câmaras acopladas aos microscópios, e do sistema *CytoVision*<sup>®</sup> (Applied Imaging/ Leica Microsystems), com *software* específico, foi possível capturar as metafases, fazer o tratamento das imagens e organizar os cromossomas nos kariogramas.

### 3.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* EM AMNIÓCITOS NÃO CULTIVADOS

A análise por FISH (*fluorescence in situ hybridization*) em amniócitos não cultivados (ANC), para as aneuploidias mais comuns, foi realizada utilizando o painel de

sondas *AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit* (Vysis/ Abbot). Neste trabalho consideram-se os resultados obtidos utilizando os protocolos do Laboratório, adaptados a partir dos do fabricante.

O sistema acima referido utiliza sondas que detetam sequências  $\alpha$ -satélite nas regiões centroméricas dos cromossomas 18, X e Y (D18Z1, DXZ1 e DYZ3, respetivamente) e sequências específicas nos cromossomas 13 (em 13q14, cobrindo todo o gene *Rb*) e 21 (entre 21q22.13 e 21q22.2, complementares aos *loci* D21S259, D21S341 e D21S342) (in [http://www.aneuvysion.com/static/cms\\_workspace/pdf/AneuVysion-PI-30-608368R1.pdf](http://www.aneuvysion.com/static/cms_workspace/pdf/AneuVysion-PI-30-608368R1.pdf)) (Fig.9).

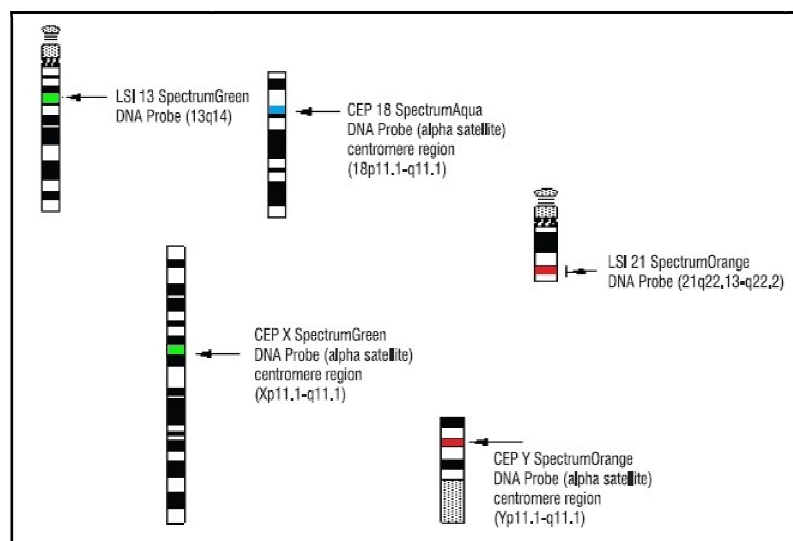


Figura 9 – Localização das sondas do painel *AneuVysion* e respetivas cores de marcação (adaptado do site [http://www.aneuvysion.com/static/cms\\_workspace/pdf/AneuVysion-PI-30-608368R1.pdf](http://www.aneuvysion.com/static/cms_workspace/pdf/AneuVysion-PI-30-608368R1.pdf))

Após a receção da amostra (e antes de estabelecer as culturas celulares) recolhem-se cerca de 2ml de líquido amniótico para um tubo de centrifugação. Os amniócitos são manipulados de acordo com o protocolo de rotina do Laboratório e espalhados em lâminas de vidro.

De acordo com a recomendação do fabricante, efetuou-se um pré-tratamento às lâminas, com vista à otimização dos resultados, após o que se procede ao protocolo de FISH. O DNA é desnaturado, permitindo a hibridização das sondas. Com o objetivo de

retirar o excedente de sonda foram efetuadas uma série de lavagens, após o que se procedeu à coloração dos núcleos, com o corante específico DAPI (*in* [http://www.aneuvysion.com/static/cms\\_workspace/pdf/AneuVysion-PI-30-608368R1.pdf](http://www.aneuvysion.com/static/cms_workspace/pdf/AneuVysion-PI-30-608368R1.pdf)). As lâminas foram posteriormente observadas ao microscópio de fluorescência, utilizando os filtros adequados (Fig.10) e os sinais de hibridização visualizados (Fig.11).



Figura 10 – Ilustração das diferentes etapas da FISH (adaptado do site <http://www.aneuvysion.com/lab/resources.html>)

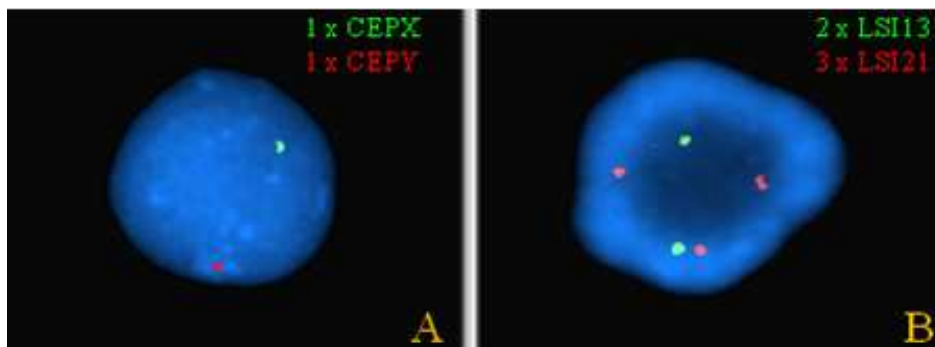


Figura 11 – Núcleos em interfase mostrando os sinais de hibridização de um feto do sexo masculino com síndrome de Down. **A)** Padrão normal para as sondas CEPX (1 sinal) e CEPY (1 sinal). **B)** Padrão normal para a sonda LSI13 (2 sinais) e padrão alterado para a sonda LSI21, evidenciando a presença de 3 cópias do cromossoma 21 (imagens cedidas pelo LCG-FMUC)

### 3.5 MLPA (*MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION*)

De uma das caixas de cultura recebidas foram retirados cerca de 2ml de líquido amniótico. O DNA foi extraído utilizando o *kit* comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Applied Science), segundo as indicações do fabricante ([in www.roche-applied.science.com](http://www.roche-applied.science.com)).

Após a extração do DNA procede-se à sua quantificação. A concentração do DNA pode ser estimada medindo a absorvância a 260nm ( $A_{260}$ ) (comprimento de onda em que ocorre a maior absorção). A relação  $A_{260}/A_{280}$  é utilizada como indicador de grau de pureza (relativamente à contaminação com proteínas, que têm um pico de absorção aos 280nm); valores de  $\sim 1,8$  são aceites como “puros” para o DNA. A relação  $A_{260}/A_{230}$  indica o grau de pureza relativamente a outros contaminantes orgânicos (ex: sais, fenol) (Moore e Dowhan, 2002).

A técnica de MLPA foi realizada seguindo o protocolo do fabricante (MRC-Holland), com ligeiras adaptações. A separação dos produtos de amplificação foi efetuada, no LCG-FMUC, por eletroforese capilar, utilizando o aparelho 3130 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems) e a análise dos resultados recorrendo ao programa *Microsoft Excel*, utilizando uma folha de cálculo desenvolvida e validada no Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC.

A técnica acima referida tem por base uma variação à técnica de PCR, permitindo a amplificação de múltiplas sequências alvo (até 50) com apenas um par de *primers*. São utilizadas sondas adjacentes que, após hibridização com a sequência alvo, são unidas por

uma reação de ligação. Na reação de PCR só estas sondas “completas” são amplificadas e não as sequências alvo, como na PCR convencional (in [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)).

Quando os produtos de amplificação são aplicados num sequenciador automático são gerados picos, sendo as áreas desses picos indicativas da quantidade relativa do produto na amostra.

A reação pode ser dividida em 5 etapas fundamentais: reação de desnaturação e de hibridização (o DNA é desnaturado e incubado *overnight* com o painel de sondas), reação de ligação (é necessário que ocorra a hibridização das duas sondas, nas respectivas sequências alvo adjacentes, para que ocorra a ligação das mesmas), reação de PCR (são amplificadas, apenas, as sondas “completas”), separação dos produtos de amplificação por eletroforese capilar, análise dos resultados e interpretação (in [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)) (Fig.12).

A comparação entre as áreas dos picos dos produtos de amplificação das várias amostras permite determinar a ocorrência de deleções ou duplicações; *ratios* abaixo de 0,7 são indicativos de deleções heterozigóticas e *ratios* acima de 1,3 de duplicações (in [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)).

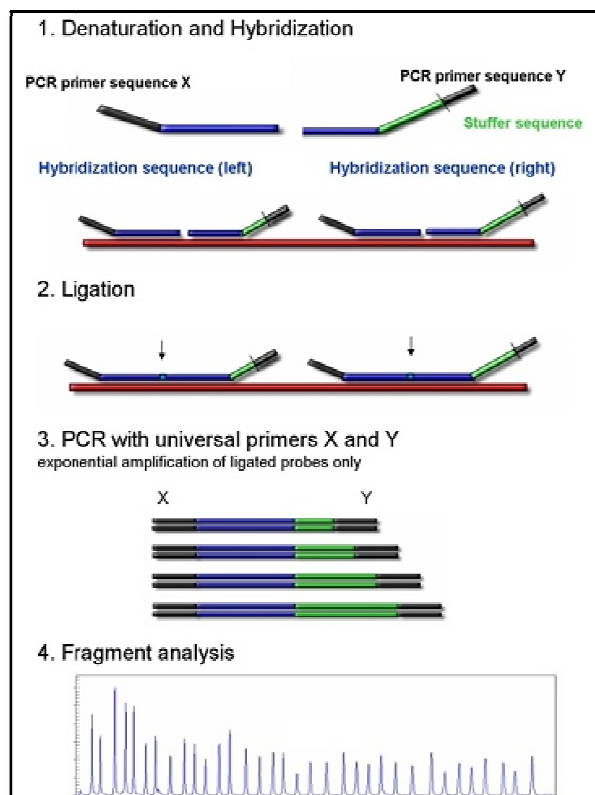


Figura 12 – Etapas da reação de MLPA (in [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com))

### 3.5.1 SALSA MLPA kit P095-A2 Aneuploidy (MRC-Holland)

O painel de sondas P095 é utilizado, na reação de MLPA, para detetar variações no número de cópias dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y, responsáveis pelas aneuploidias mais comuns. Contém 36 sondas para aqueles cromossomas - 8 para cada um dos cromossomas 13, 18, 21 e X e 4 para o cromossoma Y - e ainda 9 fragmentos controlo (Fig.13).

SALSA MLPA P095-A2 Aneuploidy probemix			
Length (nt)	Chromosome	SALSA MLPA probe	Chromosomal location
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (Xq23)		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (Yq11.21)		
136	21	00815-L00333	21q22.13
142	18	02127-L01638	18q21.2
148	13	00798-L00316	13q32
154	X	00652-L00637	Xq12
160	Y	02153-L00596	Yp11.31
166	21	00813-L00636	21q21.1
172	18	00808-L00326	18q21.32
178	13	00799-L00317	13q13.3
184 *	X	02155-L01607	Xq22.3
193	Y	02152-L00592	Yp11.31
202	21	02115-L01605	21q21.1
211	18	02845-L02275	18q11.2
220	13	00582-L00147	13q14.2
229	X	02898-L02369	Xp21.3
240	Y	01071-L00464	Yq11.21
247	21	00816-L00334	21q11.2
255	18	00807-L00325	18q23
265	13	02125-L01636	13q21.32
274 *	X	02904-L02370	Xp11.4
283	Y	04189-L03982	Yp11.31
291	21	02116-L01604	21q22.11
301	18	00811-L00329	18p11.32
310	13	00871-L00461	13q34
319	X	00819-L00337	Xq28
337	21	00812-L00330	21q21.3
346	18	00810-L00328	18q21.33
355	13	00452-L00360	13q13.1
364	X	02906-L02300	Xp22.12
382	21	02834-L02265	21q22.3
391	18	02846-L02276	18q11.2
400	13	00801-L00639	13q14.3
409	X	00820-L00338	Xq25
427	21	00817-L00335	21q22.11
436	18	02847-L02277	18p11.22
445	13	00802-L00320	13q34
454	X	01388-L02509	Xp21.2

\* There have been various reports about the 184 nt or 274 nt probe being variable; both hybridize in a region in which copy number variation occurs in healthy individuals.

