

**HÉLDER MANUEL
LOPES GOMES**

**aCGH NO DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL EM FETOS
COM ANOMALIAS ECOGRÁFICAS**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2013

**HÉLDER MANUEL
LOPES GOMES**

**aCGH NO DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL DE FETOS
COM ANOMALIAS ECOGRÁFICAS**

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 Doutora Isabel Marques Carreira, professora associada com agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e da Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, professora associada com agregação, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

O júri

presidente

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Joana Barbosa de Melo

Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Professora Doutora Isabel Maria Marques Carreira

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

Agradecimentos

Foi com muita dedicação e trabalho que concluo a última etapa do meu mestrado, a qual não seria possível sem a colaboração e boa vontade daqueles a que agora me refiro. A todos os meus sinceros agradecimentos.

À minha Família, pelo apoio, incentivo e carinho que me deram durante esta importante etapa da minha vida.

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, um agradecimento muito especial, por me ter aceitado como seu orientado, pela confiança que depositou em mim e pelos muitos e valiosos conhecimentos transmitidos, assim como por toda a preocupação, disponibilidade e ajuda que sempre manifestou para comigo.

À Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos, por me ter aceitado como seu orientando, por todo o apoio prestado, interesse, disponibilidade e preocupação que manifestou para comigo.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, por me ter aceitado numa fase posterior do meu trabalho, como seu orientando, por todo o apoio prestado, disponibilidade e preocupação que manifestou para comigo.

À Susana Ferreira e ao Luís Miguel Pires, por todos os conhecimentos transmitidos e sobretudo pelo grande apoio, ajuda, simpatia e disponibilidade, que sempre demonstraram para comigo ao longo da minha dissertação de mestrado.

À restante equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela gentileza, boa disposição e disponibilidade em ajudar a qualquer altura do dia e pelas brincadeiras que me fizeram sentir realmente bem durante a realização da minha dissertação de mestrado.

Por último, a todas a pessoas que entraram na minha vida por acaso, mas não foi por acaso que elas permanecem e que eu posso considerar verdadeiros amigos. A todos eles, agradeço a amizade, o apoio prestado e todos os bons momentos passados ao longo da minha formação académica.

Palavras-chave

Diagnóstico pré-natal, aCGH, variações no número de cópias, anomalias ecográficas, fenótipo.

Resumo

Objetivos. A hibridização genómica comparativa baseada na tecnologia dos *microarrays* (aCGH) é uma nova técnica, que tem sido apontada como alternativa à citogenética convencional na rotina do diagnóstico pré-natal, principalmente nas gestações com anomalias ecográficas. Assim, este estudo pretende avaliar o impacto do aCGH na rotina do DPN em fetos com anomalias ecográficas. Também visa capacitar quais as estratégias que permitem uma redução nos resultados com significado clínico incerto ou desconhecido.

Métodos. O DNA fetal foi extraído a partir da cultura celular de líquido amniótico ou vilosidades coriônicas. As 22 amostras foram analisadas por aCGH de oligonucleótidos com 60K e a classificação das CNV's foi feita de acordo com a classificação adotada pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para análise e interpretação das CNV's no diagnóstico pós-natal. Por fim, de modo a reduzir os resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, foram adotadas 2 estratégias de seleção de CNV's.

Resultados. No total dos casos analisados, em 10,5% (2/19) foram detetadas CNV's patogénicas adicionais ao resultado fornecido pela citogenética convencional. Englobando apenas os casos com indicação de anomalias ecográficas e resultado citogenético normal, o aCGH detetou CNV's patogénicas em 5,9 % (1/17) dos casos. A percentagem inicial de casos com CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido foi de 31,6% (6/19), reduzida posteriormente para 15,8% (1/19) quando consideradas apenas as CNV's inferiores as 400 Kb que tivessem associadas às anomalias ecográficas encontradas, ou para 10,5% (12/19) quando consideradas apenas as CNV's com o mínimo de 8 sondas consecutivas alteradas.

Conclusão. Os resultados deste estudo demonstram que o aCGH pode ser uma ferramenta valiosa no DPN de casos com indicação de anomalias ecográficas, e na caracterização de rearranjos cromossómicos detetados por citogenética convencional. Será necessário, no entanto, definir padrões de análise e interpretação para a tecnologia de aCGH, pelo que mais estudos retrospectivos terão de ser realizados.

keywords

Prenatal diagnosis, aCGH, copy number variations, ultrasound anomalies, phenotype.

abstract

Objectives. The comparative genomic hybridization based on microarrays technology (aCGH) is a new technique, which has been identified as an alternative to conventional cytogenetic in routine prenatal diagnosis, mainly in pregnancies with ultrasound abnormalities. Therefore, this study aims to assess the impact of aCGH in routine prenatal diagnosis in fetus with malformations and to evaluate the strategies to enable a reduction in the results of uncertain clinical significance or unknown clinical significance.

Methods. The fetal DNA was extracted from cell culture of amniotic fluid or chorionic villi samples. The 22 samples were analyzed by aCGH oligonucleotide 60K and classification and interpretation of CNV's was made according to the classification adopted in postnatal diagnosis by the Laboratory of Cytogenetic and Genomic Faculty of Medicine, University of Coimbra. Then, two strategies were adopted for selection of CNV's described in the literature in order to reduce the results of uncertain or unknown clinical significance.

Results. In all cases analyzed, 10.5% (2/19) were classified as pathogenic CNV's, not detectable by conventional cytogenetic. Incorporating only cases with ultrasound abnormalities and normal cytogenetic result the aCGH detected CNV's pathogenic in 5.9% (1/17) of the cases. The initial percentage of cases with CNV's of uncertain or unknown clinical significance was 31.6% (6/19), subsequently reduced to 15.8%, when considered only the CNV's with sizes lower than 400 Kb that had been associated with sonographic abnormalities found, or to 10.5% when only considered the CNV's at least with 8 consecutive probes changed.

Conclusion. Altogether, the results of this study demonstrate that aCGH can be a valuable tool in prenatal diagnosis in the cases with ultrasound abnormalities indication, and in the characterization of chromosomal rearrangements detected by conventional cytogenetic. However, is necessary the elaboration of universal guidelines for analysis patterns and interpretation of aCGH results, whereby more retrospective studies will be performed.

INDICE

Agradecimentos	V
Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de figuras	X
Lista de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas	XIV
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento histórico	3
1.2. Diagnóstico pré-natal	6
1.2.1. Amniocentese.....	7
1.2.2. Biopsia de vilosidades coriônicas	7
1.2.3. Cordocentese	8
1.3. Citogenética convencional	8
1.3.1. Bandas GTG.....	9
1.3.2. Bandas C	9
1.3.3. Bandas NOR	10
1.4. Array-based comparative genomic hybridization	11
1.4.1. Aplicação do <i>aCGH</i>	11
1.4.2. Classificação das CNV's	14
1.4.3. Vantagens e desvantagens do <i>aCGH</i> face à citogenética convencional	15
1.5. <i>aCGH</i> no diagnóstico pré-natal	17
1.5.1. Tipo e plataformas de <i>microarrays</i>	18
1.5.2. Estudos de <i>microarrays</i> no DPN.....	21
1.5.3. Recomendações na utilização do <i>aCGH</i>	29
1.5.4. Análise e interpretação dos resultados do <i>aCGH</i>	30
1.5.4.1. CNV's benignas	31
1.5.4.2. CNV's patogénicas.....	32

1.5.4.3. CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido	32
1.5.6. Aconselhamento genético	33
1.5.7. Comunicação entre o laboratório e o clínico.....	34
2. Objetivos do trabalho	36
3. Materiais e Métodos	38
3.1. Material biológico	39
3.2. Cultura celular	40
3.2.1. Cultura de amniócitos	40
3.2.2. Cultura de vilosidades coriônicas.....	41
3.3. Extração e quantificação do DNA.....	41
3.4. <i>Array-based comparative genomic hybridization</i>	42
3.4.1. Marcação, hibridização e <i>scanning</i>	43
3.4.1.1. Marcação do DNA genómico com fluorocromos	43
3.4.1.2. Hibridização	43
3.4.1.3. <i>Scanning</i> e processamento das imagens obtidas	44
3.4.1.1. Controlo de qualidade	45
3.5. Análise e interpretação dos resultados do <i>aCGH</i>	46
3.6. Validação dos resultados	47
4. Resultados e discussão.....	48
4.1. Descrição dos casos com um resultado patogénico.....	58
4.2. Descrição dos casos com um resultado de significado clínico incerto ou desconhecido	68
4.3. Redução dos resultados de significado clínico incerto ou desconhecido	79
5. Conclusão	82
6. Bibliografia.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cariograma humano normal com cromossomas de alta resolução de um indivíduo do sexo masculino, 46, XY, obtido com bandagem GTG (Imagem cedida pelo LCG-FMUC). 10
- Figura 2.** Diagrama representativo do processo de *aCGH*. O DNA em estudo e o DNA controlo são marcados diferencialmente com Cy5 e Cy3, respetivamente. Estas duas amostras são hibridizadas competitivamente numa lâmina de *microarray*, contendo as sondas de DNA. Após a hibridização, a lâmina de *microarray* foi submetida a um varrimento onde ocorre a medição das intensidades de fluorescência para cada sonda. De seguida procede-se a análise das CNV's através de um *software* que avalia e quantifica a intensidade de fluorescência emitida. 12
- Figura 3.** *Design em loop*. Representação esquemática de três amostras em estudo com uma amostra controlo normal e um *design em loop* no qual as três amostras em estudo são comparadas entre si. Neste último, as amostras em estudo são hibridizadas duas-a-duas pelo que a mesma amostra é analisada duas vezes em três *microarrays*, permitindo a confirmação dos resultados obtidos (Adaptado de Allemeersch *et al.*, 2009). 13
- Figura 4.** Imagens de *microarrays* exibindo artefactos de hibridização e lavagem. Na imagem a e b, os artefactos resultam de grandes bolhas de ar, durante o processamento das amostras para a co-hibridação. É visível uma hibridização menor nas regiões mais escuras, resultantes da bolha de ar. Na imagem c estão presentes os artefactos típicos de lavagem (Adaptado de Vermeesch *et al.*, 2012). 45
- Figura 5.** Cariótipo 46,XX obtido através da técnica de bandagem GTG correspondente ao feto com restrição de crescimento intra-uterino (Imagem cedida pelo LCG-FMUC). 58

Figura 6. A - Perfil de *aCGH* para o cromossoma 10, representando a deleção de 4.3 Mb em 10q26.3; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC)..... 59

Figura 7. A - Perfil de *aCGH* para o cromossoma 11, representando a duplicação de 7.6 Mb em 11p15.5-p15.4; B - Constituição génica do segmento envolvido na duplicação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC). 60

Figura 8. FISH em metafases com a t(10;11). A - Sondas com referência M10 (Totelvysion – Vysis, Abbott Molecular): a sonda verde marca o *locus* 10PTEL006, do cromossoma 10p15.3, a sonda vermelha corresponde ao *locus* D10S2290 do cromossoma 10q26.3, a sonda amarela marca o *locus* D15S936 do cromossoma 15q26.3 e a sonda aqua hibridiza na região q24.1 do cromossoma 15; B - Sondas com referência M11 (Totelvysion – Vysis, Abbott Molecular): a sonda verde marca o *locus* D11S2071, do cromossoma 11p15.5, a sonda vermelha marca ao *locus* D11S1037 do cromossoma 11q25, a sonda amarela corresponde ao *locus* D18S552 do cromossoma 18q11.32 e a sonda aqua marca o centrómero do cromossoma 18 (Imagem cedida pelo LCG-FMUC)..... 61