Figura 13 – Descrição das sondas do painel P095 e sua localização nos cromossomas (in <http://www.mlpa.com>)

### 3.6 CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS

As alterações cromossômicas (AC), detetadas após o estudo do cariótipo, foram divididas em numéricas (se envolvem variação no número de cromossomas), estruturais (se envolvem alterações na normal estrutura de um ou mais cromossomas), numérica e estrutural (quando uma alteração numérica e uma estrutural ocorrem em simultâneo, na mesma linha celular ou em mosaico) e presença de um cromossoma marcador.

As alterações cromossômicas não detetadas pelas técnicas de DRA foram classificadas de acordo com o seu significado clínico. Esta classificação, baseada nos trabalhos de Gardner e Sutherland (2004) e Comas e colaboradores (2010), é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação das alterações cromossômicas de acordo com o significado clínico

Risco Associado	Alteração cromossômica
Residual	Rearranjos, aparentemente equilibrados, de origem familiar
	Translocações Robertsonianas não envolvendo os cr. 14 e 15
	Translocações Robertsonianas envolvendo os cr. 14 e 15, com exclusão de DUP
	Cromossomas marcadores de origem familiar
Baixo	Rearranjos, aparentemente equilibrados, dn
	Translocações Robertsonianas envolvendo os cr. 14 e 15, sem exclusão de DUP
	Cromossomas marcadores, dn, com origem nos cr. acrocêntricos
	Mosaicos de trissomias envolvendo os cromossomas 11 e 17
Elevado ou desconhecido	Tetraploidias
	Rearranjos desequilibrados
	Marcadores, dn, com origem nos autossomas
	Aneuploidias dos cromossomas 13, 18, 21 e X
	Mosaicismo dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y
	Aneuploidias de outros autossomas

dn=*de novo*; cr=cromossoma; DUP=dissomia uniparental





**CAPÍTULO 4**  
**RESULTADOS**

No presente estudo consideraram-se 7089 amostras de líquidos amnióticos processados e estudados, no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra de 2006 a 2010. Foram recebidas 5107 amostras por idade materna avançada (A), 721 com indicação de malformações ecográficas (B), 534 por rastreio bioquímico e/ou ecográfico positivos (F), 319 com sinais ecográficos de alerta (C), 181 por motivo I (outros: avaliação de toxoplasmose, rubéola, etc), 132 por motivo E (filho/feto anterior com cromossomopatia), 55 por ansiedade materna (H), 32 por motivo D (progenitor portador de cromossomopatia) e 8 por motivo G (estudos moleculares) (Fig.14). O maior número de análises efetuadas foi referido por idade materna avançada (A) – 72,0 %, seguido da indicação de malformações ecográficas (B) – 10,2% - rastreio bioquímico e/ou ecográfico positivos (F) – 7,5% e sinais ecográficos de alerta (C) – 4,5%.

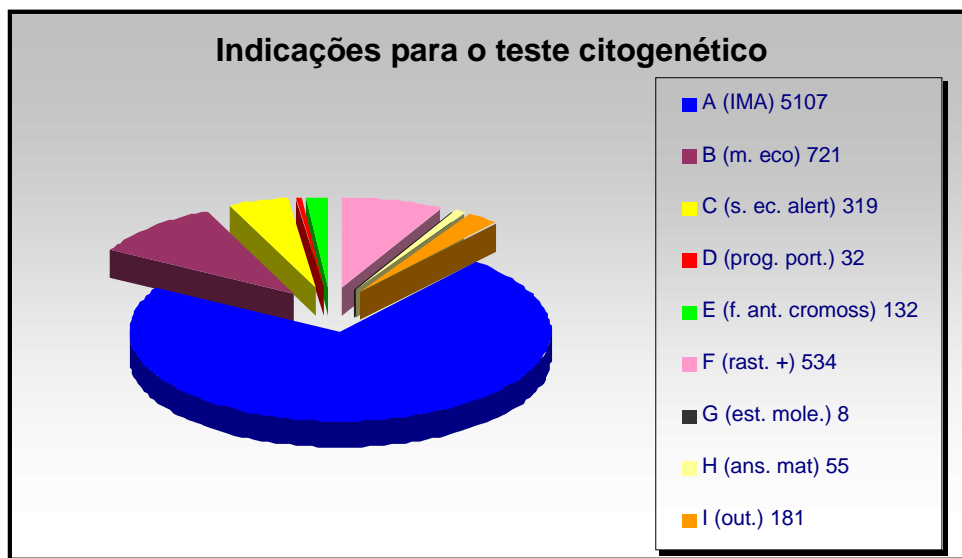


Figura 14 – Indicações para o diagnóstico pré-natal citogenético das 7089 análises de líquido amniótico realizadas no período de 2006 a 2010

Do total de análises realizadas, 7022 foram estudadas pelo método convencional (estudo do cariótipo), sendo que 6786 revelaram resultados normais e 236 com alteração: 146 numéricas, 76 estruturais, 4 numérica e estrutural em simultâneo e 10 casos de cromossoma marcador (Fig.15).

Em 67 amostras de LA o estudo acima referido não foi possível. Em 59 amostras - 0,83% - ocorreu falha de crescimento celular, maioritariamente devido a idade gestacional

do terceiro trimestre. Contudo, aplicaram-se as técnicas de DRA em 41 amostras, tendo sido detetadas três alterações cromossómicas: dois casos 45,X e um com trissomia do cromossoma 21. Em 8 amostras de líquido amniótico (0,11%) não foi estabelecida a cultura celular, obedecendo às indicações do médico requisitante. Nestas situações, o DRA foi realizado em 4 amostras, tendo-se obtido dois resultados patológicos: uma triploidia 69,XXX e uma trissomia do cromossoma 21 (confirmada posteriormente) e dois resultados normais, confirmados noutra tecido (Fig.15).

Considerando os cinco anos, de 2006 a 2010, foram registadas 65 amostras, de fetos do sexo masculino, que evidenciaram contaminação materna.

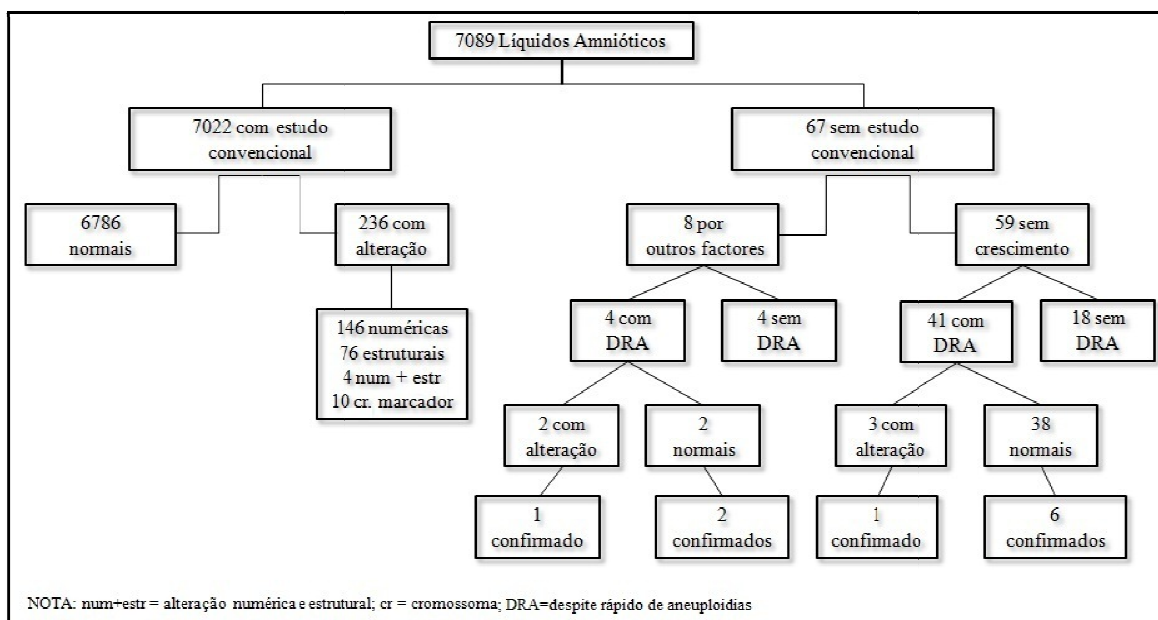


Figura 15 – Quadro resumo dos resultados obtidos nas 7089 amostras de LA recebidas no LCG-FMUC

Das 7089 amostras recebidas 6794 (95,8%) apresentaram um resultado normal e 241 (3,4%) foram reportados com alteração (Tabela 3). Em 32 o resultado do DRA foi, também, normal contudo não foi possível a sua confirmação noutra tecido. Dos 241 casos com alteração, 95 foram referidos para o estudo por IMA, 72 por malformações ecográficas, 30 por sinais ecográficos de alerta, 17 com progenitor portador de cromossomopatia, 2 em casos de gestações anteriores com cromossomopatia, 22 por rastreio positivo e 3 por outros fatores.

Tabela 3 – 7089 amostras de LA (com resultado citogenético normal e com alteração cromossômica) de acordo com a indicação para o teste

Indicação clínica	Total de LA	LA sem resultado citogenético	LA Normal	LA c/ DRA Normal s/ conf. citogenética	LA com Alteração cromossômica	Alteração numérica	Alteração estrutural	Alteração numérica e estrutural	Cromossoma marcador
A	5107	9	4999	4	95 (1,9%)	52 (54,7%)	33 (34,7%)	4 (4,2%)	6 (6,3%)
B	721	8	616	25	72 (10%)	57 (79,2%)	13 (1,80%)	-	2 (2,8%)
C	319	-	289	-	30 (9,4%)	23 (76,7%)	7 (23,3%)	-	-
D	32	-	15	-	17 (53,1%)	-	17 (100%)	-	-
E	132	-	130	-	2 (1,5%)	1 (50%)	1 (50%)	-	-
F	534	1	511	-	22 (4,1%)	15 (68,2%)	5 (22,7%)	-	2 (9,1%)
G	8	-	8	-	-	-	-	-	-
H	55	-	55	-	-	-	-	-	-
I	181	4	171	3	3 (1,6%)	3 (100%)	-	-	-
<b>Total</b>	<b>7089</b>	<b>22</b>	<b>6794</b> (95,8%)	<b>32</b>	<b>241</b> (3,4%)	<b>151</b> (62,6%)	<b>76</b> (31,5%)	<b>4</b> (1,6%)	<b>10</b> (4,1%)

As siglas das indicações A - I estão referenciadas na Tabela 1

Nenhum dos casos referidos com indicação para estudos moleculares (G) ou ansiedade materna (H) revelaram alterações cromossômicas (Tabela 3).

Do total dos 5107 casos referidos para o teste por IMA (A), apenas 1,9% mostraram alteração cromossômica (Tabela 3). Nos motivos B e C (malformações ecográficas e sinais ecográficos de alerta) a percentagem aumentou para 10% e 9,4%, respetivamente. Nos casos em que um dos progenitores é portador de cromossomopatia (D), 53,1% dos casos mostraram alteração, equilibrada ou desequilibrada. Considerando o motivo F (rastreamento bioquímico e/ou ecográfico positivo), 4,1% dos casos referidos mostraram alteração.

Avaliou-se em seguida que tipo de alteração – numérica, estrutural, numérica e estrutural em simultâneo e presença de cromossoma marcador – ocorreu com maior frequência em cada um dos grupos constituídos por amostras de LA com a mesma indicação clínica. Os resultados são apresentados na Tabela 3. Verificou-se que, com exceção dos motivos D e E (filho/feto anterior com cromossomopatia), as alterações cromossômicas numéricas foram os eventos mais frequentes, representando 62,6% dos casos com alteração, independentemente da indicação para o teste.

Das 151 alterações numéricas encontradas 120 referem-se às aneuploidias mais comuns (79,5%); 13 dizem respeito a triploidias (8,6%) e 18 a outras alterações (11,9%), sendo que em 14 casos estão envolvidos os cromossomas sexuais e 4 dizem respeito a aneuploidias, em mosaico, de outros autossomas (cromossomas 2, 9 e 20) (Tabela 4). Com exceção das triploidias, cuja principal indicação para o teste foi a existência de malformações ecográficas e as aneuploidias envolvendo outros autossomas, referidas predominantemente por IMA, os motivos A e B foram as principais indicações, sem diferenças significativas, nos casos em que foram detetadas aneuploidias comuns ou alterações envolvendo os cromossomas sexuais (Tabela 4). Em cinco dos 151 casos com alteração numérica o resultado foi obtido, apenas, pela aplicação das técnicas de DRA (em dois dos casos foi possível confirmar o resultado, estudando outro tecido).

Dos 76 casos com anomalia estrutural verificou-se que em 56 (73,7%) a alteração é equilibrada e em 20 foi identificado um desequilíbrio (26,3%). Do total de casos em que foi detetada uma anomalia estrutural, a maioria foi referida por idade materna avançada, seguindo-se as indicações D (progenitor portador) e B (malformações ecográficas) (43,4%, 22,4% e 17,1%, respetivamente) (Tabela 5). Sempre que uma alteração estrutural é

detetada é requerido o estudo dos progenitores, de modo a identificar a origem do rearranjo. Em 10 das amostras de LA com anomalia cromossómica estrutural não foi possível determinar a sua origem, por indisponibilidade dos progenitores que, por vezes, necessitam de tempo para aceitar um resultado inesperado no diagnóstico pré-natal, especialmente se envolveu morte fetal.

Tabela 4 – Resumo das 151 alterações numéricas encontradas nas amostras de LA

Alteração cromossómica (n)		n	Indicação clínica					
			A	B	C	E	F	I
Aneuploidias mais comuns (120)	T21	84	41	43	20	1	12	3
	T18	21						
	T13	6						
	45,X	9						
Outras aneuploidias (4)		4	3	1	-	-	-	-
Alterações envolvendo os cromossomas sexuais (14)	XXX	3	7	5	2	-	-	-
	XXY	7						
	XYY	2						
	XX/XY	1						
	XXYY	1						
Triploidias (13)	XXX	9	1	8	1	-	3	-
	XXY	4						
Total		151	52	57	23	1	15	3

As siglas das indicações **A - I** estão referenciadas na Tabela 1

Os 4 casos em que se verificou em simultâneo alteração estrutural e alteração numérica (Tabela 6) foram referidos para o teste por IMA. Nos 10 casos em que foi identificado um marcador (Tabela 3) 5 eram de origem familiar e em 5 não foi possível determinar a origem; 6 tiveram como indicação a idade materna avançada, 2 foram estudados por anomalia ecográfica e 2 por rastreio positivo (bioquímico e/ou ecográfico) do primeiro trimestre.

Tabela 5 – Resumo das 76 alterações estruturais encontradas nas amostras de LA

Alteração cromossômica (n)	Origem	Alteração equilibrada	Alteração desequilibrada	Indicação clínica					
				A	B	C	D	E	F
Translocação (38)	dn	7	-	4	-	3	-	-	-
	fam	28	-	5	4	3	11	1	4
	?	3	-	-	1	-	2	-	-
Cromossoma derivativo (7)	dn	-	-	-	-	-	-	-	-
	fam	-	6	-	3	-	3	-	-
	?	-	1	1	-	-	-	-	-
Inversão (16)	dn	-	-	-	-	-	-	-	-
	fam	16	-	14	1	-	1	-	-
	?	-	-	-	-	-	-	-	-
Deleção (8)	dn	-	5	3	1	-	-	-	1
	fam	-	1	1	-	-	-	-	-
	?	-	2	-	2	-	-	-	-
Duplicação (2)	dn	-	-	-	-	-	-	-	-
	fam	-	1	1	-	-	-	-	-
	?	-	1	-	1	-	-	-	-
Outros rearranjos (5)	dn	-	1	1	-	-	-	-	-
	fam	1	-	1	-	-	-	-	-
	?	1	2	2	-	1	-	-	-
Total (76)		56	20	33	13	7	17	1	5

dn = *de novo*, fam. = familiar, ? = origem não determinada; siglas das indicações **A - F** estão referenciadas na Tabela 1

Tabela 6 - Resumo das 4 alterações numéricas e estruturais, em simultâneo, encontradas nas amostras de LA

Indicação clínica	Resultado do estudo citogenético
A	mos45,X[31]/ 46,X, idic(Y)(q16.2).ish idic(Y)(q11.2)(SRY++, DYZ3++)[19]
A	mos48,XYY,+mar.ishder(14/22)(D14Z1/D22Z1+)dup(22) (q11.2q11.2)(TUPLE1++)dn[34]/ 47,XYY.ishdup(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1++)dn
A	mos46,XY,r(22).ishr(22)(p11.2q13)(D14ZVD22Z1+, D22S75+,m8593-)[42] /45,XY,-22[5]/ 46,XY[51]
A	mos46,X,idic(Y)(q11.2).ishidi(Y)(DYZ3++,SRY++)[10]/ 45,X[7]/ 46,XY[77]

As siglas da indicação **A** estão referenciadas na Tabela 1

Tabela 7 – Capacidade de deteção das 236 alterações pelas técnicas de DRA

Alteração cromossómica (n)	Capacidade de deteção pelas técnicas de DRA					
	FISH em ANC			MLPA		
	Detetada	Não Detetada	Suspeita	Detetada	Não Detetada	Suspeita
Aneuploidias mais comuns (116)	116	-	-	113	3	-
Outras aneuploidias (4)	-	4	-	-	4	-
Alt. envolvendo cr. Sexuais (14)	14	-	-	-	-	14
Triploidias (12)	12	-	-	-	8	4
Alt. estrutural equilibrada (56)	-	56	-	-	56	-
Alt. estrutural desequilibrada (20)	-	20	-	-	20	-
Alt. numérica e estrutural (4)	3*	1	-	-	2	2*
Cromossoma marcador (10)	-	10	-	-	10	-
Total (236)	145 (61,4%)	91 (38,6%)	-	113 (47,9%)	103 (43,6%)	20 (8,5%)

Alt.=alteração; cr.=cromossoma;\* refere-se, apenas, à alteração numérica

Avaliou-se, também, a capacidade de deteção das alterações encontradas pelas técnicas de despiste rápido das aneuploidias mais comuns (DRA) utilizadas no Laboratório. Para tal, compararam-se os resultados nas 236 amostras com alteração cromossómica pelo estudo do cariótipo (Fig.15), com aqueles que, teoricamente, teriam sido obtidos se a FISH em ANCs ou o MLPA tivessem sido aplicados a todos os casos. Estes resultados



representam uma extrapolação teórica e baseiam-se na suposição de que em todos os casos se obteriam resultados conclusivos. Para além da capacidade de deteção consideraram-se, igualmente, os casos em que as técnicas de DRA levantaram a suspeita da existência de uma alteração, ainda que, pela metodologia, não a tenha sido possível identificar com confiança (Tabela 7).

Dos 236 casos com alteração, detetada pelo estudo do cariótipo, a técnica de FISH em ANC's teria detetado 61,4% dos casos (Tabela 7): todas as alterações numéricas, excetuando as aneuploidias envolvendo outros autossomas (cromossomas 2, 9 e 20), e as alterações numéricas de 3 dos 4 casos em que foi detetada, simultaneamente, uma alteração estrutural. Nenhuma das alterações estruturais ou a presença de cromossoma marcador teriam sido detetadas, uma vez que a técnica é direcionada para o despiste das aneuploidias mais comuns (envolvendo os cromossomas 13, 18, 21, X e Y).

Pela técnica de MLPA a capacidade de deteção, considerando os 236 casos, rondaria os 47,9%. A maioria das aneuploidias mais comuns seriam detetadas, com exceção de três situações em que a aneuploidia se encontrava em mosaico (inferior a 30%). No entanto, em 8,5% o resultado da aplicação da técnica levantaria a suspeita da existência de uma alteração (como as triploidias masculinas e alterações envolvendo os cromossomas sexuais) que, todavia, não seria possível reportar com segurança, obedecendo aos critérios estabelecidos para a técnica. Por se tratar, igualmente, de um painel de sondas direcionado, nenhuma das alterações estruturais, aneuploidias envolvendo outros autossomas, cromossomas marcadores e algumas das triploidias (69,XXX) seriam identificadas (Tabela 7), correspondendo a 43,6% de alterações por diagnosticar.

Considerando as 7022 amostras estudadas pela citogenética convencional e as 13 que, apenas pelas técnicas de DRA (por não ter sido possível estabelecer cultura celular), mostraram um resultado normal confirmado noutra tecido ou um resultado patológico (Fig.15), resultando um total de 7035 amostras, avaliou-se a percentagem de concordância entre as duas metodologias (cariótipo vs DRA). Os resultados foram calculados com base naqueles que teoricamente teriam sido obtidos se o estudo do cariótipo e o DRA tivessem sido realizados, com resultados conclusivos, nas 7035 amostras de líquido amniótico estudadas. Uma vez que no Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC o MLPA é a técnica utilizada como rotina no DRA desde 2008, os resultados apresentados na Tabela 8 consideram, apenas, a aplicação desta metodologia. Entre ( ) encontra-se o número de casos

que, embora o resultado não pudesse ser concluído com confiança, levantaram a suspeita da existência de uma alteração. No cálculo da percentagem de concordância e de falsos negativos os valores entre [ ] foram calculados considerando o somatório dos casos que teriam sido diagnosticados (normais e com alteração cromossômica detetada pelo DRA) com os casos em que, embora não diagnosticados com confiança, indicaram uma possível alteração.

Às 236 alterações diagnosticadas pelo estudo do cariótipo somam-se as 5 cujo diagnóstico foi obtido apenas pela aplicação das técnicas de DRA. Destas apenas quatro poderiam ser identificadas pelo MLPA; a triploidia 69,XXX havia sido, na altura do seu estudo, identificada pela FISH em ANC.

As amostras referidas por indicação para estudos moleculares (G), ansiedade (H) e outros fatores (I) mostrariam uma concordância de 100% entre as duas metodologias.

Nas situações em que a indicação para o teste foi a existência de progenitor portador de cromossomopatia (D) a percentagem de concordância diminuiu para um valor inferior a 50%, ou seja, se a técnica de MLPA tivesse sido aplicada a todos os 32 casos em substituição do estudo do cariótipo, 53,1% representariam falsos negativos. Esta situação ocorre devido à direccionalidade do painel de sondas P095, utilizado como rotina para DRA, que não é específico para deteção de alterações estruturais. Utilizando um painel de sondas adequado seria possível, pela técnica de MLPA, identificar desequilíbrios cromossómicos.

Nas indicações A e E a percentagem de concordância seria elevada, rondando os 99%. Esta percentagem diminuiria nas indicações B, C e F, com o conseqüente aumento de resultados falsos negativos, se apenas o MLPA tivesse sido aplicado nestes casos - 4,2%, 3,1% e 1,9%, respetivamente – uma vez que nestas indicações clínicas aumenta, também, a percentagem de alterações não detetadas, devido à direccionalidade da técnica de DRA. Nas amostras referentes aos motivos B e C estes valores poderão ser ligeiramente inferiores se forem considerados os casos em que houve suspeita da existência de uma alteração (B: 3,2%; C:2,2%).

Tabela 8 – Cálculo da percentagem de concordância e de falsos negativos entre o estudo convencional e a técnica de MLPA nos 7035 casos

Indicação clínica	n	Estudo Convencional				Detecção pelo MLPA				% de concordância	% de falsos negativos		
		N	Alt. Num	Alt. Estr	Num + Estr	mar	N	Alt. Num	Alt. Estr			Num + Estr	mar
A	5094	4999	52	33	4	6	4999	38	-	(2*)	-	98,9% [99,1%]	1,1% [0,9%]
B	688	616	57	13	-	2	616	43	-	-	-	95,8% [96,8%]	4,2% [3,2%]
C	319	289	23	7	-	-	289	20	-	-	-	96,9% [97,8%]	3,1% [2,2%]
D	32	15	-	17	-	-	15	-	-	-	-	46,9%	53,1%
E	132	130	1	1	-	-	130	1	-	-	-	99,2%	0,8%
F	533	511	15	5	-	2	511	12	-	-	-	98,1%	1,9%
G	8	8	-	-	-	-	8	-	-	-	-	100%	-
H	55	55	-	-	-	-	55	-	-	-	-	100%	-
I	174	171	3	-	-	-	171	3	-	-	-	100%	-
Totais	7035	6794	151	76	4	10	6794	117	-	(2*)	-	98,2% [98,5%]	1,8% [1,5%]

(\*) nº de casos em que houve suspeita de alteração cromossômica; [] percentagem total, considerando o somatório dos casos diagnosticados (normais e com alteração) com os casos em que houve suspeita de alteração; \*refere-se, apenas, a suspeita de alteração numérica; N= normal; Alt. Num=alteração numérica; Alt. Estr= alteração estrutural; Num+Estr= alteração numérica e estrutural; mar=cromossoma marcador; n=total de amostras recebidas.