Figura 9. A - Translocação recíproca *de novo* aparentemente equilibrada, presente no feto do caso 20 detetada através da técnica de bandagem GTG, que envolve o braço curto do cromossoma 6 e o braço longo do cromossoma 7 com pontos de quebra em 6(p25) e 7(q21.1), respetivamente. B - resultado da técnica FISH que confirma a integridade do rearranjo: a sonda verde marca o *locus* 6PTEL, a sonda vermelha corresponde ao *locus* VIJyRM2158 e a sonda controlo amarela marca o *locus* VIJyRM2002 do cromossoma 13q (Imagem cedida pelo LCG-FMUC). 63

Figura 10. A - Perfil de *aCGH* para o cromossoma 6, representando a deleção de 2.0 Mb em 6p25.2-p25.1; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC). 64

Figura 11. A - Perfil de <i>a</i> CGH para o cromossoma 6, representando a deleção de 1.99 Mb em 6q13-q14.1; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).	66
Figura 12. A - Perfil de <i>a</i> CGH para o cromossoma 15, representando a deleção de 0.53 Mb em 15q26.2-q26.3; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).	67
Figura 13. A - Perfil de <i>a</i> CGH para o cromossoma 18, representando a amplificação de 0.38 Mb em 18q21.31; B - Constituição génica do segmento envolvido na amplificação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).	69
Figura 14. A - Perfil de <i>a</i> CGH para o cromossoma 10, representando a duplicação de 0.52 Mb em 10p15.3; B - Constituição génica do segmento envolvido na duplicação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).	71
Figura 15. A - Perfil de <i>a</i> CGH para o cromossoma 6, representando a deleção de 0.28 Mb em 6q27; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).	73
Figura 16. A - Perfil de <i>a</i> CGH para o cromossoma 18, representando a duplicação de 0.16 Mb em 18q23; B - Constituição génica do segmento envolvido na duplicação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).	75
Figura 17. A - Perfil de <i>a</i> CGH para o cromossoma 4, representando a deleção de 0.68 Mb em 4q28.31; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).	76
Figura 18. A - Perfil de <i>a</i> CGH para o cromossoma 19, representando a duplicação de 2.2 Kb em 19q13.43; B - Constituição génica do segmento envolvido na duplicação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Capacidade de deteção do <i>a</i> CGH e da citogenética convencional nos diferentes tipos de anomalias cromossómicas.....	16
Tabela 2. Taxa de deteção de CNV's clinicamente significativas não detetáveis por citogenética convencional para todo o tipo de indicações clínicas e por indicação de anomalias ecográficas.....	28
Tabela 3. Sistema envolvido em cada uma das anomalias fetais observadas nas ecografias relativas às 22 amostras de DPN.	39
Tabela 4. Sistema de classificação das CNV's obtidas por <i>a</i> CGH adoptado pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para o diagnóstico pós-natal.	47
Tabela 5. 3 Casos que apresentaram resultados inconclusivos através da análise por <i>a</i> CGH.....	49
Tabela 6. 11 Casos que apresentaram resultados normais através da análise por <i>a</i> CGH...	51
Tabela 7. 2 Casos que apresentaram desequilíbrios cromossómicos associados a um fenótipo patogénico através do <i>a</i> CGH.....	56
Tabela 8. 6 Casos que apresentaram desequilíbrios genómicos com significado clínico incerto ou desconhecido para o fenótipo.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH - *array Comparative Genomic Hybridization*

BAC - *Bacterial Artificial Chromosomes*

CGH - *Comparative Genomic Hybridization*

CNV - *Copy Number Variation*

Cy3 - Cianina 3

Cy5 - Cianina 5

DECIPHER - *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*

DGV - *Database of Genomic Variants*

DLRS - *Derivative Log Ratio Spread*

DO230 - Densidade ótica de 230 nm

DO260 - Densidade ótica de 260 nm

DO280 - Densidade ótica de 280 nm

DPN - Diagnóstico Pré-Natal

EUCARUCA - *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations*

FISH - *Fluorescent in situ hybridization*;

FMUC - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Free β -hCG - fração livre da gonadotrofina coriônica humana

Kb - Quilobase(s)

ISCA - *International Standard Cytogenomic Array*

LA - Líquido amniótico

LCG - Laboratório de Citogenética e Genómica (FMUC)

Log - Logaritmo

LR - *Log Ratio*

Mb - Megabase(s)

MLPA - *Multiplex Ligation Probe Amplification*

OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*

PAPP-A - Proteína-A do plasma associada à gravidez

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pb - pares de base

QF-PCR - *Quantitative Fluorescence-Polymerase Chain Reaction*

SD - Desvio padrão

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - *Single-nucleotide polymorphism*

TN > 99 - Translucência da nuca superior ao percentil 99

UV - Ultra-Violeta

VC - Vilosidades coriônicas

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O diagnóstico pré-natal (DPN) citogenético envolve a análise de cromossomas fetais obtidos através da cultura celular de amostras conseguidas através de exames invasivos, nomeadamente a amniocentese, a biópsia de vilosidades coriônicas e a cordocentese. A análise citogenética dos cromossomas fetais fornece uma visão de todo o genoma, suficiente para detetar aneuploidias e alterações estruturais superiores a 3-10 Mb. (Lichtenbelt et al., 2011). Porém, esta técnica não deteta deleções ou duplicações submicroscópicas que estão associadas a uma grande percentagem de fenótipos anormais, nomeadamente anomalias congénitas, autismo e défice cognitivo sindrómico ou não sindrómico (Breman et al., 2012; Evangelidou et al., 2013; Wapner et al., 2012).

Uma nova tecnologia que tem sido apontada como uma alternativa à citogenética convencional, na rotina do DPN é o *array-based comparative genomic hybridization* (aCGH). O aCGH foi desenvolvido para realizar um *screening* de elevada resolução do genoma humano, permitindo a identificação de variações no número de cópias, CNV's (do inglês *Copy Number Variation*), podendo estas serem inferiores a uma resolução de 100 Kb (Hillman et al., 2012; Vetro et al., 2012).

Nos últimos anos, o aCGH foi introduzido como teste de primeira linha na rotina clínica do diagnóstico pós-natal, permitindo um aumento na taxa de deteção de anomalias cromossómicas. Contudo, a sua prática no DPN é dependente da capacidade de interpretação dos resultados e dos custos-benefícios deste teste. Os resultados obtidos por aCGH que apresentam maior complexidade ao nível da interpretação são os de significado clínico incerto ou desconhecido, nos quais, através da análise do genótipo não se consegue definir a patogenicidade do fenótipo resultante (Clancy, 2008; Ahn et al., 2013; Vermeesch et al., 2012).

A citogenética convencional identifica rearranjos cromossómicos entre 2-7% de todas as gestações submetidas à amniocentese. No entanto, quando se trata de fetos com anomalias ecográficas a percentagem de casos com cariótipo anormal é de 9-35%, dependendo se apresentam uma determinada anomalia ou múltiplas anomalias. De facto é de esperar que mais rearranjos cromossómicos sejam detetados por aCGH, nos casos em que os fetos apresentam anomalias ecográficas, devido ao seu maior poder de resolução (D'Amours et

al., 2012; Vetro et al., 2012).

Vários estudos têm sido realizados de forma a esclarecer o impacto que o *aCGH* pode ter no DPN. Apesar das diferentes conclusões quanto à sua utilização, tem sido descrito para todas as indicações clínicas, uma taxa de deteção adicional de 1-3% de alterações cromossómicas patogénicas face à citogenética convencional. Na presença de anomalias ecográficas, a percentagem de alterações cromossómicas patogénicas, não detetáveis por citogenética convencional tem sido reportada com sendo de 6-8%. Devido a este facto, tem-se verificado um aumento crescente da utilização do *aCGH* no DPN, principalmente em fetos com anomalias ecográficas (Vetro et al., 2012). Porém, a sua aplicação como teste de primeira linha neste tipo de diagnóstico ainda não é consensual, devido às limitações da técnica. Assim, mais estudos serão necessários para perceber a aplicabilidade do *aCGH* no DPN para a deteção de desequilíbrios cromossómicos, principalmente em fetos com anomalias ecográficas (Fiorentino et al., 2011; Savage et al., 2011; Shaffer et al., 2012a).

1.1. Enquadramento Histórico

Foi no fim do século XIX que apareceram as primeiras noções sobre cromossomas, com a realização dos primeiros estudos debruçados na mitose. Em 1866, Haeckel propôs que o núcleo celular era o principal responsável pela divisão celular (Guerra, 2000). No entanto, o primeiro cientista a descrever o processo de divisão celular foi Anton Schneider, em 1873. Nos anos seguintes, outros investigadores deram contribuições importantes, como no caso de Flemming, autor do termo mitose e Roux. Flemming, considerado o fundador da citogenética foi o primeiro a observar e a descrever sistematicamente os comportamentos dos cromossomas, mostrando que se dividiam longitudinalmente durante a mitose. Por sua vez, Roux ao analisar os cromossomas meióticos, verificou que estavam relacionados com o mecanismo de hereditariedade (Amabis e Martho, 1998; Guerra 2000). Posteriormente, vários trabalhos foram publicados referentes ao número de cromossomas presentes na espécie humana. Um dos trabalhos com maior impacto foi o realizado por Painter em 1923, onde descreveu que o número de cromossomas no ser humano seria de 46 ou 48, acabando por concluir erradamente a favor dos 48 cromossomas. Só em 1956,

Tijo e Levan identificaram verdadeiramente que o cariótipo humano era composto por 46 cromossomas (Thompson et al., 1993).

No final da década de 1950, começaram a aparecer técnicas para o estudo científico dos cromossomas humanos, onde se tentava perceber a função dos cromossomas no desenvolvimento sexual, bem como o impacto das suas anomalias no desenvolvimento físico e mental anormal. O aparecimento destas técnicas permitiu a Lejeune e colaboradores (1959), o estudo dos cromossomas a partir de fibroblastos de um paciente com síndrome de Down, no qual descobriram a existência de um cromossoma 21 extra. Esta foi a primeira vez que foi reportada uma trissomia (Thompson et al., 1993).

Devido às suas potencialidades, a citogenética convencional foi integrando vários ramos da biologia, da bioquímica e da medicina. A sua introdução deu-se pela primeira vez no DPN em 1966, quando Steel e Breg demonstraram que a constituição cromossómica podia ser estudada através da cultura de células de líquido amniótico (LA). Um ano depois, Jacobson e Barter reportaram o primeiro DPN com uma anomalia cromossómica. Nos anos seguintes, várias anomalias cromossómicas foram identificadas e novos métodos de colheita, como a biópsia de vilosidades coriónicas e a cordocentese, foram introduzidos no DPN (Zuffardi et al., 2010). Mas foi no início da década de 1970, com o aparecimento das técnicas de bandagem cromossómica, que se tornou possível identificar especificamente cada um dos cromossomas, bem como os seus rearranjos estruturais. Esta metodologia veio revolucionar a citogenética convencional, bem como o DPN, apesar do seu poder de resolução (Hillman et al., 2012).