Considerando as 7035 análises, independentemente da indicação para a realização do teste, verificar-se-ia uma percentagem de concordância de 98,2% (ou 98,5% se forem consideradas as suspeitas de alteração) entre o estudo do cariótipo e a técnica de MLPA para despiste rápido de aneuploidias. Se esta metodologia fosse aplicada, numa primeira abordagem, em substituição do cariótipo, em 1,8% dos casos (124) não teria(m) sido detetada(s) a(s) alteração/alterações cromossómica(s) existentes (Tabela 8); em 0,3% (20 amostras) apesar de não ser possível reportar o resultado, a metodologia levaria à suspeita da existência de alteração cromossómica, o que reduz para 1,5% aquelas alterações que não seriam detetadas em absoluto.

Avaliou-se, por fim, o significado clínico (de acordo com a classificação da Tabela 2) das alterações encontradas nestes 1,5% (104 das 7035 amostras: 103 resultantes do estudo do cariótipo e uma triploidia, detetada pela FISH em ANC's, numa das amostras sem crescimento celular) Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Significado clínico das alterações encontradas nos 104 casos (1,5%) de falsos negativos

Indicação clínica	Risco Associado		
	Residual	Baixo	Elevado ou desconhecido
A (n=47)	21	6	20
B (n=22)	5	2	15
C (n=7)	4	3	-
D (n=17)	12	2	3
E (n=1)	1	-	-
F (n=10)	4	1	5
Total	47	14	43
% do total de alterações (n=104)	45,2%	13,5%	41,3%
% do total de amostras (n=7035)	0,7%	0,2%	0,6%

As siglas das indicação **A - F** estão referenciadas na Tabela 1; n= total casos

Os dados constantes na Tabela acima mostram que 41,3% das alterações que não teriam sido detetadas pela técnica de DRA (104 casos) apresentam um risco elevado ou

desconhecido de associação a manifestações fenotípicas. Considerando o total de casos em que foi realizado o estudo convencional e aqueles que mostraram, apenas por DRA, um resultado alterado ou normal, confirmado noutro tecido – 7035 – existiriam 0,6% de casos cuja alteração, de significado clínico, não seria diagnosticada se o MLPA para DRA fosse aplicado em substituição ao estudo do cariótipo.



**CAPÍTULO 5**  
**DISCUSSÃO**

As alterações cromossômicas, numéricas e estruturais, associadas muitas vezes a fenótipos de atraso mental e de desenvolvimento e a malformações congênitas, são detetadas em cerca de 1% dos recém-nascidos (Faas et al, 2011).

O estudo citogenético tem sido um componente importante no diagnóstico pré-natal. Apesar de envolver um procedimento invasivo para coleta do líquido amniótico, ao qual está associado uma taxa de perda fetal que varia entre 0,5% e 1% (Wilson et al, 2007), permite identificar alterações no número e estrutura dos cromossomos do feto, antes do nascimento. Esta informação torna possível aos progenitores tomar uma decisão informada acerca do curso daquela gestação, bem como aos profissionais de saúde preparar o acompanhamento neonatal. Permite, ainda, o planejamento de futuras gestações e, muitas vezes, o estudo de familiares em risco (Grimshaw et al, 2003).

O estudo do cariótipo é, desde a sua primeira aplicação, a técnica preferencial na realização do diagnóstico pré-natal citogenético. A observação dos cromossomos ao microscópio permite analisar não só o seu número como a sua estrutura, sendo possível detetar rearranjos estruturais superiores a 5Mb (Bui, 2011).

O estudo citogenético do cariótipo requer a cultura celular, tornando todo o processo dispendioso e demorado. O resultado do estudo é, normalmente, comunicado ao clínico até dezassete dias úteis, após a receção das amostras, de acordo com as recomendações da *European Cytogeneticists Association* (Hastings et al, 2012). Este estudo, obedecendo à Portaria 132/2009, publicada em Diário da República, tem um custo associado de 203,90 €.

O tempo de resposta demorado (15 a 21 dias), devido ao requisito de cultura celular, é apresentado como a grande desvantagem do estudo do cariótipo. Contudo, outras questões deverão, também, ser consideradas quando se procede à cultura celular. Um fator a ter em conta é a possibilidade de falha da cultura. Quando a amniocentese é feita precocemente as amostras poderão conter um número reduzido de células, insuficientes para estabelecer a cultura. Pelo contrário, se a amniocentese ocorre tardiamente, as células presentes na amostra, embora em grande número, poderão não ser viáveis para o estabelecimento da cultura celular (Grimshaw et al, 2003).

No LCG-FMUC, de 2006 a 2010 verificou-se ausência de crescimento celular em 59 amostras (Fig.15), o que corresponde a 0,83% de falha de cultura, com uma taxa de sucesso de 99,2%. Este resultado é superior ao sugerido pela *European Cytogeneticists*



*Association* (Hastings et al, 2012), que refere uma taxa mínima de sucesso de 98%. Nestas situações as técnicas de DRA foram aplicadas em 41 amostras; 3 apresentavam alterações cromossómicas e 38 um resultado normal (Fig.15). Uma vez que a confirmação do diagnóstico (por outra tecnologia ou noutra tecido) foi possível, apenas, em 6 das 38 amostras, as restantes 32 foram excluídas dos resultados para o cálculo da percentagem de concordância entre o cariótipo e o MLPA para DRA. Esta exclusão deve-se ao fato de 78,1% destas amostras terem como indicação clínica a existência de malformações ecográficas, pelo que será necessário colocar a possibilidade de apresentarem outras alterações cromossómicas, não detetadas pelos painéis de sondas utilizadas nos testes moleculares de DRA.

Outro aspeto a considerar numa cultura celular é a possibilidade de contaminação com células maternas, recolhidas em função do procedimento da amniocentese. Nalgumas situações a contaminação é detetável pela observação macroscópica da amostra, quando esta se apresenta sanguinolenta. Noutras situações poderá não ser visível, crescendo as células maternas, na cultura, em conjunto com as células fetais, o que poderá ter influência no resultado do estudo.

Em 65 amostras, de um total de 7022, foi detetada, em fetos masculinos (46,XY), contaminação com células maternas (46,XX). Apesar destas células ocorrerem em número reduzido, sempre que o Laboratório considerou necessário e, obedecendo aos critérios sugeridos pela *European Cytogeneticists Association* (Hastings et al, 2012), foi requerida uma ecografia, para confirmação do sexo do feto, ou procedeu-se ao estudo do despiste de contaminação materna, por teste molecular de análise de fragmentos. Nos resultados 46,XX esta suspeita não se pôs. O número reduzido de células maternas que foram identificadas nos fetos masculinos permite assumir que, nos fetos femininos, as metafases analisadas são representativas do material fetal.

Durante os últimos anos tem-se assistido a um desenvolvimento das técnicas de rastreio, nomeadamente o rastreio combinado (bioquímico e ecográfico) do primeiro trimestre para as aneuploidias mais comuns, que representam, juntamente com as triploidias, mais de 80% das alterações cromossómicas, com significado clínico, diagnosticadas no período pré-natal (Faas et al, 2011). O exame ecográfico do segundo trimestre, permite identificar uma elevada percentagem de anomalias fetais, antes das 24 semanas e, conseqüentemente, recorrer a estudos invasivos para recolha de material fetal

(Salomon et al, 2011). O desenvolvimento destes procedimentos fez ressaltar a necessidade da existência de testes mais rápidos, que permitam aos clínicos uma intervenção mais precoce nas situações de alto risco e aos progenitores aliviar a ansiedade, associada à realização de um teste citogenético (Faas et al, 2011).

No período de cinco anos considerado no presente estudo as alterações cromossômicas numéricas foram, de facto, os eventos mais frequentes, independentemente da indicação para a realização do estudo, representando 62,6% dos casos em que foram detetadas alterações (Tabela 3). De entre as alterações numéricas 79,5% dizem respeito às aneuploidias mais comuns (envolvendo os cromossomas 13, 18, 21, X e Y) (Tabela 4). As alterações estruturais representam 31,5% do total de casos com alteração, sendo que as equilibradas de origem familiar ocorreram com maior frequência (Tabela 6).

A aplicação da FISH em amniócitos não cultivados mostrou ser uma técnica eficaz na detecção rápida das aneuploidias mais comuns. Pela hibridização de cinco sondas específicas (disponíveis em painéis de sondas comerciais) em núcleos em interfase é possível, numa única experiência de hibridização, avaliar todos os cinco cromossomas associados às aneuploidias mais comuns: 21, 18, 13, X e Y (Faas et al, 2011; Grimshaw et al, 2003). Adicionalmente, em casos de fetos do sexo masculino é possível demonstrar a contaminação com células maternas (van Opstal et al, 2009). Tratando-se de fetos do sexo feminino poderá igualmente ser possível, nalgumas situações, distinguir, as células interfásicas fetais das maternas, com base na sua morfologia (Winsor et al, 1996). Esta metodologia foi a utilizada no Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC até 2008.

Outra técnica vastamente utilizada no estudo do despiste rápido de aneuploidias é a *quantitative fluorescent polymerase chain reaction* (QF-PCR), que se baseia na amplificação de pequenas sequências polimórficas – STRs (Faas et al, 2011). Os marcadores escolhidos apresentam um elevado grau de polimorfismo pelo que a existência de marcadores não informativos (devido à possibilidade de homozigotia) é reduzida. Esta situação é, no entanto, ultrapassada pela inclusão, na reação multiplex, de mais marcadores para cada cromossoma em estudo. De fato, atualmente, os *kits* de QF-PCR incluem marcadores polimórficos em número suficiente para a obtenção de resultados conclusivos (Faas et al, 2011). Como a FISH, permite obter resultados em 24-48 horas. No entanto, torna-se menos dispendiosa em termos de tempo de execução e de análise; permite o processamento, em simultâneo, de um maior número de amostras e a análise dos resultados

é mais automatizada, comparativamente à FISH (Grimshaw et al, 2003; Shaffer e Bui, 2007).

O MLPA, uma variante da técnica de PCR, constitui uma poderosa ferramenta no DRA. À semelhança da FISH em ANC e o QF-PCR permite obter um resultado em 24-48h, não sendo necessária a realização de cultura celular. Esta metodologia permite analisar várias sequências alvo, numa única reação, com baixo teor de DNA (20 ng); é menos trabalhosa, permite uma maior automatização e é mais económica, quando comparada ao cariótipo ou à FISH em ANC (van Opstal et al, 2009) e, por analisar *loci* de sequência única, é eliminado o potencial problema dos resultados não informativos que se verifica na técnica de QF-PCR (Faas et al, 2011).

Como a FISH em ANC e o QF-PCR, o MLPA apresenta a limitação inerente aos métodos direcionados: identificam, apenas, as alterações cromossómicas para as quais foram desenhados (Comas et al, 2010). Contrariamente àquelas metodologias, e por ser uma técnica de análise semi-quantitativa, não permite a deteção de triploidias 69,XXX; não tem, também, a capacidade de identificar a contaminação da amostra com material materno (Gerdes et al, 2008).

A escolha da técnica para DRA depende da preferência de cada laboratório, de acordo com recursos técnicos, de conhecimentos e de experiência. No Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC a técnica de MLPA é a metodologia utilizada como rotina, no DRA, desde 2008, substituindo a FISH em ANCs.

Comparativamente à FISH a técnica de MLPA é menos laboriosa, tanto no trabalho prático como no de interpretação de resultados. Permite o estudo de várias amostras em simultâneo e é mais económica, tanto para o laboratório como para o utente; de acordo com a Portaria 132/2009 o custo associado à realização de um teste de MLPA é ligeiramente superior a metade do da FISH em ANCs

Atualmente os testes de DRA são utilizados como complemento do cariótipo, sempre que seja premente o despiste das aneuploidias mais comuns. Deste modo é possível obter um primeiro resultado em 24-48h (que permite uma intervenção mais rápida, por parte da clínica, ou uma melhor gestão da ansiedade dos progenitores) e, posteriormente, o resultado do cariótipo, que avalia o número e estrutura de todos os cromossomas. Esta estratégia combinada, apesar de constituir a situação ideal, aumenta claramente o custo

associado ao diagnóstico pré-natal citogenético, sendo incomportável para os laboratórios a sua realização em todas as situações referidas para a realização do teste.

Uma nova estratégia, com base nas revisões publicadas (que analisam largas séries de amniocenteses e biópsias do trofoblasto) tem vindo a desenvolver-se nos últimos anos. De acordo com a nova proposta deverá o resultado da ecografia fetal ser o fator determinante para o estudo, ou não, do cariótipo, após realização dos testes para despiste rápido de aneuploidias (Faas et al, 2011).

Nalguns centros europeus a estratégia acima referida foi já adotada, com redução de custos. Em Estocolmo (Suécia) e Nijmegen (Holanda) às grávidas cujos fetos apresentam um risco residual de serem portadores de alteração cromossómica é dada a possibilidade de escolha entre a realização do teste rápido ou do estudo do cariótipo (Faas et al, 2011). Em parte do Reino Unido é aceite, desde 2006, que o DRA é suficiente em gestações referidas por risco aumentado de trissomia 21, sem anomalias ecográficas (Hills et al, 2010; Faas et al, 2011). Tanto numa como noutra situação é realizado o estudo do cariótipo, após DRA, sempre que são observadas anomalias na ecografia.

Esta nova estratégia tem sido, contudo, objeto de críticas. Apesar dos testes moleculares, mais rápidos e mais económicos, serem eficazes na deteção das aneuploidias mais comuns (que representam cerca de 80% das anomalias cromossómicas com significado clínico), estima-se que 15% a 30% das alterações cromossómicas detetadas pelo cariótipo não o serão pelas técnicas de DRA (Gekas et al, 2011).

O estudo comparativo, entre a citogenética convencional e as técnicas de DRA, apresentado neste trabalho representa uma extrapolação teórica do que seria expectável se a FISH em ANC's ou a técnica de MLPA tivessem sido aplicadas, com sucesso, a todas as amostras recebidas no LCG-FMUC, num período de cinco anos.

Avaliando os resultados do presente estudo verifica-se que das 236 alterações detetadas pela análise do cariótipo as técnicas de DRA não despistariam 38,6% ou 43,6% dessas alterações, consoante se tratasse da FISH em ANC's ou do MLPA, respetivamente (Tabela 7). Esta diferença deve-se, por um lado, à não deteção, pela técnica de MLPA, das triploidias 69,XXX (8 em 12), bem como das aneuploidias mais comuns que se apresentavam em situação de mosaicismo – 3 casos – e, por outro lado, às 20 amostras (8,5%) cujo resultado, apesar de não poder ser reportado sem confirmação, por não obedecer aos critérios estabelecidos para a técnica, levantaria a suspeita da existência de

uma alteração (como as triploidias masculinas e alterações envolvendo os cromossomas sexuais), o que poderia influenciar a estratégia do laboratório no sentido de ser possível, mais rapidamente, o estudo do cariótipo. Todas estas suspeitas teriam sido detetadas pela FISH em ANCs. Nenhuma das metodologias teria detetado os rearranjos estruturais, que representam 31,5% das alterações, a presença de cromossomas marcadores (4,1%), nem as aneuploidias envolvendo outros autossomas (1,6%).

Com o objetivo de avaliar se a substituição do cariótipo pelas técnicas de DRA seria viável no diagnóstico pré-natal de grávidas incluídas em grupos específicos de referências, avaliou-se a percentagem de concordância, entre o estudo do cariótipo e a técnica de MLPA, de acordo com a indicação para o teste (Tabela 8), se estas metodologias tivessem sido aplicadas ao total das amostras consideradas.

Nas situações referidas por apresentarem malformações ecográficas (B), sinais ecográficos de alerta (C) ou um progenitor portador de alteração (D) a percentagem de resultados falsos negativos é bastante elevada - acima dos 3%, atingindo mais de 50% no motivo D. Nestas gestações o estudo convencional para a realização do DPN, é indiscutivelmente, o método preferencial não podendo ser substituído pelas técnicas de DRA como método único de diagnóstico.

Nas amostras referidas com indicação para estudos moleculares (G) e ansiedade materna (H) não foram detetadas quaisquer alterações cromossómicas (Tabela 3) pelo que, se as técnicas de DRA tivessem sido utilizadas em substituição do cariótipo, a percentagem de concordância entre as duas metodologias seria de 100% (Tabela 8). Valor idêntico seria obtido na indicação I (outros fatores - como a sensibilização Rh, p.e.), uma vez que as alterações encontradas teriam sido todas identificadas pelo DRA. Será, no entanto, conveniente avaliar cautelosamente estes resultados, uma vez que estas amostras somadas contabilizam, apenas, 3,3% do total de casos recebidos. Num estudo publicado por Hills e colaboradores (2010), que avalia a experiência de dois anos de utilização do QF-PCR para DRA, como método único de diagnóstico, na região de Londres, verificou-se que 0,3% das amostras referidas sem indicação clínica para a realização do cariótipo, revelaram uma alteração cromossómica não detetada pela técnica de QF-PCR.

Nos últimos cinco anos tem sido debatido, pela comunidade científica europeia, a possibilidade de substituir o cariótipo pelas técnicas de DRA no diagnóstico pré-natal de idades maternas avançadas ou risco acrescido de trissomia 21, após rastreio integrado do

primeiro trimestre, sem malformações ecográficas (Boormans et al, 2010a, Hills et al, 2010).

Leung e colaboradores (2008) reportaram um estudo baseado na revisão de 19517 amostras de LA, referidas por IMA. Das 333 alterações diagnosticadas pelo estudo do cariótipo a técnica de DRA detetou 175 (52,6%), que diziam respeito às aneuploidias mais comuns. A percentagem de concordância entre o método clássico e o de DRA foi de 99,2%, com 0,8% de resultados falsos negativos; destes 39,9% representam alterações com significado clínico.

Considerando os resultados do LCG-FMUC, foram recebidas 5107 amostras (72%) referidas por IMA (Fig.14); em 9 não foi possível obter um resultado citogenético (Tabela 3) e em 4 o DRA não indicou nenhuma alteração; estes resultados não foram confirmados noutro tecido, pelo que foram, também, excluídos. Para o estudo comparativo consideraram-se, então, 5094 amostras referidas por idade materna avançada (Tabela 8).

O estudo do cariótipo revelou 95 alterações (numéricas, estruturais, numérica e estrutural em simultâneo e presença de cromossoma marcador), 43,2% das quais referentes às aneuploidias mais comuns (Tabela 4). A técnica de MLPA detetou inequivocamente 38 das 95 alterações (40%) e indicou a existência de alterações em 10 outros casos, que necessitaram de confirmação pelo cariótipo. A existência de uma suspeita de alteração poderá alterar a estratégia do laboratório com vista a permitir, mais precocemente, o estudo do cariótipo de modo a reduzir o tempo de resposta nas situações de risco. A percentagem de concordância foi de 98,9%, com 1,1% de falsos negativos (referentes às alterações estruturais, cromossomas marcadores, alterações em mosaico e aneuploidias de outros autossomas); 42,6% destes com significado clínico (Tabela 8 e Tabela 9).

Comparando os resultados apresentados neste estudo com os publicados por Leung e colaboradores (2008) verifica-se que a percentagem de concordância é ligeiramente inferior e, conseqüentemente, aumenta a percentagem de falsos negativos (1,1% neste estudo contra 0,8% no estudo publicado). Contudo, se considerarmos, também, os resultados que fizeram suspeitar a existência de alteração (8 casos) e que não seriam, portanto, erradamente diagnosticados como sendo normais as percentagens de concordância e de resultados falsos negativos aproximam-se muito das obtidas no estudo de Leung e co-autores (2008) (Tabela 8) (99,1% de concordância entre as duas técnicas, com 0,9% de resultados que não seria, de fato, diagnosticados), embora que, no nosso caso,

as alterações com significado clínico apresentem valores ligeiramente superiores (42,6% contra os 39,9% no estudo publicado).

Relativamente ao diagnóstico pré-natal das gestações com risco acrescido de trissomia 21 (sem malformações ecográficas) após rastreio do primeiro trimestre, é importante considerar, segundo alguns autores, a própria natureza do teste: é desenhado para rastrear a síndrome de Down pelo que, um diagnóstico direcionado deverá satisfazer as expectativas tanto dos clínicos como dos progenitores (Kooper et al, 2008).

No estudo retrospectivo publicado por Caine e colaboradores (2005), integrando 98166 amostras foram detetadas 3081 alterações pelo estudo do cariótipo sendo que 2075 (67%) foram identificadas, também, pela técnica de DRA, referindo-se às aneuploidias mais comuns e triploidias. A percentagem de concordância foi de 99%, com 1% de resultados falsos negativos (rearranjos estruturais, cromossomas marcadores, tetraploidias, alterações envolvendo os cromossomas sexuais e aneuploidias de outros autossomas). Destes, 8% apresentavam risco elevado de desenvolvimento de manifestações fenotípicas, e referiam-se, apenas, aos rearranjos estruturais desequilibrados.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos acima referidos, podendo esta diferença residir na capacidade de deteção das técnicas utilizadas nos dois estudos. Caine e colaboradores (2005) compararam a capacidade de deteção da FISH e da PCR com o cariótipo, não incluindo o MLPA, considerado neste estudo comparativo.

No LCG-FMUC, no período de cinco anos, foram recebidas 534 amostras referidas após rastreio positivo (Fig.14); numa delas não foi possível obter resultado. Assim, em 533 amostras foram encontradas 22 alterações (Tabela 8), 54,5% das quais correspondentes às aneuploidias mais comuns (Tabela 4). A técnica de MLPA detetou, apenas, aquelas alterações. A percentagem de concordância entre as duas metodologias foi de 98,1%, com 1,9% de falsos negativos, que se referem a triploidias femininas, alterações estruturais e cromossomas marcadores; 50% destes casos apresentavam significado clínico.

Comparativamente ao trabalho de Caine e co-autores (2005) a percentagem de alterações com risco elevado ou desconhecido é consideravelmente superior. No trabalho publicado os 8% referem-se, apenas, às situações que apresentam risco elevado de associação a manifestações fenotípicas. Se forem considerados os valores classificados pelos autores como sendo de “risco baixo a elevado”, onde se incluem as situações de risco

desconhecido (consideradas de significado clínico no nosso estudo), aquela percentagem deverá aumentar para os 65%.

Considerando o total de amostras (7035) incluídas no presente estudo, independentemente da indicação para a realização do teste, os resultados mostram que, se o MLPA para DRA fosse aplicado, em substituição do estudo convencional, em 1,8% dos casos não teriam sido detetadas as alterações cromossómicas existentes (Tabela 8). No entanto, em 0,3% daqueles (20 amostras: triploidias masculinas e alterações envolvendo os cromossomas sexuais), apesar de não ser possível reportar o resultado sem confirmação, existiria a suspeita de alteração cromossómica, o que reduz para 1,5% as situações que não seria detetadas em absoluto e que se referem às alterações estruturais, cromossomas marcadores, triploidias femininas, alterações comuns em mosaico e trissomias envolvendo outros autossomas (cromossomas 2, 9 e 20). Apesar da limitação do presente estudo, que apresenta a comparação entre duas metodologias com base em valores teóricos expectáveis, os resultados são concordantes com outros publicados na literatura.

No estudo de Kooper e co-autores (2008), considerando 996 amostras (74% referidas por IMA e rastreio positivo) e utilizando a técnica de MLPA, a percentagem de resultados falsos negativos é de 2,4% - valor superior ao calculado neste estudo (Tabela 8). Gerdes e colaboradores (2008) avaliaram mais de 3700 amostras, utilizando a mesma metodologia, referidas principalmente após rastreio positivo. Os resultados mostraram uma percentagem de concordância de 98,3%, muito semelhante à calculada por nós (Tabela 8). van Opstal e colaboradores (2008), considerando todas as indicações para a realização do teste e comparando os dois métodos avaliados por nós, obteve percentagens de concordância e de falsos negativos (98,1% e 1,9%, respetivamente) muito próximos dos obtidos neste trabalho.

Mais recentemente foi publicado um estudo, por Comas e co-autores (2010), que como o presente estudo se baseia numa comparação teórica de resultados. Avaliando 4007 amostras referidas pelas diversas indicações e comparando o método clássico com o QF-PCR para DRA, verificou-se que apenas 0,8% dos casos escapariam ao correto diagnóstico. Este valor é consideravelmente inferior ao calculado no presente trabalho (1,5%). Contudo, no estudo de Comas e colaboradores (2010) a maioria das amostras foi referida por ansiedade materna, IMA e rastreio positivo. No LCG-FMUC as principais indicações para a realização do teste foram, pelo contrário, a IMA, a deteção de malformações na ecografia



fetal e o rastreio positivo (Fig.14). Esta diferença, assim como a metodologia utilizada nos dois estudos, poderá justificar a discordância entre os resultados.