Em 1980, surgiu uma técnica de citogenética molecular designada por *Fluorescence in situ hybridization* (FISH), que veio permitir a identificação de alterações cromossómicas submicroscópicas. Tal como a citogenética convencional, a FISH também identifica alterações cromossómicas numéricas e estruturais, mas possui as vantagens de poder oferecer um resultado num período de tempo mais reduzido e de não serem necessárias células em metafase. Contudo, utilizando a tecnologia FISH, apenas um número limitado de *loci* no genoma são analisados, recorrendo a sondas específicas para essas regiões (Bishop, 2010; Machado et al., 2012). No entanto, no DPN, a FISH passou a ter um papel importantíssimo na deteção das aneuploidias mais comuns (13,18,21,X e Y) e das síndromes de microduplicação/microdeleção conhecidas, bem como na confirmação dos resultados obtidos por citogenética convencional (Hillman *et al.*, 2012). Em 2003, uma

outra tecnologia molecular baseada na PCR, o *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) tornou-se disponível para a detecção das aneuploidias no DPN, oferecendo um resultado em 1-2 dias e com um custo mais reduzido do que a FISH. Através desta técnica, também é possível detetar microduplicações e microdeleções nas regiões cobertas pelas sondas, mas tal como a FISH, o MPLA é uma técnica direcionada, analisando uma ínfima parte do genoma humano em simultâneo (Boormans et al., 2011). Apesar do poder de resolução obtido pelas técnicas de FISH e MLPA terem oferecido um enorme contributo na detecção de anomalias cromossómicas inferiores a 3 Mb, a citogenética convencional continua até à data, a ser o principal teste de DPN, devido ao facto de permitir uma análise de todo o genoma em simultâneo (Lichtenbelt et al., 2011; Hillman et al., 2012).

No fim do século XX, com o avanço das tecnologias moleculares surge a hibridização genómica comparativa (CGH, do inglês *Comparative Genomic Hybridization*) como uma técnica que permitia um *screening* de todo o genoma para a detecção de CNV's. Esta foi primeiramente desenvolvida para a detecção de CNV's em tumores sólidos, onde eram usadas duas amostras genómicas, a amostra a analisar e a amostra controlo, marcadas com diferentes corantes fluorescentes e hibridizadas com os cromossomas em metafase. A intensidade de fluorescência emitida pelo DNA em estudo, comparada à emitida pelo DNA controlo permitia a identificação de CNV's. No entanto, tal como na citogenética convencional o poder de resolução do CGH era limitado, uma vez que eram utilizadas placas em metafase como suporte, não permitindo a detecção de CNV's inferiores a 5-10 Mb para a maioria das aplicações clínicas (Theisen, 2008).

Numa tentativa de ultrapassarem as limitações da CGH, Kallioniemi e colaboradores descreveram em 1992, uma nova técnica que combina os princípios da CGH com os *microarrays*. Este método denominado por *aCGH*, em vez de utilizar cromossomas em metafase utilizava um suporte físico com pequenos fragmentos de DNA como alvos de análise (Ostroverkhova et al., 2002). Através desta técnica, tornou-se possível uma análise com elevada resolução de todo o genoma em simultâneo, permitindo a detecção de desequilíbrios genómicos que não seriam detetáveis por citogenética convencional. Desde então vários laboratórios tentaram dominar esta tecnologia, mas só nos últimos anos é que o *aCGH* tem sido implementado com sucesso nas diferentes áreas da biologia. Tal evolução foi potenciada pela sequenciação do genoma humano e pela otimização das

plataformas de *microarrays* com a introdução e desenvolvimento dos sistemas de computação e robótica (Vermeesch et al., 2005; Vetro et al., 2012). Como consequência disto, em 2008 o *aCGH* passou a ser considerado o principal teste no diagnóstico pós-natal para a detecção de CNV's em pacientes com défice cognitivo e/ou anomalias congénitas múltiplas, o que permitiu um aumento significativo na detecção de desequilíbrios genómicos com impacto fenotípico (Ahn et al., 2013).

1.2. Diagnóstico pré-natal

O DPN é um processo de acompanhamento médico destinado ao feto durante a gravidez, que permite detetar determinadas anomalias congénitas, caso existam, antes do seu nascimento (Júnior, 2002). Neste processo, inicialmente procede-se a uma análise ecográfica e à medição dos níveis séricos maternos, que permitem calcular o risco de o feto possuir uma anomalia cromossómica. Estes dois exames não invasivos são denominados de rastreio combinado do primeiro trimestre, e realiza-se entre as 11 semanas e as 13 semanas de gestação (Wieacker e Steinhard, 2010). A partir da análise dos dados ecográficos é estimada com precisão a idade gestacional, medida a translucência da nuca e avaliados outros indicadores de uma cromossomopatia, como por exemplo a ausência dos ossos do nariz. No exame bioquímico são quantificados, entre outros marcadores séricos, a fração livre da gonadotrofina coriónica humana (*free* β -hCG) e a proteína-A do plasma associada à gravidez (PAPP-A), presentes no sangue materno (Wieacker e Steinhard, 2010; Nicolaides, 2011). O rastreio combinado do primeiro trimestre é atualmente aceite como um método eficaz para o rastreio de aneuploidias, nomeadamente a síndrome de Down. No entanto, esta avaliação não permite ver se o feto tem realmente uma anomalia cromossómica, apenas permite saber o seu grau de risco. Seguidamente, se este for considerado significativo, aos progenitores é oferecida a opção de efetuar testes de DPN invasivos para a análise citogenética convencional ou outras técnicas moleculares. Estas devem ser realizadas após o aconselhamento genético dos progenitores, uma vez que os exames invasivos, como a amniocentese ou a biópsia de vilosidades coriónicas, necessários para a obtenção de material fetal, estão associados a um risco de aborto (Nicolaides e DeFigueiredo 2004; Nicolaides, 2011). Deste modo, o estudo das anomalias

cromossómicas só deve ser realizado em grupos com elevado risco de ter uma cromossomopatia, sendo estes as gestações com idade materna avançada, anomalias ecográficas, sinais ecográficos de alerta, progenitor portador de uma cromossomopatia, filho anterior com uma cromossomopatia e marcadores séricos maternos indicativos de uma anomalia cromossómica (Wieacker e Steinhard, 2010).

1.2.1. Amniocentese

A amniocentese é geralmente realizada entre as 14 e as 17 semanas de gestação com o auxílio ecográfico, e consiste na colheita de 1 ml de LA por semana de gestação, (Agnieszka, 2007). O risco de perda fetal situa-se nos 0,5%, o que torna este exame o mais fiável e utilizado para a obtenção de material fetal, requerido para a cultura celular necessária à citogenética convencional (Gardner e Sutherland, 2004). As células não cultivadas de LA podem ser utilizadas diretamente para análise das aneuploidias mais comuns, através da FISH ou MLPA (Junior, 2002; Wieacker e Steinhard, 2010).

1.2.2. Biopsia de Vilosidades Coriónicas

A biópsia do trofoblasto ou de vilosidades coriónicas (VC) é geralmente realizada entre as 11 e as 12 semanas de gestação e tem um risco de perda fetal ente 1,5-2% (Gardner e Sutherland, 2004). Esta consiste na recolha de 10-15 mg de vilosidades coriónicas que fazem parte da placenta em desenvolvimento. As VC depois de limpas e dissecadas podem ser utilizadas diretamente para técnicas moleculares de diagnóstico, ou após cultura, como no caso da citogenética convencional. No geral, o período de cultura celular necessário para a realização desta última técnica é de 7 a 10 dias (Nicolaidis e DeFigueiredo 2004; Agnieszka et al., 2007; Wieacker e Steinhard, 2010).

1.2.3. Cordocentese

A cordocentese consiste na recolha de 3-5 ml de sangue fetal a partir do cordão umbilical e é realizada entre as 20 e as 23 semanas de gestação. Apresenta um risco de perda fetal de 5%, comparativamente à amniocentese e à biópsia do trofoblasto (Gardner e Sutherland,

2004). Esta é importante, caso seja necessário um estudo das anomalias cromossômicas numa fase mais tardia da gravidez, já que a cultura de linfócitos permite obter um resultado por citogenética convencional em 72 horas (Júnior, 2002; Wieacker e Steinhard, 2010).

1.3. Citogenética convencional

Tradicionalmente, a citogenética refere-se ao estudo microscópico da estrutura e comportamento dos cromossomas ao nível celular, de forma a identificar alterações genómicas responsáveis por alterações do fenótipo (Ponnuraj, 2011). O objetivo de todas as técnicas de citogenética convencional é conseguir analisar na máxima resolução possível, todos os cromossomas. Esta análise é baseada na observação do padrão de bandas, produzidos por diferentes tipos de coloração dos cromossomas em metafase, de forma a produzirem uma visão global do genoma (Hsieh, 2011). Uma banda constitui parte de um cromossoma, sendo claramente distinta de seus segmentos adjacentes, surgindo mais escuras ou mais claras, dependendo do método de bandagem (Shaffer et al., 2012a). As técnicas de citogenética convencional podem ser agrupadas em dois grupos principais: as que resultam em um padrão de bandas distribuído ao longo de todo o comprimento do cromossoma, tais como as bandas GTG, Q e R, e as que marcam estruturas cromossômicas específicas, dando origem a um número restrito de bandas ou estruturas específicas marcadas. Este último grupo inclui as bandas CBG e NOR, que não permitem a identificação de todos os cromossomas, mas que podem ser utilizadas para a identificação de regiões específicas. Por exemplo, a técnica de bandagem CBG é específica para os centrómeros e regiões polimórficas. A técnica de bandagem NOR é específica para os braços curtos dos cromossomas acrocêntricos com produção ativa de rRNA (Bickmore, 2001; Gardner e Sutherland, 2004).

Praticamente todas as técnicas de bandagem cromossômica dependem do bloqueio da mitose em pro-metáfase ou metafase. Isto geralmente consegue-se por tratamento das células com inibidores da tubulina, tais como a colchicina ou colcemida, que atuam na despolimerização do fuso mitótico, não permitindo a migração dos cromossomas para os polos (Bickmore, 2001; Clouston, 2001).

Após a coloração para induzir os padrões de bandas, as preparações com as metafases são examinadas com o auxílio de um microscópio ótico de luz com óleo de imersão (ampliação de 1000x). Atualmente, a captura e armazenamento das células em metafase é feita por um sistema de imagem computadorizado, facilitando a análise dos cromossomas e a construção do chamado cariótipo ou cariograma (figura 1), que constitui um dos procedimentos mais importantes da citogenética convencional. O cariograma é a representação fotográfica de todos os cromossomas presentes numa metafase, dispostos de uma forma organizada, com os respetivos pares de homólogos emparelhados e com os centrómeros alinhados. A identificação dos cromossomas é feita com base no seu tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas ao longo dos seus braços. O estudo citogenético é dependente do número de metafases analisadas para a deteção de anomalias cromossómicas e requer mão-de-obra qualificada e experiente (Khmelinskii, 2007; Ponnuraj, 2011).

1.3.1. Bandas GTG

A maioria dos laboratórios de citogenética utiliza a bandagem GTG (figura 1) como técnica principal, na análise de anomalias cromossómicas e só posteriormente recorre a outras técnicas de coloração ou mesmo moleculares, como meios de diagnósticos complementares (Benn e Tantravahi, 2001). Na bandagem GTG, os cromossomas são submetidos a um tratamento com uma enzima, normalmente a tripsina, que altera a estrutura das proteínas, seguida por uma coloração com uma solução de Giemsa, que tem na sua constituição azul metileno e eosina. Este tratamento vai permitir a marcação escura e clara das regiões cromossómicas heterocromáticas e eucromáticas (Schreck e Distèche, 1994; Bickmore, 2001; Ponnuraj, 2011).

1.3.2. Bandas C

A banda C ou CBG permite destacar as regiões dos cromossomas que apresentam DNA altamente repetitivo, como as regiões dos centrómeros e outras regiões cromossómicas constituídas por heterocromatina constitutiva, como por exemplo o braço longo do cromossoma Y (Wang, 2002). Esta técnica de coloração recorre a tratamentos sucessivos

com soluções ácidas, alcalinas e salinas, seguida da coloração com Giemsa (Schreck e Distèche, 1994; Benn e Tantravahi, 2001).

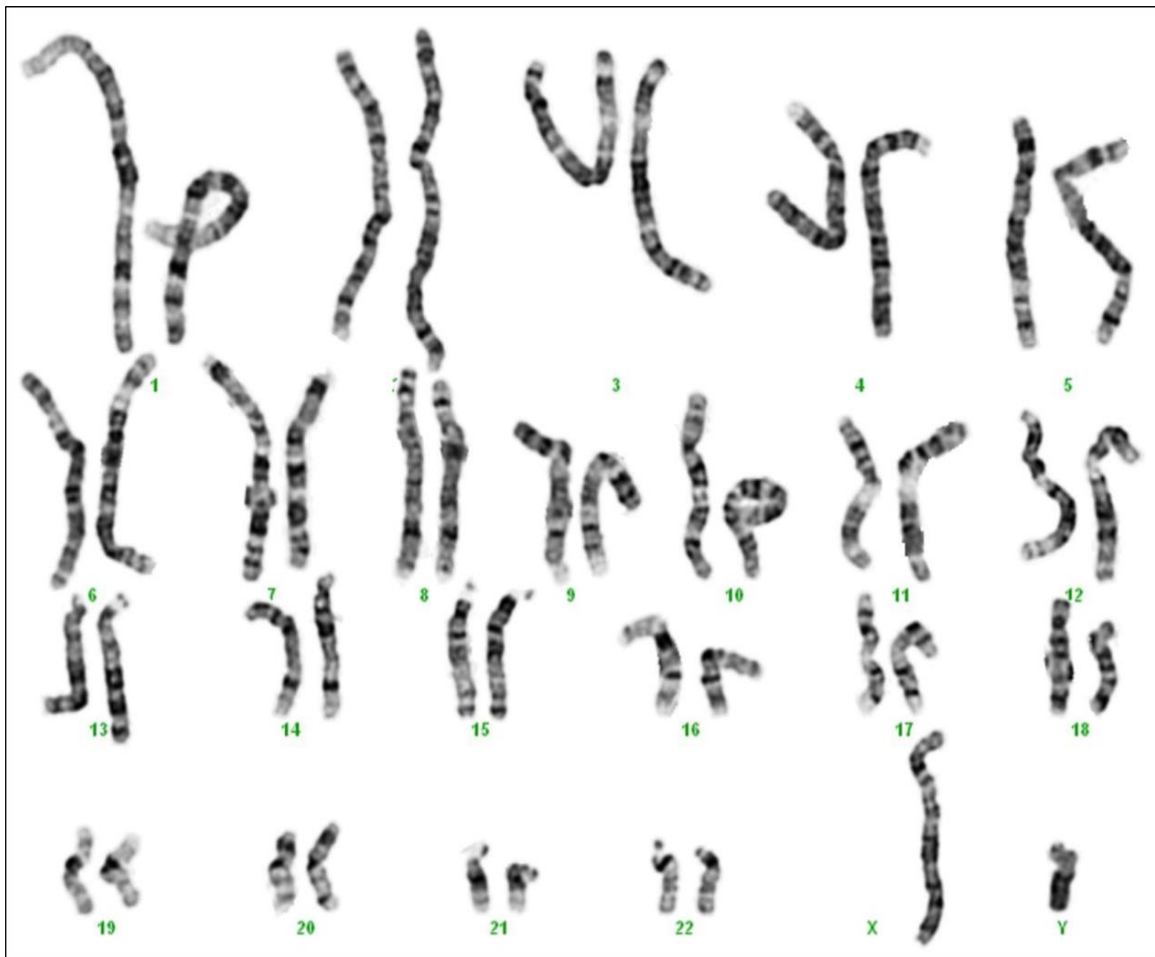


Figura 1. Cariograma humano normal com cromossomos de alta resolução de um indivíduo do sexo masculino, 46, XY, obtido com bandagem GTG (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

1.3.3. Bandas NOR

Os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos são corados com nitrato de prata nas suas regiões satélites, mais precisamente, nas regiões organizadoras do nucléolo. A coloração com este composto permite detetar os genes de DNA ribossomal 18S e 16S presentes, sendo útil para o estudos de certos polimorfismos presentes nessas regiões. A bandagem NOR também pode ser útil para a identificação de satélites presentes em cromossomos não

acrocêntricos que resultam de rearranjos cromossômicos (Shaffer et al., 2009; Ponnuraj, 2011).

1.4. Array-based comparative genomic hybridization (aCGH)

O aCGH permite o estudo de todo o genoma humano em simultâneo com elevada resolução, a partir da análise de fragmentos de DNA genómico, que cobrem as regiões cromossômicas de interesse, fixados numa plataforma (Allemeersch, et al., 2009).

1.4.1. Aplicação do aCGH

Para a realização do aCGH (figura 2), iguais quantidades de DNA marcado, referentes à amostra em estudo e à amostra controlo são co-hibridizadas numa plataforma (*microarray*), geralmente uma lâmina de vidro, contendo fixado os fragmentos de DNA genómico, designados por sondas de DNA.

No aCGH, a marcação do DNA da amostra em estudo e da amostra controlo é feita com fluorocromos diferentes, Cyanine 5 (Cy5) Cyanine 3 (Cy3), respetivamente. Terminada a hibridização competitiva entre ambas as amostras de DNA, o microarray é lido por um *scanner*, onde é medida a intensidade de fluorescência, para cada sonda de DNA de Cy5 (532 nm) e Cy3 (635 nm). Por fim, para que se proceda à interpretação dos resultados, a intensidade de fluorescência emitida é avaliada e quantificada por um *software* específico para a análise do número de cópias (Zuffardi et al., 2010; Brady e Vermeesch, 2012).

O *software* fornece-nos um rácio sob a forma de logaritmo (log), onde a diferença entre a intensidade de fluorescência emitida pelo DNA em estudo e pelo DNA controlo, para cada *locus*, é proporcional à diferença no número de cópias da amostra de DNA comparativamente ao controlo. Deste modo, se a intensidade de fluorescência de Cy5 e Cy3 forem iguais para um determinado *locus*, esse local do genoma em estudo é considerado como sendo normal. Caso se verifique uma maior quantidade de fluorescência emitida por Cy5 em relação a Cy3, isto significa que a amostra em estudo apresenta um ganho de material genómico, numa determinada região, relativamente ao controlo. O

inverso corresponde a uma perda de material genómico por parte da amostra em estudo para uma dada região (Allemeersch et al., 2009).

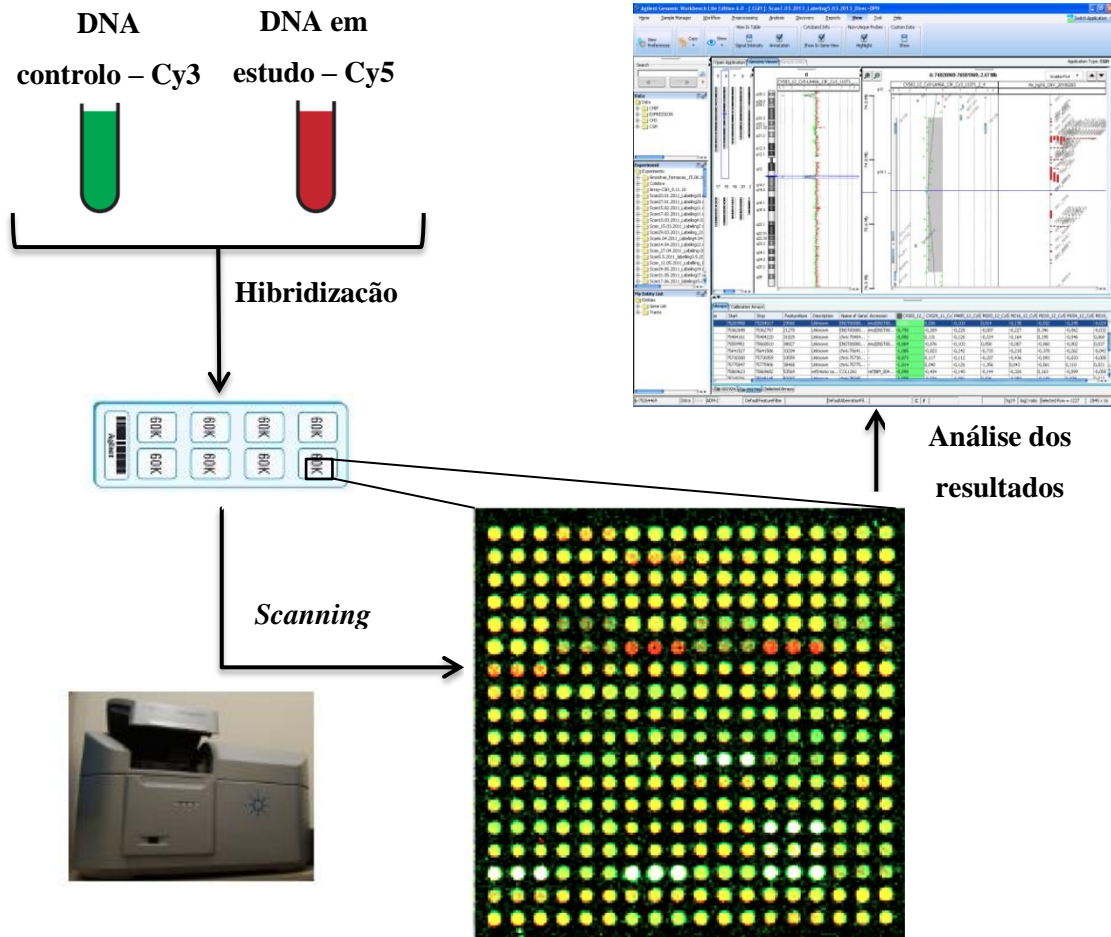


Figura 2. Diagrama representativo do processo de *aCGH*. O DNA em estudo e o DNA controlo são marcados diferencialmente com Cy5 e Cy3, respetivamente. Estas duas amostras são hibridizadas competitivamente numa lâmina de *microarray*, contendo as sondas de DNA. Após a hibridização, a lâmina de *microarray* foi submetida a um varrimento onde ocorre a medição das intensidades de fluorescência para cada sonda. De seguida procede-se a análise das CNV's através de um *software* que avalia e quantifica a intensidade de fluorescência emitida.

Uma conceção alternativa é um *design* em *loop* no qual três amostras de DNA são comparadas umas com as outras através de três hibridizações: a amostra 1 contra a

amostra 2, a amostra 2 contra a amostra 3 e a amostra 3 contra a amostra 1 (figura 3). Com este *design* é possível analisar 3 amostras sem necessidade de uma amostra de referência normal. Além disso, o DNA de cada uma das amostras é analisado duas vezes em apenas 3 *microarrays*. Esta é a maior vantagem desta estratégia, pois permite na mesma aplicação confirmar um resultado, já que, a mesma amostra de DNA é comparada com duas amostras de DNA diferentes. Por exemplo, a existência de uma duplicação no DNA da amostra 1 resulta num rácio log positivo da hibridização entre a amostra 1 e 2. Por sua vez, um rácio log negativo será esperado da hibridização entre a amostra 3 e 1. Na hibridização entre a amostra 2 e 3 o rácio log será nulo. Contudo, para a elaboração dos *loops* é necessário ter em consideração as indicações clínicas de cada um dos pacientes para que não se proceda à hibridização de amostras com indicações semelhantes no mesmo *microarray*. Tal procedimento evita que desequilíbrios cromossómicos associados às indicações clínicas possam não ser detetados por estarem presentes em ambas as amostras (Allemeersch et al., 2009; Brady e Vermeesch, 2012).