Atendendo, apenas, ao ponto de vista económico a substituição do cariótipo pelas técnicas de DRA parece vantajosa, dado que, por cada amostra seria possível ao Serviço Nacional de Saúde uma poupança de cerca de 12%. Esta substituição implicaria, no entanto, uma certa percentagem de resultados falsos negativos. O nascimento de crianças afetadas, para além do grande impacto social e emocional nas famílias tem, também, custos associados. Estes são suportados em grande parte pelas famílias embora tenham, igualmente, uma participação do Estado. Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que o custo associado ao tratamento e suporte de um indivíduo com atraso mental ascenda aos \$1 milhão (cerca de 748.727,164 €), no decorrer da sua vida (Topper et al, 2011). Também no conjunto de Estados Membros da União Europeia, onde a política de saúde pública é diferente da praticada nos EUA, os custos são notáveis. Estima-se que a despesa nos cuidados de saúde, associados aos problemas de saúde mental, deverão representar cerca de 2% do produto interno bruto (WHO, 2003).

Os resultados reportados no presente estudo, bem como os publicados na literatura, mostram que apesar de os métodos de DRA permitirem um diagnóstico mais rápido e mais económico das aneuploidias mais comuns, se forem utilizados em substituição do cariótipo alterações estruturais, mosaicismo e cromossomas marcadores não serão diagnosticadas. As triploidias e as alterações dos cromossomas sexuais (que não o 45,X) serão detetadas ou apenas suspeitadas, dependendo da técnica utilizada. No caso de existir suspeita de alteração é possível, ao laboratório, alterar a sua estratégia no sentido de, mais rapidamente, ser possível comunicar o resultado ao clínico. Uma suspeita requer sempre a confirmação antes da emissão do relatório final.

Uma corrente de opinião defende, contudo, que alguma da informação que se obtém pelo estudo do cariótipo, por ter significado clínico limitado ou desconhecido, deveria ser evitada, poupando os progenitores a decisões difíceis, baseadas nessa informação (Jong et al, 2011). Um estudo recente sugere que os profissionais de saúde prefeririam, maioritariamente, que fossem detetadas as alterações de risco elevado e que não fossem detetadas outras que apresentem um risco clínico irrelevante (Boormans et al, 2010b). Pelo contrário, existe outra corrente de opinião que considera importante não falhar a sua

deteção, para que os progenitores possam tomar as suas decisões com a máxima autonomia, dispondo de toda a informação possível (Jong et al, 2011).

Tanto as técnicas moleculares para DRA como o estudo do cariótipo requerem a colheita de material fetal, obtido através de procedimentos invasivos. Do ponto de vista económico e do tempo de resposta as primeiras parecem vantajosas. Contudo tem que ser considerado, também, o seu poder de deteção limitado. As questões subjacentes à discussão, acerca da substituição do cariótipo pelas técnicas de DRA nalguns grupos, são por um lado se a limitação das técnicas moleculares justifica a realização dos procedimentos invasivos e por outro lado se serão os progenitores e profissionais de saúde capazes de aceitar as falhas de deteção resultantes dessas limitações em favorecimento de uma maior rapidez de diagnóstico.

As grávidas parecem ter posições diferentes no que se refere à importância de ambos os testes. A ansiedade e o tempo de espera parecem ter, de fato, influencia na preferência pelo teste, embora o significado clínico das alterações encontradas também se apresente como fator relevante (Jong et al, 2011).

No estudo de Grimshaw e colaboradores (2003) foi avaliado o nível de ansiedade das grávidas na altura da amniocentese. Foram criados dois grupos: um composto por grávidas a quem seria oferecido o DRA e, posteriormente, o estudo do cariótipo e outro a quem seria oferecido, apenas, o estudo do cariótipo.

Verificou-se que, à altura da colheita o nível de ansiedade nos dois grupos está aumentado relativamente aos níveis médios da população. Contudo, não existem diferenças significativas entre os dois. Os níveis baixam, em ambos, de forma semelhante após a receção do primeiro resultado. No grupo em que o DRA é complementado pelo estudo do cariótipo o nível de ansiedade iguala o da população após a receção daquele resultado. No outro grupo este valor só é atingido algumas semanas depois (Grimshaw et al, 2003). Um estudo mais recente, publicado por Boormans e colaboradores (2010a), divulgou conclusões semelhantes: a ansiedade, o bem-estar físico e mental e o *stress* são idênticos quer se aguarde pelo resultado do DRA quer pelo do cariótipo.

Grimshaw e co-autores (2003) avaliaram, também, o grau de preferência pela realização dos testes de DRA ou pelo estudo do cariótipo. Foram, para o efeito, considerados quatro grupos: público em geral, grávidas, companheiros e prestadores de cuidados de saúde.

O grupo constituído pelo público em geral expressa maior preferência pela realização do estudo do cariótipo, mostrando maior disponibilidade financeira por este teste que pelos testes moleculares. A maioria das grávidas e companheiros mostraram, pelo contrário, uma preferência para a realização do teste de DRA, à altura da amniocentese. Esta tendência diminui significativamente após a receção do resultado; nesta fase o grupo constituído pelos companheiros evidencia, ainda, uma disponibilidade maior para aumentar o valor a pagar pelo estudo do cariótipo, comparativamente aos testes de DRA. No que se refere ao grupo constituído pelos profissionais de saúde inquiridos, não existem diferenças significativas na preferência por um ou outro teste (Grimshaw et al, 2003).

A relação custo-benefício, sob ponto de vista dos progenitores, varia de acordo com as suas expectativas relativamente ao teste. Numa situação em que os progenitores esperem, apenas, a exclusão da síndrome de Down, por exemplo, a relação custo-benefício dos testes moleculares é claramente superior. Pelo contrário, se a necessidade de informação acerca do feto for mais abrangente então a falta de informação, inerente às técnicas de DRA, suplantará a diminuição do tempo de resposta, perdurando um certo nível de incerteza até à altura do parto (Grimshaw et al, 2003).

Considerando, por outro lado, o ponto de vista dos clínicos e atendendo a que parte das anomalias com significado clínico relevante serão detetadas no exame ecográfico do segundo trimestre, a diminuição no tempo de resposta, conseguida pela aplicação das técnicas moleculares, deveria compensar alguma falta de informação que pudesse ocorrer (Grimshaw et al, 2003). Contudo, nestas situações em que um resultado desfavorável é detetado mais tardiamente (mais até, quando comparado ao tempo de espera pelo resultado do cariótipo) poderá ser difícil, aos profissionais de saúde, explicar aos futuros pais a opção por um teste limitado no DPN, na tentativa de proteger o bem-estar da grávida (Jong et al, 2011), em primeiro lugar, e reduzir custos.

Há relatos na literatura de progenitores que se mostram bastante contrariados e desiludidos pelo nascimento de um filho com síndrome de Down. Estes sentimentos são tendencialmente maiores nas situações em que houve um rastreio com resultado negativo, sentindo-se os progenitores traídos nas suas expectativas, por considerarem, erradamente, que um rastreio negativo é sinónimo de um feto saudável (Hall et al, 2000).

Hall e colaboradores (2000) publicaram um estudo retrospectivo que compara a capacidade de adaptação dos pais, uns com rastreio negativo para a síndrome de Down e

outros que não realizaram o teste de rastreio (por recusa ou por não lhes ter sido oferecido), ao nascimento de uma criança afetada. Apesar de os pais, de um modo geral, acabarem por se adaptar bem à situação inesperada, aqueles que tiveram um rastreio negativo mostram índices mais elevados de *stress* e negatividade relativamente à criança. Mostram igualmente uma maior tendência para culpabilizar os profissionais de saúde e o sistema de saúde em geral, por não se ter detetado aquela condição no período pré-natal.

Se os testes moleculares forem utilizados em substituição do cariótipo, algumas alterações cromossómicas, que seriam diagnosticadas pelo estudo convencional, só serão detetadas já tarde na gestação ou após o nascimento, o que poderá ser de difícil compreensão e aceitação pelos progenitores. Apesar de serem mais rápidos e mais económicos, se a grávida se submete a um procedimento invasivo, o tempo de resposta e o custo associados deverão ser de menor importância quando comparados com informação que se obtém de cada um dos testes.

A realização de um teste de diagnóstico pressupõe que os benefícios a retirar por realizar o teste se sobrepõem às desvantagens que lhes possam estar associadas. O objetivo das políticas económicas dos cuidados de saúde deverá ser o da aplicação do teste que melhor sirva o propósito do diagnóstico, considerando justificáveis os custos que lhe estão associados (Jong et al, 2011).

**CAPÍTULO 6**  
**CONCLUSÃO E**  
**PERSPETIVAS FUTURAS**

No LCG-FMUC, de 2006 a 2010, foram recebidas 7089 amostras de líquido amniótico, referidas essencialmente por idade materna avançada, malformações ecográficas, rastreio positivo e sinais ecográficos de alerta. A percentagem de casos com alteração detetada foi de 10% no grupo com malformação ecográfica, 9,4% nos sinais de alerta, 4,1% nos rastreios combinados (bioquímico e ecográfico) positivos e de 1,9% nas IMA.

As alterações cromossómicas numéricas foram, como previsível, mais frequentes representando 62,6% dos casos com alteração. Destes, a grande maioria referia-se às aneuploidias mais comuns (envolvendo os cromossomas 13, 18, 21, X e Y). Neste grupo as indicações clínicas foram, maioritariamente, a idade materna avançada e malformações ecográficas, sem que se verificassem diferenças significativas entre os dois grupos. Dos rearranjos estruturais, representando 31,5% das alterações, os equilibrados de origem familiar ocorreram num maior número de casos. As principais indicações para o estudo foram, igualmente, a IMA assim como progenitor portador de cromossomopatia e malformação ecográfica. Nas amostras em que foi detetada uma anomalia estrutural, em simultâneo com uma numérica, ou em que se identificou um cromossoma marcador, o principal motivo para o DPN citogenético foi a IMA.

A técnica de DRA utilizada inicialmente no Laboratório foi a FISH em ANC's, tendo sido substituída pelo MLPA. Ambas permitem obter resultados mais rápidos, por não requererem cultura celular, e revelam grande sensibilidade no diagnóstico das aneuploidias mais comuns. No entanto, por serem direcionadas, só identificam as alterações para que forem concebidas. O estudo do cariótipo, apesar de permitir a observação do genoma como um todo, apresenta um tempo de resposta mais demorado e uma maior dificuldade de automatização (as metodologias envolvidas e a análise microscópica requerem muita experiência por parte dos técnicos).

A comparação entre a FISH em ANC's e o MLPA, relativamente às alterações detetadas pelo estudo do cariótipo mostrou, no presente trabalho, que a primeira seria mais eficiente na deteção das alterações (61,4% contra 47,9%, respetivamente). Sendo ambas tecnologias direcionadas para cromossomas ou *locus* específicos nenhuma delas teria capacidade para detetar aneuploidias envolvendo outros autossomas ou *loci*, alterações estruturais ou cromossomas marcadores (que representam somadas 37,2% das alterações

detetadas). O MLPA não detetaria, igualmente, as triploidias femininas, e em 8,5% dos casos (triploidias masculinas e alterações envolvendo os cromossomas sexuais) levantaria, apenas, a suspeita da existência de uma alteração (embora não fosse possível reportar o resultado sem prévia confirmação). Esta técnica é, contudo, mais económica que a FISH em ANC's em termos de tempo e custos, permitindo a análise de várias sequências de DNA numa única reação e a avaliação de vários pacientes em simultâneo.

Nos últimos anos tem sido debatido, pela comunidade científica, a possibilidade de substituir o cariótipo pelas técnicas de DRA, principalmente nos grupos referidos por IMA ou rastreio positivo, sem malformações ecográficas.

Os resultados obtidos no presente trabalho, assim como outros já publicados, indicam que a substituição do estudo do cariótipo pelo MLPA determinaria uma percentagem de resultados falsos negativos próxima de 1% no grupo referido por IMA e entre 1% a 2% nos rastreios integrados (bioquímico e ecográfico) positivos. Em ambos os casos verificámos que mais de 40% das alterações não detetadas apresentavam risco elevado ou desconhecido de cromossomopatia.

Considerando todas as indicações clínicas para a realização do DPN citogenético a maioria dos estudos reportados na literatura apresenta uma percentagem de resultados falsos negativos que varia entre 1,7% e 2%. Os resultados obtidos no presente trabalho são concordantes com aqueles valores (1,8% ou 1,5%, considerando as situações em que ocorre suspeita de alteração).

O risco de não deteção de cromossomopatia parece ser superior ao risco de perda fetal, associado à realização da amniocentese. Torna-se, portanto, relevante avaliar se a realização de um procedimento invasivo se justifica, mediante as limitações dos testes de DRA, se estes forem realizados como primeira abordagem de estudo.

Do ponto de vista económico a realização dos testes moleculares permitiriam uma poupança de 12%, por amostra. No entanto, o nascimento de uma criança afetada, para além do enorme impacto socioeconómico nas famílias, representa, também, um custo para o Estado, nalgumas situações bastante elevado.