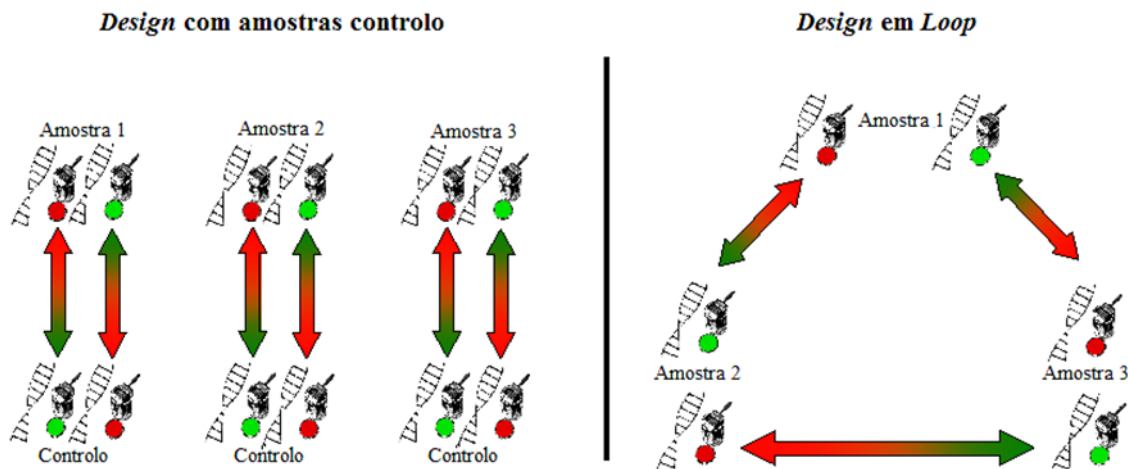


Figura 3. *Design em loop*. Representação esquemática de três amostras em estudo com uma amostra controlo normal e um *design em loop* no qual as três amostras em estudo são comparadas entre si. Neste último, as amostras em estudo são hibridizadas duas-a-duas pelo que a mesma amostra é analisada duas vezes em três *microarrays*, permitindo a confirmação dos resultados obtidos (Adaptado de Allemeersch *et al.*, 2009).

O poder de resolução obtido pelo *a*CGH depende do número de sondas de DNA, do seu tamanho e da distância presente entre elas. As sondas de DNA usadas nas plataformas do *a*CGH podem ser obtidas a partir de oligonucleótidos sintéticos (25-85 pb) ou de fragmentos DNA genómico humano clonados em bactérias (BAC- *Bacterial Artificial Chromosome*) de 80-200 Kb (Bejjani e Natowicz, 2010; Shaffer e Van den Veyver, 2012). Um outro tipo de *microarrays* de oligonucleótidos, direcionados para análise de SNP's permitem a deteção de consanguinidade e dissomia uniparental (Schaaf et al.,2011).

1.4.2. Classificação das CNV's

O *a*CGH, também conhecido por cariótipo molecular, foi desenvolvido para a deteção de desequilíbrios genómicos através da análise de CNV's. As CNV's são alterações estruturais resultantes de segmentos de DNA iguais ou superiores a 1 Kb, que apresentam um número de cópias variável quando comparado com um genoma de referência (Clancy, 2008; Hillman et al., 2012).

As CNV's são uma componente de diversidade genómica tão importante quanto os polimorfismos de um único nucleótido (SNP – do inglês *single nucleotide polymorphism*), e segundo Redon e colaboradores (2006) estão presentes em aproximadamente 12% do genoma humano. Perante esta densidade, a classificação destas variantes pode ser um desafio no diagnóstico clínico. As CNV's podem abranger centenas de genes, incluindo genes associados a doenças, nos quais podem ser responsáveis por alterações nas suas funções. No entanto, a maioria das CNV's não estão associadas a doenças e são abundantes em indivíduos saudáveis (Lee et al., 2007; Clancy, 2008).

Na maioria dos laboratórios que usam o *a*CGH no diagnóstico clínico classificam as CNV's em diferentes grupos, consoante o impacto que estas possam ter no fenótipo. Nesta classificação destacam-se três categorias principais: CNV's benignas, CNV's patogénicas e CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido. As CNV's são consideradas benignas quando não provocam uma alteração patogénica associada com o fenótipo. Por sua vez, estas são definidas como patogénicas sempre que são responsáveis por um fenótipo anormal. Por último, quando se desconhece ou não se consegue definir o impacto destas no fenótipo, as CNV's são classificadas como sendo de significado clínico incerto ou desconhecido. Outras categorias subjacentes a estes grupos podem ser variáveis,

dependendo da estratégia utilizada para a análise de CNV's, já que esta é dependente de diversos parâmetros: o seu tamanho, conteúdo genético e hereditariedade. Além disso, a interpretação de CNV's está dependente das indicações clínicas e do estudo dos progenitores. No caso do DPN, os dados obtidos a partir da ecografia serão fundamentais para a análise do *aCGH*, caso apresentem anomalias fetais ou sinais ecográficos de alerta (Vermeesch et al., 2012; Hillman et al., 2012).

1.4.3. Vantagens e desvantagens do *aCGH* face à citogenética convencional

A capacidade de detecção do *aCGH* e da citogenética convencional para os diferentes tipos de anomalias cromossómicas difere como descrito resumidamente na tabela 1. A maior vantagem do *aCGH* é a capacidade de oferecer uma análise em simultâneo de todo o genoma, com uma resolução nunca antes conseguida, proporcionando uma detecção de ganhos e perdas de material genético com uma resolução ~100x superior à resolução obtida por citogenética convencional (Scott *et al.*, 2013). Esta análise de alta resolução, além de proporcionar um aumento significativo na detecção de desequilíbrios cromossómicos, permite uma caracterização mais precisa desses desequilíbrios, proporcionando uma melhor previsão do fenótipo ou da gravidade da doença. Uma caracterização precisa de um desequilíbrio vai permitir a comparação de fenótipos entre pacientes portadores de alterações sobreponíveis, podendo-se estabelecer uma correlação do fenótipo com os genes da região envolvida. Outra grande vantagem é que o DNA para a realização do *aCGH* pode ser extraído diretamente das amostras, sem necessidade de cultura e processamento celular, permitindo assim uma resposta num tempo relativamente mais curto e evitando artefactos de cultura (Zuffardi et al., 2010).

Apesar da capacidade de análise do *aCGH*, este não deteta determinadas alterações cromossómicas que são detetáveis por citogenética convencional. Alterações cromossómicas equilibradas não são detetadas por *aCGH*. Tais rearranjos equilibrados, como translocações, inversões e inserções, *de novo* podem perturbar a função de um gene e gerar uma doença fenotípica sem perdas ou ganhos de material genético nos pontos de quebra. Porém, estudos revelam que 40% das alterações cromossómicas aparentemente equilibradas, quando identificadas por citogenética convencional, não são realmente

equilibradas. Nestes casos, o *aCGH* é fundamental para detetar perdas ou ganhos de material genético e esclarecer o tipo de alteração cromossómica presente (Fiorentino et al., 2011; Hillman et al., 2012). Além disso, a probabilidade de um rearranjo equilibrado perturbar a função de um gene é de aproximadamente 0,0001% (Fiorentino et al., 2011). Tem-se verificado curiosamente e com alguma frequência a presença de ganhos ou perdas cromossómicas não envolvendo os pontos de quebra, em pacientes que possuem rearranjos equilibrados (Hillman et al., 2012). Juntamente com os rearranjos equilibrados, alterações de poliploidia não são detetáveis por *aCGH*, sendo a exceção o uso de *microarrays* de SNP's (Brady e Vermeesch, 2012).

Tabela 1. Capacidade de deteção do *aCGH* e da citogenética convencional nos diferentes tipos de anomalias cromossómicas.

Anomalias cromossómicas	aCGH	Citogenética convencional
Aneuploidias	✓	✓
Poliploidias	(-) ¹	✓
Rearranjos equilibrados	-	(✓) ²
Rearranjos desequilibrados	✓	(✓) ²
Mosaicismos	(✓) ³	(✓) ⁴

✓ - apropriado para a deteção desse tipo de anomalias cromossómicas; -, não deteta esse tipo de anomalias cromossómicas; 1 - indica que pode ser capaz de detetar triploidias 69, XYY; 2 - indica que só deteta rearranjos cromossómicos superiores a 3-10 Mb; 3 - indica que não consegue detetar mosaicismos inferiores a uma expressão de 10%; 4 - indica que a deteção de mosaicismos está dependente do número de células analisadas.

Por último, o *aCGH* não deteta mosaicismos de baixa expressão, isto é, quando um organismo apresenta dois ou mais tipos celulares, com material genético diferente, e se um destes está em baixa percentagem (<10%) no organismo, esta tecnologia não o consegue detetar. Porém, ao nível da citogenética convencional, a deteção de mosaicismos está dependente do número de células analisadas, pelo que podem não ser detetados se também possuírem um baixo nível de expressão (Fiorentino et al., 2011; Evangelidou et al., 2013).

1.5. *a*CGH no diagnóstico pré-natal

A análise de CNV's através do *a*CGH apresenta vantagens significativas sobre a citogenética convencional e rapidamente se tornou o principal teste de rotina no diagnóstico pós-natal para recém-nascidos com características dismórficas, déficit cognitivo e alterações do espectro autista. Esta técnica proporcionou um ganho de detecção significativo entre 15-20% de alterações cromossômicas que não seriam detetáveis por citogenética convencional (Vestergaard et al., 2013). Em casos de morte fetal, o *a*CGH também tem revelado informações adicionais clinicamente relevantes (Savage et al., 2011). A utilização do *a*CGH como principal teste para a detecção de desequilíbrios cromossômicos no DPN ainda não é consensual, apesar de já ter demonstrado uma maior detecção de alterações cromossômicas, comparativamente à citogenética convencional, principalmente em casos com anomalias ecográficas. Tal falta de consenso deve-se à pouca experiência na utilização do *a*CGH para a detecção de CNV's no DPN, à não existência de padrões de análise, bem como à dificuldade de interpretação das CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido. Outro fator que também põe em causa a sua utilização, como principal teste de rotina no DPN, é a não detecção do pequeno grupo de alterações cromossômicas (rearranjos cromossômicos equilibrados e poliploidias) que seriam detetadas caso a citogenética convencional fosse o teste de primeira linha. Por último, o elevado custo da análise por *a*CGH também é limitante quanto à sua implementação, e em muitos casos, além do feto, os progenitores terão de ser igualmente sujeitos a esta análise (Cavalli et al., 2012; Novelli et al., 2011; Shaffer et al., 2012; Vetro et al., 2012).

Como se verifica na citogenética convencional, o poder de detecção de desequilíbrios cromossômicos também aumenta substancialmente (6-8%), quando englobados apenas os casos com anomalias ecográficas fetais, tornando-o principal grupo de interesse para a implementação do *a*CGH no DPN (Vetro et al., 2012). Porém, mesmo neste grupo de pacientes, a aplicação desta técnica como teste de primeira linha é discutível, devido à pragmática dos resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, nomeadamente os que resultam de CNV's que podem ser associadas a patogenicidade, mas que não justificam as anomalias fetais encontradas ou que estão associadas a déficit cognitivo. Esta complexidade em decidir quais as CNV's que devem ou não ser reportadas põe em causa a aplicação do *a*CGH, isto porque tais resultados, além de aumentarem a ansiedade dos pais,

podem resultar na tomada de decisões precipitadas (Fiorentino et al., 2011; Savage et al., 2011; Vetro et al., 2012).

Vários estudos retrospectivos têm sido realizados de forma a perceber qual o papel que *aCGH* pode ter no DPN. Nestes estudos têm sido abordados quais as vantagens e desvantagens que o *aCGH* pode trazer para o DPN, que tipos de plataformas devem ser utilizadas e quais os parâmetros a ter em consideração para a análise e interpretação dos resultados. Recentemente, de forma a evitar situações em que a utilização do *aCGH* possa dificultar o diagnóstico, várias instituições internacionais têm publicado recomendações, com base na sua experiência e revisão literária, quanto à sua utilização no pré-natal. (Cavalli et al., 2012; Batista et al., 2012; Machado et al., 2012).

1.5.1. Tipos e plataformas de *microarrays*

As plataformas de *microarrays* a utilizar no DPN devem ter um *design* de forma a reduzir os resultados com significado clínico incerto ou desconhecido. Este parâmetro tem sido abordado com base na experiência e resultados obtidos por tecnologias de *microarrays* no pós-natal, bem como nos estudos retrospectivos para a sua implementação no DPN (Savage et al., 2012).

Atualmente, as duas tecnologias de *microarrays* mais utilizadas para a deteção de CNV's no diagnóstico são os *arrays* de SNP's e os de oligonucleótidos. A principal diferença entre eles é que no *aCGH* de oligonucleótidos ocorre uma hibridização competitiva entre o DNA em estudo e o DNA controlo, enquanto que, o *array* de SNP's apenas requer o DNA em estudo e este é comparado com um conjunto de dados controlo, ou seja, apenas uma amostra é hibridizada na lâmina de *microarray*. Geralmente, as plataformas para o *aCGH* de oligonucleótidos apresentam uma deteção no número de cópias superior à do *array* de SNP's, mas em contrapartida este último é capaz de detetar a maior parte dos casos de dissomia uniparental e tem uma sensibilidade maior na deteção de mosaicismos de baixa expressão. No entanto, as plataformas de *aCGH* de oligonucleótidos têm sido as mais indicadas para o DPN, uma vez que permitem uma cobertura mais uniforme de todo o genoma (Breman et al. 2012; Srebniak et al., 2012).

Tem-se assistido nos últimos anos a uma substituição de *microarrays* de baixa resolução por *microarrays* com uma maior resolução para a deteção e análise de CNV's. Atualmente,

os fabricantes de plataformas para o *aCGH* têm disponíveis diversos formatos com diferentes gamas de alta resolução para a cobertura do genoma humano. Estas diferem no número de sondas, no seu tamanho e no intervalo entre elas existindo, hoje em dia, plataformas de *aCGH* constituídas por um milhão de sondas. No DPN, a escolha de uma plataforma capaz de detetar a maioria das CNV's patogénicas, detetando o mínimo de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido é essencial (Hillman et al., 2012). As plataformas de *aCGH* podem ser portanto, categorizadas em dois tipos: *aCGH* representativos de todo o genoma (do inglês *whole-genome array*) e direcionados (do inglês *targeted array*) para detetar principalmente CNV's associadas a distúrbios clínicos conhecidos. No primeiro tipo, as plataformas de *aCGH* são desenhadas de modo a que as sondas ofereçam uma cobertura uniforme ao longo de todo o genoma, o que lhes permite obter uma resolução global superior. O segundo tipo de *aCGH* tem uma maior densidade de sondas em regiões do genoma associadas a síndromes descritas, nomeadamente de microdeleção e microduplicação ou regiões contendo genes conhecidos por estarem associados a doenças. O contrário acontece nas regiões do genoma contendo sequências polimórficas, repetitivas e menos suscetíveis a terem CNV's clinicamente significativas (Breman et al., 2012). Utilizando plataformas de *aCGH* direcionadas, a percentagem de CNV's de difícil interpretação vai ser menor, o que é recomendável em DPN. Porém, ao utilizar este tipo de plataformas, CNV's patogénicas poderão não ser detetadas. Além disso, o conhecimento acerca de CNV's é cada vez maior e novas síndromes de microdeleção e microduplicação relevantes estão continuamente a ser descritas, pelo que, seria necessário uma atualização frequente das plataformas de *aCGH* direcionadas. Esta estratégia não seria rentável e também, com base na experiência do diagnóstico pós-natal, sabe-se que uma grande percentagem dos desequilíbrios cósmicos causadores de doenças não é recorrente e encontram-se fora das regiões cobertas pelos *aCGH*'s direcionados. Estes fatores têm suportado o uso de *aCGH*'s representativos de todo o genoma no DPN, já que, permitem uma abordagem mais eficiente e com menor risco de CNV's patogénicas não serem detetadas. Para além disso, estudos recentes argumentam que a utilização deste tipo de *aCGH* aumenta a deteção de CNV's patogénicas sem aumentar substancialmente a deteção de CNV's com significado incerto ou desconhecido (Zuffardi et al., 2010; Vetro et al., 2012).

Tem havido um enorme debate sobre qual o limiar de resolução representativo de todo o genoma ideal para as plataformas de *aCGH* no DPN, isto porque, uma maior resolução tem a vantagem de um maior número de CNV's patogénicas poderem ser detetadas mas como consequência, o número de CNV's com significado incerto ou desconhecido também aumenta substancialmente. Assim, uma boa relação entre estas duas categorias de CNV's é necessária para a validade dos resultados e eficácia clínica. No diagnóstico pós-natal, a cobertura mínima recomendada ao longo de todo genoma é de 200 Kb, apesar de CNV's com menor tamanho poderem ser detetadas, uma vez que, mesmo os *aCGH*'s representativos de todo o genoma possuem uma maior densidade de sondas nas regiões associadas às síndromes de microdeleção e microduplicação conhecidas. No entanto, qualquer desequilíbrio inferior a esta resolução só pode ser devidamente interpretado se existir informação disponível acerca dos genes envolvidos. A utilização de um limiar de resolução representativo de todo o genoma inferior a 200 Kb aumenta expressivamente os resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, pelo que não é aconselhável no DPN (Hillman et al., 2011; Schaaf et al., 2011; Vermeesch et al., 2012). A maior parte das CNV's patogénicas conhecidas tem um tamanho igual ao superior a 400 Kb, sendo este, o limiar de resolução representativo de todo o genoma aconselhado por alguns autores no DPN, sendo que a percentagem de resultados com significado clínico incerto ou desconhecido não é significativa, o que é fundamental principalmente em casos que o fenótipo é desconhecido ou não justifica as anomalias ecográficas encontradas (Zuffardi et al., 2010; Hillman et al., 2012; Brady e Vermeesch, 2012; Rooryck et al., 2013). No entanto, alguns autores consideram que as CNV's inferiores a 400 Kb, que justifiquem as anomalias fetais encontradas devem ser consideradas (Scott et al., 2013). Porém, este tipo de interpretação torna difícil a obtenção de padrões de análise para o *aCGH*. Perante isto, existem autores defendendo que o uso de *aCGH*'s com o mesmo limiar de resolução para o pós-natal e pré-natal seria a estratégia mais rentável. Estes suportam a sua opinião com o contributo que a experiência obtida no diagnóstico pós-natal poderia oferecer no processo de interpretação dos resultados do DPN, e também pelo facto de existir uma menor probabilidade de uma CNV's patogénica não ser detetada. Estes também consideram que os técnicos de análise de *aCGH* devem estar familiarizados com a plataforma de *aCGH* utilizada e conhecer os seus pontos fortes e fracos. Esta experiência é tanto maior, quanto maior for o número de casos analisados pela mesma plataforma de *aCGH*, portanto, na

maioria do laboratórios significa ter em consideração as amostras do diagnóstico pós-natal. Além disso, o processo de interpretação de resultados será mais fácil se o laboratório dispuser de um conjunto de dados de controlo interno analisados pela mesma plataforma de *aCGH* (Vetro et al., 2012; Ahn et al., 2013).

1.5.2. Estudos de *microarrays* no DPN

Os primeiros estudos quanto à aplicação das tecnologias de *microarrays* no DPN foram realizados em 2006. Nestes estudos foram utilizadas as diversas plataformas de *microarrays* disponíveis (*arrays* de SNP's e *aCGH*'s de BAC e Oligonucleótidos). Através destas plataformas foram analisadas amostras de DPN para qualquer tipo de indicação clínica (ex.: idade materna avançada, anomalias ecográficas, sinais ecográficos de alerta, rastreio bioquímico positivo, ansiedade dos pais, etc.) ou apenas quando possuem a indicação de anomalias ecográficas (Lichtenbelt et al., 2011). Até meados de 2009, a experiência na utilização do *aCGH* no DPN era minoritária e os resultados obtidos eram bastante limitantes. Tal facto deveu-se à discrepância resultante da utilização de diferentes tecnologias de *microarrays*, da desigualdade de critérios na sua aplicação, da evolução que sofreram nesse período de tempo e do número relativamente pequeno de gestações que foram analisadas em cada um dos estudos. Além disso, também houve uma variação de critérios considerável no que diz respeito à identificação e classificação das CNV's (benignas, patogénicas e com significado clínico incerto ou desconhecido). No entanto, através da análise de oito estudos publicados neste período, no qual abordavam a aplicação dos *microarrays* no DPN, Hillman e colaboradores (2011) concluíram que *aCGH* detetou 3,6% de CNV's clinicamente significativas nos casos em que o cariótipo era normal. Quando os casos apresentavam a indicação de anomalias ecográficas, esta percentagem aumentou para 5,2%. Contudo, estes resultados incluíam as CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido. Nesta análise foram englobados 751 casos de DPN para todas as indicações clínicas, dos quais 409 possuíam a indicação de anomalias ecográficas (Hillman et al., 2011). Posteriormente, outros estudos foram publicados (Tabela 2) e demonstraram uma percentagem de 0-8,3% na deteção de CNV's patogénicas por *aCGH* adicionais à citogenética convencional para todo o tipo de indicações clínicas. Englobados apenas os casos com indicação de anomalias ecográficas, esta percentagem variou entre 0-20%. Em

ambos os casos, a taxa de detecção de CNV's patogénicas variou consideravelmente, obtendo valores elevados em alguns destes estudos, reflexo de uma seleção de casos de DPN, em detrimento de uma análise prospetiva aleatória. Na sequência destes estudos, a percentagem de CNV's com significado clínico incerto também variou consideravelmente, estabelecendo-se entre 0-12,2% (Evangelidou *et al.*, 2010; Maya *et al.*, 2010; D'Amours *et al.*, 2011; Fiorentino *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Filges *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Shaffer *et al.*, 2012a; Shaffer *et al.*, 2012b; Wapner *et al.*, 2012; Evangelidou *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2013; Vestergaard *et al.*, 2013).