Relativamente ao tempo de resposta as técnicas de DRA permitiriam uma redução significativa, com divulgação de resultados em 24-48h, para a maioria das amostras referidas, o que permitiria reduzir a ansiedade parental ou intervenções clínicas mais precoces. De acordo com estudos publicados são as expectativas dos progenitores,

relativamente ao resultado do DPN, que determinam a preferência pelo teste molecular ou pelo estudo do cariótipo. Alguns valorizam a rapidez do resultado e outros a informação obtida, mostrando, inclusivamente, maior disponibilidade económica para o estudo convencional. Nestas situações a substituição do cariótipo por testes moleculares não contribuiria para reduzir a ansiedade materna, permanecendo uma certa incerteza até à altura do parto.

Em função das condições socioeconómicas, profissionais, culturais, e outras, tem-se verificado, nos últimos anos, um aumento nas gestações em mulheres com mais de 35 anos. Esta nova situação, a par do desenvolvimento dos métodos de rastreio, tem inspirado o debate na comunidade médico-científica acerca das novas abordagens para o diagnóstico pré-natal.

Uma estratégia, em franco desenvolvimento, refere-se à realização do estudo genético em material fetal obtido de forma não invasiva. É já do conhecimento, na comunidade científica, a presença de células fetais na circulação materna, o que possibilitaria o DPN a partir da análise de sangue materno. Todavia estas células são escassas e muitas delas tendem a manter-se na circulação materna durante alguns anos após a gestação, o que dificulta o seu isolamento e identificação para um diagnóstico credível (Chiu e Lo, 2011). Muitas metodologias foram já avaliadas, embora nenhuma com sucesso comprovado.

Em 1997 Lo e colaboradores reportaram a existência de DNA fetal livre (cffDNA) no plasma materno. Este DNA pode ser detetado por técnicas moleculares básicas algumas semanas após a conceção e constitui cerca de 10% do DNA existente no plasma da mãe (Chiu e Lo, 2011). O seu desaparecimento, algumas horas após o nascimento, torna improvável a contaminação com material proveniente de uma gestação anterior (Ehrich et al, 2011). Este cffDNA parece ser uma fonte promissora de material fetal, possibilitando o DPN não invasivo. Na realidade esta metodologia é já aplicada na prática clínica para identificação do sexo do feto, no DPN de doenças genéticas ligadas ao cromossoma X, ou na determinação do grupo Rh fetal, em grávidas RhD negativas (Chiu e Lo, 2011).

A deteção de aneuploidias utilizando esta fonte de DNA fetal também tem merecido a atenção da comunidade científica. Todavia os desafios são, para este efeito, maiores; por um lado a presença de DNA materno em grande quantidade dificulta a análise do DNA



fetal e por outro a própria natureza destas sequências que causa dificuldade na determinação da dosagem do cromossoma no feto (Chiu e Lo, 2011).

Vários métodos foram já aplicados para a determinação de aneuploidias fetais. Destes, os dados mais satisfatórios foram obtidos recorrendo à sequenciação de nova geração (Ehrich et al, 2011; Chiu e Lo, 2011). Apesar de promissor é necessário resolver algumas questões antes da implementação clínica desta metodologia. Será necessário diminuir a complexidade de todo o procedimento, bem como os custos associados à sua realização, assim como reduzir o tempo de resposta, de modo a satisfazer as expectativas dos pacientes (Ehrich et al, 2011).

Outro aspecto importante a considerar é a inclusão, no rastreio, das trissomias 13 e 18. Tem-se demonstrado que os protocolos desenvolvidos para a deteção da trissomia 21 não produzem resultados tão consistentes quando se aplicam àquelas trissomias, pelo que é necessário o desenvolvimento de outros protocolos, que permitam melhores resultados, e posterior validação (Chiu e Lo, 2011).

Apesar de o DPN não invasivo, para despiste de aneuploidias, poder ser uma realidade na prática clínica num futuro relativamente próximo, atualmente ainda envolve procedimentos laboriosos, requer equipamentos e tecnologias dedicadas e os serviços de técnicos bioinformáticos. Assim sendo torna-se difícil de prever o tempo que decorrerá até à sua introdução como prática de rotina (Hahn et al, 2011).

Outro assunto atualmente em debate entre os citogeneticistas é a possibilidade de, num futuro próximo, a tecnologia de *microarray-based comparative genomic hybridization* (aCGH) substituir o cariótipo tradicional. Nesta tecnologia o DNA do paciente e o de referencia são marcados com cores diferentes e hibridizados na plataforma de *array*, que contém fragmentos genómicos. O poder de resolução, muito superior ao do cariótipo, depende do número e tamanho desses fragmentos (Zuffardi et al, 2011).

Estudos reportados demonstraram que o aCGH permite uma maior capacidade de diagnóstico, comparativamente ao cariótipo, em pacientes com atraso de desenvolvimento/mental idiopático. Por este motivo a comunidade médica e científica emitiu um parecer que recomenda a utilização desta tecnologia, como teste de primeira linha, em pacientes com atraso de desenvolvimento ou anomalias congénitas (Zuffardi et al, 2011).

A aplicação do aCGH no diagnóstico pré-natal permitiria detetar os rearranjos desequilibrados, mesmo os sub-microscópicos, e caracterizá-los melhor, possibilitando uma

melhor previsão do fenótipo; por não necessitar de células em cultura faria diminuir os tempos de resposta. Todavia o aCGH tem, ainda, um uso limitado no DPN, principalmente devido às CNVs (*copy number variations*) e à dificuldade de as interpretar quando se trata de variantes de significado clínico desconhecido, impossibilitando a correlação genótipo-fenótipo (Zuffardi et al, 2011).

Atualmente existem algumas bases de dados que reúnem informação acerca do fenótipo e correspondente genótipo de pacientes com múltiplas anomalias congénitas. Esta informação é, no entanto, escassa quando se trata de diagnóstico pré-natal e alguns dilemas tendem a surgir, nomeadamente a gestão da informação quando são identificadas CNVs de significado clínico, sem que o feto apresente alterações ecográficas, ou quando são identificados fatores de risco (de doenças de manifestação tardia, infertilidade, p.e.) (Zuffardi et al, 2011).

O aCGH tem sido aplicado com sucesso no estudo de produtos de abortamento, onde a ocorrência de alterações cromossómicas desequilibradas é elevada. Esta tecnologia permite identificar rearranjos sub-microscópicos em amostras que revelaram um cariótipo normal ou naquelas onde ocorreu falha da cultura celular. A identificação destas alterações, para além da influência positiva no conforto emocional destes progenitores, contribuem para a determinação da correlação genótipo-fenótipo das referidas alterações. Permitem, ainda, despoletar o estudo citogenético dos progenitores, identificando potenciais rearranjos cromossómicos familiares, favorecendo o aconselhamento genético em gestações futuras, assim como permitindo o estudo de familiares em risco (Zuffardi et al, 2011).

Nas amostras referidas por IMA ou rastreio positivo (bioquímico ou o integrado do primeiro trimestre) em que existe, essencialmente, o risco de aneuploidia, o aCGH, apesar de eficaz na sua deteção, devido ao seu custo elevado não constitui uma mais-valia e outras metodologias serão mais apropriadas (Zuffardi et al, 2011). Em contrapartida, nas gestações com malformações ecográficas aquela tecnologia tem-se revelado vantajosa. Num estudo publicado por Tyreman et al (2009) foram avaliados, por aCGH, 106 fetos com malformações ecográficas e cariótipo normal; em 10% dos casos foram identificadas alterações provavelmente patogénicas.

Uma das limitações do aCGH reside na sua incapacidade para detetar alterações quando não existe ganho ou perda de material. Todos os rearranjos equilibrados, particularmente as translocações Robertsonianas em que pode existir o risco de dissomia

uniparental, não são detetados. Igualmente, translocações ou inserções *de novo* em que pode ocorrer a disrupção de genes, provocando alterações fenotípicas, não serão detetadas pelo aCGH (Shaffer, 2011). Em contrapartida, microrrearranjos, como deleções ou duplicações, que possam ocorrer nos pontos de quebra de translocações aparentemente equilibradas e que são responsáveis por manifestações no fenótipo, serão detetadas por esta metodologia. Uma vez que os pontos de quebra não são, normalmente, recorrentes estas plataformas apresentam-se como uma ferramenta muito útil na sua identificação (Zuffardi et al, 2011).

Situação semelhante poderia ser aplicada aos cromossomas marcadores (Zuffardi et al, 2011). Contudo, está bem documentado na literatura a limitação que esta metodologia apresenta na deteção de mosaicismo de baixa expressão, categoria na qual se inclui grande parte dos cromossomas marcadores (Shaffer, 2011). É de notar também que no que se refere às triploidias o aCGH apresenta, igualmente, algumas limitações (Zuffardi et al, 2011).

É expectável que o aCGH possa, efetivamente, atuar como substituto do cariótipo num futuro próximo, sobretudo nas gestações com malformações ecográficas (Zuffardi et al, 2011). No entanto a visualização dos cromossomas parece ser, ainda, indispensável ao complemento do diagnóstico, para um apropriado aconselhamento genético dos progenitores (Zuffardi *in* Bui et al, 2011).

Nos últimos dois anos tem-se vindo a desenvolver uma nova metodologia que promete revolucionar os testes genéticos: o *exome sequencing*. Esta técnica permite capturar, sequenciar e analisar as regiões codificantes que representam, apenas, 1% do genoma (Topper et al, 2011).

Apesar de extremamente importante na capacidade de identificar mutações no(s) gene(s) responsáveis por determinada doença, é necessário considerar que o conhecimento acerca da função desse mesmo gene pode ser reduzido ou mesmo inexistente, diminuído significativamente o impacto dessa descoberta no prognóstico, prevenção ou tratamento. Adicionalmente, a procura de uma mutação causal desencadeará, involuntariamente, a identificação de outras, não relacionadas com a condição que se investiga, mas de significado clínico para o indivíduo assim como para os seus familiares (Sijmons et al, 2011).

A descoberta da predisposição genética para determinadas doenças, umas com tratamento disponível e outras não, levanta sérios problemas éticos, principalmente no âmbito do DPN. A escolha acerca do conhecimento de fatores de risco deverá pertencer ao próprio indivíduo e não, precocemente, aos seus progenitores. Será importante considerar ainda que, à semelhança do que se verifica no aCGH, centenas de CNVs de risco clínico desconhecido poderão ser identificadas num único teste (Sijmons et al, 2011).

A realização de um teste de diagnóstico pressupõe que as vantagens a retirar da sua realização deverão superar as desvantagens. Antes da realização de um teste genético deverão ser claramente explicadas aos progenitores as vantagens, desvantagens e limitações de determinada técnica, de maneira a que aqueles possam decidir com conhecimento e autonomamente. O desconhecimento acerca das limitações e consequências de determinada estratégia poderão gerar desconfiança, com responsabilização dos profissionais de saúde, comprometendo o programa de rastreio/ diagnóstico.

Apesar da evolução na citogenética tender para abordagens moleculares em substituição do microscópio, tal não significa o abandono do estudo convencional. Estas novas técnicas apresentam, atualmente, a limitação de não permitirem identificar alterações equilibradas pelo que, alguns rearranjos, continuam a ser identificados, apenas, pela análise dos cromossomas. O estudo do cariótipo continuará a ser, em muitas situações, o método mais simples e vantajoso, atendendo à relação custo/ benefício, para observar todo o genoma.

**CAPÍTULO 7**  
**BIBLIOGRAFIA**

Abbott Molecular Inc. - **AneuVysion Multicolour DNA Probe Kit: Laboratory Procedure for Uncultured Amniotic Fluid (3-stage Protocol)** [Em linha]. EUA [Consult. 6 Setembro.2011]. Disponível em WWW:URL:< <http://aneuvysion.com/lab/resources.html>>.

Abbott Molecular Inc. – **AneuVysion Multicolour DNA Probe Kit: Vysis CEP18/X/Y-alpha satellite/ LSI 13/21** [Em linha]. EUA [Consult. 6 Setembro.2011]. Disponível em WWW: URL:< [http://www.aneuvysion.com/static/cms\\_workspace/pdf/AneuVysion-PI-30-608368R1.pdf](http://www.aneuvysion.com/static/cms_workspace/pdf/AneuVysion-PI-30-608368R1.pdf)>.