No estudo realizado por Maya e colaboradores (2010), a taxa de detecção CNV's patogénicas por *aCGH* foi de 1,1% em 254 casos de DPN com resultado citogenético normal. Quando englobou apenas os casos com anomalias ecográficas, a percentagem aumentou para 2%, não resultando num aumento significativo, apesar de englobar unicamente casos com indicação de anomalias ecográficas e curiosamente, o grupo de casos analisados devido a ansiedade dos pais apresentou uma taxa superior de 2,2%, que não seria esperada, já que, este grupo é o que apresenta menor probabilidade de possuir uma cromossomopatia. Isto levou os autores a concluir que este teste pode ser extensível a todos os casos de DPN, independentemente das indicações clínicas, mesmo sendo menos propícios a possuírem alterações cromossómicas. Neste estudo não foi reportado nenhum caso com CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido (Maya *et al.*, 2010). Um outro estudo publicado por Evangelidou e colaboradores, nesse mesmo ano, apresentou uma maior capacidade na detecção de CNV's patogénicas por *aCGH*, adicionais à citogenética convencional. Nele foram analisados 25 casos de DPN em que, 15 tinham a indicação de anomalias ecográficas associadas com um cariótipo normal e 10 apresentavam rearranjos cromossómicos aparentemente equilibrados, detetados por citogenética convencional, com ou sem indicação de anomalias ecográficas. No geral, a taxa de detecção de CNV's patogénicas pelo *aCGH* adicionais à citogenética convencional foi de 8% e excluídos os casos com cariótipo anormal a taxa de detecção foi 13,3%. No mesmo estudo, a percentagem de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido foi de 4%, referente a um caso com um rearranjo cromossómico aparente equilibrado, que foi submetido a *aCGH*. Através desta técnica verificou-se que, o rearranjo não era verdadeiramente equilibrado e que apresentava uma perda de material genético ao nível dos pontos de quebra. No entanto, os autores não conseguiram estabelecer o grau de

patogenicidade desta alteração ao nível do fenótipo. Perante isto, estes realçaram a facto de o *aCGH*, em conjunto com a citogenética convencional, permitir um diagnóstico preciso dos rearranjos cromossómicos mas, para tal, será necessário uma maior experiência na interpretação dos resultados obtidos por *aCGH*, de modo a evitar que este tipo de resultados dificultem o DPN (Evangelidou et al., 2010).

Até à data, o estudo que apresentou maior percentagem de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido, detetadas por *aCGH* foi o realizado por D'Amours e colaboradores (2011), no qual foram analisados 49 casos com indicação de anomalias ecográficas. A percentagem de CNV's com significado clínico incerto foi de 12,2 %. No seguimento deste estudo, a taxa de deteção de CNV's patogénicas, não detetáveis por citogenética convencional, foi de 8,2%, sustentando a importância do *aCGH*. No entanto, a elevada percentagem de resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, obtida neste estudo, coloca em causa a sua implementação no DPN. Contudo, este resultado foi em grande parte devido à indisponibilidade das amostras parentais, levando os autores a concluírem que, para a interpretação dos resultados com significado clínico no DPN é crucial a análise dos progenitores (D'Amours et al., 2011). Um estudo, que também obteve uma elevada percentagem inicial de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido, foi o realizado por Evangelidou e colaboradores (2013). Inicialmente, esta percentagem de resultados foi de 15,6%, sendo posteriormente reduzida para 4,6%. Tal redução deveu-se a análise dos progenitores, de tal maneira que, apenas os casos, nos quais esta análise ainda não tinha sido realizada, é que não foi possível classificar as CNV's como benignas ou patogénicas. Perante isto, Vetro e colaboradores consideram que a recolha de uma amostra de sangue de ambos os progenitores deve ser um pré-requisito obrigatório para a realização do *aCGH* no DPN. Evangelidou e colaboradores obtiveram resultados nos 64 casos analisados por *aCGH*, dos quais 53 apresentavam anomalias ecográficas associadas a um cariótipo normal e 11 possuíam um cariótipo anormal, podendo ou não estar associado a anomalias ecográficas. Neste, a taxa de deteção de CNV's patogénicas adicionais à citogenética convencional foi de 4,7%, e estas apenas foram detetadas em casos com anomalias ecográficas e cariótipo normal (Vetro et al., 2012; Evangelidou et al., 2013).

Um estudo particular foi o realizado por Leung e colaboradores (2011), no qual, foram analisados por *aCGH* 48 casos de DPN com aumento da translucência nucal (TN > 3,5

mm) e cariótipo normal. Alguns casos apresentavam outro tipo de indicações, em especial, 10 apresentavam anomalias fetais. Para todos os casos analisados, o *aCGH* detetou 8,3% de CNV's patogênicas não detetadas por citogenética convencional. Dos casos que apresentavam CNV's patogênicas, 2 continham anomalias fetais para além da translucência da nuca aumentada, o que equivale a 20%, quando considerados os casos contendo estas duas indicações. Neste estudo, somente 2% das CNV's foram classificadas como sendo de significado incerto ou desconhecido (Leung et al., 2011).

Um estudo que apresentou resultados peculiares foi o realizado por Filges e colaboradores (2012), no qual analisou por *aCGH*, 100 casos de DPN. Deste, faziam parte 49 casos com indicação de anomalias ecográficas. Neste estudo, não conseguiram demonstrar um poder de detecção superior por parte do *aCGH* comparativamente à citogenética convencional, já que, esta técnica apenas detetou 2% de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido, nos casos com resultado citogenético normal. No entanto, com base em outros estudos, os autores não colocaram de parte a aplicação do *aCGH* no DPN, mas pode vir a criar dificuldades devido às diversas abordagens que têm sido feitas, não existindo ainda uma padronização, como acontece na análise por citogenética convencional (Filges et al., 2012).

Todos os estudos referidos até ao momento eram limitados em termos de número de amostras. O primeiro estudo que englobou um número significativo de amostras foi realizado por Fiorentino e colaboradores (2011), no qual analisaram 1030 casos de DPN, por ambas as técnicas, para as diversas indicações clínicas. No total, através do *aCGH* detetaram 3,3% de CNV's patogênicas, das quais 0,9% não seriam detetáveis por citogenética convencional. Esta taxa foi relativa a 7 CNV's abaixo do limite de resolução da citogenética convencional e a 2 CNV's superiores a 10 Mb, mas não detetáveis devido à baixa qualidade do cariótipo obtido. A detecção de CNV's patogênicas por *aCGH* apresentou valores substancialmente mais elevados nos casos que apresentavam anomalias ecográficas e cariótipo normal, passando de 0,9% para 7,6%. Resultados semelhantes foram obtidos por Lee e colaboradores (2012), na análise de 3171 casos de DPN por ambas as técnicas com uma percentagem mínima de 0,16% de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido. Neste estudo, a taxa de detecção adicional do *aCGH* face à citogenética convencional foi de 1,1% para todas as indicações clínicas e 8,2% para os fetos com anomalias ecográficas. Deste modo, os autores responsáveis por cada um dos

estudos consideraram o *a*CGH uma ferramenta valiosa na análise deste último grupo de pacientes (Fiorentino et al., 2011; Lee et al., 2012). Todavia, as limitações desta técnica também foram visíveis no estudo de Fiorentino e colaboradores, já que não conseguiu detetar 1 mosaicismo de baixa expressão (0,1%) e 7 rearranjos equilibrados (0,7%) reportados por citogenética convencional. Apesar de uma percentagem idêntica de alterações cromossómicas não detetáveis por ambas as técnicas, os autores consideram que os resultados obtidos pelo *a*CGH são mais significantes, uma vez que, em termos clínicos a probabilidade de um rearranjo equilibrado causar um fenótipo patogénico é praticamente nula (Fiorentino et al., 2011). Wapner e colaboradores (2012) na análise de 4282 casos de DPN também não conseguiram detetar 40 rearranjos equilibrados (0,9%) e 17 triploidias (0,4%), sucedendo a uma falha na deteção de alterações cromossómicas por *a*CGH idêntica à do estudo anterior. Na análise dos 3822 casos em que não foi detetada qualquer anomalia por citogenética convencional, o *a*CGH detetou 0,9% de CNV's patogénicas para as diversas indicações clínicas. Inicialmente, a taxa de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido foi de 3,4%, mas com o acréscimo de informação relativa às CNV's e a experiência adquirida, esta taxa baixou para 1,5%. Relativamente ao grupo de casos com indicação de anomalias ecográficas e cariótipo normal, o *a*CGH detetou 6% de CNV's com significado clínico, das quais 2,8% foram definidas, *à priori*, como patogénicas. Os restantes 3,2% foram classificados como potenciais patogénicas, uma vez que, numa primeira fase foram definidas como CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido (Wapner et al., 2012).

O estudo que processou maior número de amostras com indicação de anomalias ecográficas foi publicado pela Shaffer e colaboradores (2012), no qual 2858 amostras das 5003 analisadas continham esta indicação. Excluindo os casos com cariótipo anormal anteriormente conhecido, morte fetal e progenitores com um rearranjo cromossómico, o *a*CGH detetou 5,3% de CNV's patogénicas para as diversas indicações clínicas. Nos casos com indicação de anomalias ecográficas e morte fetal, a taxa de deteção foi de 6,5% e 8,2%, respetivamente. Outro aspeto importante foi o facto de haver um aumento da taxa de deteção de 6,5% para 7,6% no grupo de casos com indicação de anomalias ecográficas, se apenas consideramos os casos analisados por *a*CGH de oligonucleótidos. A percentagem de CNV's com significado clínico incerto obtida pelo *a*CGH foi de 4,2%, mas reduzida a 0,39% se apenas as CNV's *de novo* forem consideradas. No total, 71% dos desequilíbrios

identificados foram inferiores a 10 Mb, pelo que a maior parte não deve ser identificada por citogenética convencional. Quando o cariótipo normal foi previamente conhecido, o *aCGH* detetou CNV's patogénicas em 5.5% dos casos. Quando englobados apenas os que apresentavam fetos com anomalias ecográficas, esta percentagem foi 6,2%, sendo semelhante à obtida por Wapner e colaboradores. Posto isto, os autores consideraram que o *aCGH* dever ser utilizado como teste de primeira linha no DPN, nomeadamente em fetos com anomalias ecográficas, já que o objetivo dos exames invasivos é detetarem alterações cromossómicas que possam ter impacto patogénico no fenótipo (Shaffer et al., 2012a; Shaffer et al., 2012b).

Scott e colaboradores (2013) relataram o primeiro estudo retrospectivo onde o *aCGH* e o ensaio quantitativo multiplex fluorescente da reação em cadeia da polimerase (qf-PCR) foram utilizados como testes de primeira linha no DPN, sem recorrer à citogenética convencional. Neste estudo foram detetadas CNV's em 14,9% dos 1049 casos analisados, incluindo 14 casos com mosaicismo detetados por *aCGH* e 7 triploidias detetadas por qf-PCR, pelo que não eram detetáveis por *aCGH*. Dos restantes casos, 3,1% das CNV's não eram detetáveis por citogenética convencional, das quais 1,2% foram consideradas patogénicas. A percentagem de CNV's com significado clínico incerto situou-se nos 0,3%. Dos casos que apresentaram CNV's patogénicas não detetáveis por citogenética convencional, 3 apresentaram anomalias ecográficas, o que equivale a 4,8% quando considerados apenas os que continham esta indicação. Posto isto, os autores consideraram que o *aCGH*, com o auxílio da tecnologia qf-PCR se mostrou eficaz como teste de primeira linha no DPN. Em adição, eles também salientaram o facto de a maioria das anomalias cromossómicas, detetáveis através da citogenética convencional, serem detetadas por qf-PCR que é relativamente mais barato. Por outro lado, o *aCGH* detetou uma porção pequena, mas importante de anomalias adicionais semelhante à obtida por Maya, Fiorentino, Lee, Wapner e respetivos colaboradores (Scott et al., 2013).