Bangs C.D., Donlon T.A - Metaphase Chromosome Preparation from Cultured Peripheral Blood Cells. In **Current Protocols in Human Genetics**. EUA: Dracopoli N.C., Haines J.L., Korf B.R., Moir D.T., Morton C.C., Seidman C.E., Seidman J.G., Smith D.R. (eds) – John Wiley & Sons Inc., 2005. DOI: 10.1002/0471142905. Unit 4.1.

Biorede –**Cariótipo - Biologia Molecular – Estrutura Molecular – Cromossoma** [Em linha]. Aveiro [Consult 7 Abril 2012]. Disponível em WWW: URL:< <http://www.biorede.pt/page.asp?id=276>>.

Boormans E.M.A., Birnie E., Oepkes D., P. Boekkooi P.F., Bonsel G.J., van Lith J.M.M. - Individualized choice in prenatal diagnosis: the impact of karyotyping and standalone rapid aneuploidy detection on quality of life – **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2585. 30 (2010a) 928-936.

Boormans E.M.A, Birnie E., Knecht A.C, G. Schuring-Blom H., Bonsel G.J. van Lith J. M.M. - Aiming at multidisciplinary consensus: what should be detected in prenatal diagnosis? - **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2609. 30 (2010b) 1049–1056.

Boyle T., Griffin D. – The cytogenetics of pregnancy. In **Human Cytogenetics: constitutional analysis**. Oxford. Rooney DE (ed) – Oxford University Press, 2001. ISBN 0-19-963839-X. Cap3, p.55-98.

Bui T.-H. *in* Bui T.-H., Vetro A., Zuffardi O., Shaffer L. – Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post array CGH era? – **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2722. 31 (2011) 235-243.

Caine A., Maltby A.E., Parkin C.A., Waters J.J, Crolla J.A., UK Association of Clinical Cytogenetics – Prenatal detection of Down’s syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18 and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment – **The Lancet**. DOI: 10.1016/ 50140-6736(05)66790-6. 366 (2005) 123-128.

Carol’s Classroom – **Chromosome Abnormalities: Autosomes and Sex Chromosomes – Biology 442-Human Genetics** [Em linha]. EUA [Consult. 15 Abril 2012]. Disponível em WWW: URL:< [http://carolguze.com/text/442-5-chromosome\\_abnormalities.shtml](http://carolguze.com/text/442-5-chromosome_abnormalities.shtml)>.

Chiu R.W.K., Lo Y.M.D. - Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age - **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**. DOI: 10.1016/j.siny.2010.10.003. 16 (2011) 88-93.

Comas C., Echevarria M., Carrera M., Serra B. – Rapid aneuploidy testing versus traditional karyotyping in amniocentesis for certain referral indication – **Journal of Maternal Fetal & Neonatal Medicine**. DOI: 10.3109/14767050903334893. 23(9) (2010) 949-955.

Cross I., Wolstenholme J. – An introduction to human chromosomes and their analysis. In **Human Cytogenetics: constitutional analysis**. Oxford: Rooney DE (ed) – Oxford University Press, 2001. ISBN 0-19-963839-X. Cap3, p.55-98.

Diário da República, 1º série – Nº21 - **Portaria 132/2009, Anexo III**, de 30 de Janeiro.

Ehrich M., Deciu C., Zwiefelhofer T. et al. – Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting – **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. DOI: 10.1016/j.ajog.2010.12.060. 204(205) (2011) e1-11.

Faas B.H.W., Cirigliano V., Bui T.H. – Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidias – **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**. PMID: 21316319. 16 (2011) 81-87.

Gardner RJM, Sutherland GR – **Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling**. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 2004. ISBN 0-19-514960-2. Cap.1-3, p.1-55, Cap.22-25, p.236-432.

Gekas J., van den Berg D.-G., Durand A., Maud Valle M., Wildschut H. I. J., Bujold E., Forest J.-C., Rousseau F., Reinharz D. - Rapid testing versus karyotyping in Down's syndrome screening: cost-effectiveness and detection of clinically significant chromosome abnormalities - **European Journal of Human Genetics**. DOI: 10.1038/ejhg.2010.138. 19 (2011) 3-9.

Genetics Home Reference – **Handbook – Cells and DNA: What is a chromosome?** [Em linha]. Bethesda [Consult. 3 Abril 2012]. Disponível em WWW:

URL:< <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/chromosome>>.

Gerdes T., Kirchoff M., Lind A.-L., Larsen G. V. and Kjaergaard S. - Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis - experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y – **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2137. 28 (2008) 1119-1125.

Grimshaw G.M., Szczepura A. Hultén M., MacDonald F., Nevin N.C., Sutton F., Dhanja S.1 - Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities - **Health Technology Assessment**. ISSN 1366-5278. 7(10) (2003).

Hahn S., Lapaire O., Tercanli S., Kolla V., Hösli I - Determination of fetal chromosome aberrations from fetal DNA in maternal blood: has the challenge finally been met? - **Expert Reviews in Molecular Medicine** - DOI:10.1017/S1462399411001852. 13(e16) (2011) 1-14.

Hall S., Bobrow M., Marteau T.M. - Psychological consequences for parents of false negative results on prenatal screening for Down's syndrome: retrospective interview study – **British Medical Journal (clinical research, ed.)**. DOI: 10.1136/bmj.320.7232.407. 320(7232) (2000) 407-412.

Hastings R., Howell R., Bricarelli F. D., Kristoffersson U., Cavani S. - General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics - **E.C.A. - European Cytogeneticists Association Newsletter**. ISSN 2074-0786. 29 (2012) 16.

Hills A., Donaghue C., Waters J., Waters K., Sullivan C., Kulkarni A., Docherty Z., Mann K. and Ogilvie C. M. - QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region - **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2503. 30 (2010) 509-517.

Hsu L.Y.F., Benn P.A. – Revised Guidelines for the Diagnosis of Mosaicism in Amniocytes – **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0223(199911)19:11<1081::AID-PD682>3.0.CO;2-Z. 19 (1999) 1081-1090.

Jong A, Dondorp W.J., Timmermans D.R.M., van Lith J.M.M., de Wert G.M.W.R. - Rapid aneuploidy detection or karyotyping? Ethical reflection - **European Journal of Human Genetics**. DOI: 10.1038/ejhg.2011.82. 19 (2011) 1020-1025.

Kooper A.J.A., Faas B.H.W., Kater-Baats E., Feuth T., Jasper C. J. A. Janssen J.C.J.A., van der Burgt I., Lotgering F.K., van Kessel A.G. and Smits A.P.T. – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells - **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2111. 28 (2008) 1004-1010.

Lawce H.J., Brown M.G. – Cytogenetics: an overview. In **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**. Filadélfia: Barch M.J., Knutsen L., Spurbeck J. (eds.) – Lippincot Raven Publishers, 1997. ISBN-13: 978-0-397-51651-3. Cap 2, p. 29-50.

Liehr T, Mrasek K, Kosyakova N, Ogilvie CM, Vermeesch J, Trifonov V, Rubtsov N - Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans; are there B chromosomes hidden among them. **Molecular Cytogenetics**. DOI:10.1186/1755-8166-1-12. 1(12) (2008) 1-7.

Moore D.D. e Dowhan D. – Preparation and Analysis of DNA. In **Current Protocols in Molecular Biology**. EUA: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.) - Ringbou Edition. John Wiley & Sons Inc., 2002. ISBN 047150338X. Unit 2.0.1-2.0.3.

MRC-Holland – **Interpretation of MLPA results. MLPA procedure – Result interpretation** [Em linha]. Holanda [Consult. 15 Maio.2011]. Disponível em WWW:  
URL:<<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=w12zCji\rCGANQgZPuTixrMkcAVITxSUI1uxaJsuta9GGaLIE8p67Q>>.

MRC-Holland – **MLPA, an introduction. MLPA technology** [Em linha]. Holanda [Consult. 15 Maio.2011]. Disponível em WWW:  
URL:<<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVI/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGloqYwxaGF9Y>>.

MRC-Holland – **SALSA MLPA KIT P095 Aneuploidy** [Em linha]. Holanda [Consult. 15 Maio.2011]. Disponível em WWW:  
URL:<<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDFE\t9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjussl&ProductOID=b4E4JKHdVds>>.

Nicolaidis K.H. - Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks – **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2637. 31 (2011) 7-15.

Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F. – **Thompson & Thompson Genetics in Medicine**. 6<sup>th</sup> ed. Filadélfia: Saunders, 2004. ISBN 0-7216-0244-4. Cap 9, pp135-155.

Roche Applied Science – **High Pure PCR Template Preparation Kit** [Em linha]. EUA [Consult 2 Janeiro 2012]. Disponível em WWW:  
URL:<[https://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/napi\\_man/pdf/chapter%202/page%2021-32.pdf](https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter%202/page%2021-32.pdf)>.

Salomon L.J., Alfirovic Z., Berghella V., Bilardo C., Hernandez-Andrade E., Johnsen S.L, Kalache K., Leung K.-Y, Malinger G., Munoz H., Prefumo F., Toi A., Lee W. - .Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan - **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**. DOI: 10.1002/uog.8831. 37 (2011) 116-126.

Shaffer L.G., Bui T.-H. – Molecular Cytogenetic and Rapid Aneuploidy Detection Methods in Prenatal Diagnosis – **American Journal of Medical Genetics Part C**. DOI: 10.1002/ajmg.c. 145(C) (2007) 87-98.

Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. – **ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetics Nomenclature**. Basileia: S. Karger, 2009. ISBN 978-3-8055-8985-7.

Shaffer L.G in Bui T.-H., Vetro A., Zuffardi O., Shaffer L. – Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post array CGH era? – **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2722. 31 (2011) 235-243.

Sijmons R.H., Van Langen I.M., Sijmons J.G. - A Clinical Perspective on Ethical Issues in Genetic Testing . **Accountability in Research** - DOI: 10.1080/08989621.2011.575033. 18 (2011) 148-162.

Smeets, D.F.C.M. – Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. **Clinical Biochemistry** – PMID: 15183291. 37 (2004) 439-446.

Strachan T, Read A – **Human Molecular Genetics**. 4<sup>th</sup> ed. Nova Iorque: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2011. ISBN 978-0-815-34149-9. Cap.2, p.29-59.



- Teixeira R., Carreira I. – Meiose e Aneuploidia. In **Biologia Celular e Molecular**. Lisboa: Azevedo C. (ed).- LIDEL - Edições Técnicas, 2005. ISBN: 978-972-757-354-7. Cap.24, p.397-430.
- Topper S, Ober C, Das S - Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. – **Clinical Genetics**. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01720.x. 80 (2011) 117-126.
- Trask B.J. – Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting – **Nature Reviews Genetics**. DOI: 10.1038/nrg905. 3 (2002) 769-778.
- Tyreman M., Abbott K.M., Willatt L.R., Nash R., Lees C., Whittaker J., Simonic I. – High resolution array analysis: diagnosing pregnancies with abnormal ultrasound findings – **Journal of Medical Genetics**. DOI: 10.1136/jmg.2008.065482. 46 (2009) 531-541.
- Van Opstal D., Boter M., Jong D., van den Berg C., Brüggewirth H.T, Wildschut H.I.J, Klein A., Galjaard R.-J. H. - Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples – **European Journal of Human Genetics**. DOI:10.1038/ejhg.2008.161. 17 (2009) 112-121.
- Wieacker P., Steinhard J – The prenatal diagnosis of genetic diseases – **Deutsches Ärzteblatt international**. DOI: 10.3238/arztebl.2010.0857. 107(48) (2010) 857-862.
- Wilson R.D., Langlois S., Johnson J.A.; Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada - Mid-trimester amniocentesis fetal loss rate – **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**. PMID: 17623573. 29(7) (2007) 586-95.
- Winsor E.J.T, Silver M.P., Theve R., Wright M., Ward B.E. – Maternal Cell Contamination in Uncultured Amniotic Fluid – **Prenatal Diagnosis**. PMID: 8821852. 16 (1996) 49-54.
- Wolstenholme J., Rooney D.E. – Cytogenetics in the 1970s and 1980s – **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2478. 30 (2010) 605-607.
- World Health Organization, Department of Mental Health and Substance Dependence, Noncommunicable Diseases and Mental Health – **Investing in mental health**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2003. ISBN 92 4 156257 9.
- Zuffardi O., Vetro A., Brady P., Vermeesch J. – Array technology in prenatal diagnosis - **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**. DOI:10.1016/j.siny.2010.12.001. 16 (2011) 94-98.
- Zuffardi O *in* Bui T.-H., Vetro A., Zuffardi O., Shaffer L. – Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post array CGH era? – **Prenatal Diagnosis**. DOI: 10.1002/pd.2722. 31 (2011) 235-243.