Apesar da enorme importância dos estudos como um grande número de amostras de DPN, estudos com um número mais reduzido de análises por *aCGH* continuam a ser publicados e a contribuir para a avaliação desta técnica. Exemplo disso é o estudo publicado por Vestergaard e colaboradores (2013), onde foram analisados 89 casos com anomalias ecográficas por *aCGH*. Neste grupo foram englobados 5 casos que apresentavam um aumento isolado da translucência de nuca superior a 5 mm ou em associação com outras

anomalias ecográficas. Através do *aCGH* foram detetadas CNV's patogénicas em 12% dos casos, sendo uma taxa considerável, explicada pelo facto de todos os casos analisados terem sido seleccionados numa terceira fase, após o rastreio do 1º e 2º trimestre de gravidez. Em 2,2% dos casos o *aCGH* detetou CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido. Embora seja um número pequeno, os autores consideram que este pode ser justificável pelo facto de ter sido utilizada uma plataforma de *aCGH* de oligonucleótidos (180K), representativa de todo o genoma. Neste estudo, apenas 50 casos foram sujeitos à análise por citogenética convencional. Com base neste grupo, foi possível verificar um ganho adicional de 14% de CNV's patogénicas por parte do *aCGH*, fundamentando a mais-valia que esta técnica pode trazer ao DPN em fetos com malformações ecográficas (Vestergaard et al., 2013).

Tabela 2. Taxa de detecção de CNV's clinicamente significativas não detetáveis por citogenética convencional para todo o tipo de indicações clínicas e por indicação de anomalias ecográficas.

Autor	Número de casos	Plataformas de microarrays	CNV's patogénicas apenas detetáveis por aCGH (%)	CNV's com significado clínico incerto (%)	CNV's patogénicas apenas detetáveis por aCGH com indicação de AE [% (n/t)]
Maya <i>et al.</i> (2010) ^a	254	BAC	1,1	0	2 (2/102)
Evangelidou <i>et al.</i> (2010)	25	BAC	8	4	13,3 (2/15)
D'Amours <i>et al.</i> (2011) ^b	49	BAC e Olig.	—	12,2	8,2 (4/49)
Leung <i>et al.</i> (2011) ^c	48	Olig.	8,3	2	20 (2/10)
Fiorentino <i>et al.</i> (2011)	1030	BAC	0,9	0	7,6 (5/66)
Lee <i>et al.</i> (2012)	3171	BAC e Olig.	1,1	0,16	8,2 (16/194)
Shaffer <i>et al.</i> (2012ab) ^a	2533	BAC e Olig.	5,5	4,2	6,2 (128/2052)
Filges <i>et al.</i> (2012)	100	Olig.	0	2	0 (0/49)
Wapner <i>et al.</i> (2012) ^a	3822	Olig. e SNP's	0,9	1,5	6 (45/755)
Evangelidou <i>et al.</i> (2013)	64	Olig.	4,7	4,6	NR
Vestergaard <i>et al.</i> (2013) ^{ab}	50	Olig.	—	2	14 (7/50)
Scott <i>et al.</i> (2013)	1049	Olig.	1,2	0,3	4,8 (3/62)

AE - Anomalias ecográficas; NR - Resultado não reportado no estudo; a - Foram excluídos os casos com resultados tendenciosos, cariótipo anormal anteriormente conhecido e sem análise por citogenética convencional; b - O estudo apenas englobou casos com indicação de anomalias ecográficas; c - Todos os casos apresentavam a translucência da nuca aumentada (TN > percentil 95); n - Número de casos com CNV's patogénicas; t - Total de casos presentes no estudo com indicação de anomalias ecográficas.

1.5.3. Recomendações na utilização do *aCGH*

Um consórcio especialista na área do *aCGH*, *International Standard Cytogenomic Array* (ISCA) realizou uma revisão literária, envolvendo 33 estudos, incluindo a análise de 21698 pacientes por diversas plataformas de *microarrays*. Neste estudo foram comparados os resultados obtidos por *aCGH* e citogenética convencional, avaliadas as vantagens, limitações e rendimento de cada uma das técnicas. Eles confirmaram as competências do *aCGH* como teste de primeira linha no diagnóstico pós-natal, em casos com déficit cognitivo, espectro autista e múltiplas anomalias congénitas. Contudo, o consórcio ISCA considera que o conhecimento atual ainda não permite a recomendação desta técnica para o DPN e que a citogenética convencional deve continuar a ser considerada o teste de primeira linha neste tipo de diagnóstico (Miller et al., 2010).

O Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas recomenda igualmente a utilização do *aCGH* na rotina do diagnóstico pós-natal, mas tal orientação não é válida para o DPN, uma vez que considera que a citogenética convencional deve permanecer como teste principal. No entanto, esta instituição reconhece que o *aCGH* pode ser especialmente útil em fetos com anomalias ecográficas e resultado citogenético normal. Tal facto leva à aceitação da sua aplicação como teste adicional neste grupo de pacientes em conjunto com um bom aconselhamento genético, antes e depois do teste, de modo a esclarecer os progenitores sobre as vantagens e limitações da sua utilização (Savage et al., 2011).

A Sociedade Italiana de Genética Humana com base na sua experiência também não recomenda o uso do *aCGH* como substituto da citogenética convencional, e que atualmente, apenas deve ser aplicado como um teste de segunda linha no DPN. Considera que esta técnica apenas deve ser proposta para o diagnóstico de gestações com determinadas indicações clínicas, tais como, a presença de fetos com anomalias ecográficas, rearranjos cromossómicos *de novo* aparentemente equilibrados, detetados por citogenética convencional, de forma a investigar uma possível perda de material genómico e em marcadores cromossómicos supernumerários de modo a caracterizar a sua origem e conteúdo genético (Novelli et al., 2011).

Na Holanda, o DPN é apenas realizado em centros médicos universitários. Eles submetem o *aCGH* a casos onde são encontradas anomalias ecográficas ou quando pedida a sua realização, após excluída a presença de triploidias e das aneuploidias mais

comuns por qf-PCR. Para esta análise, consideram como pré-requisitos obrigatórios, o aconselhamento genético pré-teste e a colheita de sangue de ambos os progenitores. No entanto, ainda não existem diretrizes nacionais para a sua utilização no DPN (Vetro et al., 2012).

A posição destas instituições deve-se principalmente à incerteza que existe nos resultados obtidos por *aCGH* e nas implicações que estes possam trazer ao DPN. A ausência de padrões de análise também contribui para esta posição. Estas Instituições consideram provável que no futuro o *aCGH* possa substituir a citogenética convencional como teste de primeira linha no DPN, nomeadamente nos casos com indicação de anomalias ecográficas. Para que tal aconteça, consideram que questões relativas ao tipo de plataformas de *microarrays* a utilizar no DPN, bem como, qual o limite mínimo de resolução a ter em consideração terão de continuar a ser debatidas e mais estudos serão necessários de modo a reduzir, ao máximo, as CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido (Machado et al., 2012; Vetro et al., 2012).

1.5.4. Análise e interpretação dos resultados de *aCGH*

A análise dos resultados é normalmente efetuada com a ajuda de *softwares* específicos. A maioria deles fornece ferramentas de modo a facilitar a interpretação e armazenamento dos resultados obtidos, bem como fornecer uma ligação às bases de dados disponíveis. Um aspeto importantíssimo na análise e interpretação do *aCGH* é que os resultados podem ser influenciados pelos critérios de análise definidos pelo laboratório (Brady e Vermeesch, 2012). Por exemplo, Vestergaard e colaboradores (2013), no seu estudo consideraram CNV's com três ou mais sondas consecutivas alteradas, mantendo o mesmo processo de análise para as amostras de pré- e pós-natal. Por sua vez, na análise do *aCGH*, Rooryck e colaboradores (2013) apenas consideraram CNV's com o mínimo de 8 sondas consecutivas alteradas para as amostras de DPN. Deste modo, a análise de determinados desequilíbrios genómicos por esta técnica vai depender da estratégia definida por cada laboratório. Isto deve-se à dificuldade de interpretação dos resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, que são o maior desafio no DPN (Rooryck et al., 2013; Vestergaard et al., 2013).

Informações importantes para a interpretação de CNV's são fornecidas pelas várias bases de dados públicas que coletam indivíduos saudáveis, como *Database of Genomic*

Variants (DGV) ou indivíduos com anomalias congénitas múltiplas e/ou problemas de desenvolvimento, tais como, a base de dados do ISCA, a *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations* (ECARUCA) e a *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER). O constante aumento de informação nas bases de dados vai ser fundamental para uma melhor correlação entre uma determinada CNV e uma possível condição fenotípica. Neste processo, a caracterização detalhada do fenótipo do probando por parte dos clínicos é fundamental para a utilização destas bases de dados. Obviamente, isto torna-se difícil no DPN, onde o fenótipo é limitado ao que é visível através da ecografia, e mesmo quando uma anomalia está presente, esta pode não estar correlacionada com a CNV detetada, comprometendo ainda mais a sua interpretação. No entanto, as bases de dados públicas, juntamente com o estudo dos pais, têm sido as principais ferramentas para a distinção entre CNV's benignas ou com significância clínica (Zuffardi et al., 2011; Vetro et al., 2012).

1.5.4.1. CNV's benignas

A distinção entre CNV's benignas comuns, que não estão envolvidas em alterações do fenótipo, e CNV's raras com potencial patogénico são o primeiro passo para a sua interpretação. Uma vez que, 12% do genoma humano é coberto por este tipo de polimorfismos, torna-se necessário identificar as que estão presentes em indivíduos comuns saudáveis. Para este processo pode recorrer-se a bases de dados como a DGV, mas tendo sempre em consideração que estas foram criadas, principalmente, para fins de investigação. Além disso, os dados apresentados na DGV não são sujeitos a uma seleção pelos editores, já que, os únicos requisitos são que estes sejam publicados como artigo científico e que as CNV's sejam oriundas de uma amostra de um indivíduo normal. Em alguns estudos contributivos, não é feita qualquer distinção entre ganhos e perdas, pelo que, estas CNV's deverão ser excluídas para a análise. Também devem ser tomadas precauções quando se usa tal base de dados para determinar o significado clínico de uma CNV, nomeadamente quando está listada em apenas um único indivíduo, podendo ser uma variante rara, mas os falsos positivos podem não ter sido excluídos. Além disso, fenótipos subtis podem não ter sido registados no grupo controlo e conseqüentemente, variantes raras listadas na DGV podem contribuir para esse

fenótipo. Outro aspeto importante é o tamanho das CNV's registadas nestas bases de dados, que são mais propícias a erros, quando detetados por plataformas *aCGH* mais antigas ou com uma resolução inferior. Tal facto pode por em causa a comparação de CNV's, uma vez que, também devem ser considerados o seu tamanho e a percentagem sobreponível com as CNV's presentes no probando, bem como os genes envolvidos. Por fim, este processo de eliminação de CNV's sem impacto fenotípico deve ser feito de forma prudente, acautelando que informação importante possa não ser facilmente ignorada (Gijsbers et al., 2011; Vermeesch et al., 2012).

1.5.4.2 CNV's patogénicas

As CNV's que sobrepõem regiões críticas no genoma (como as teloméricas ou contendo genes associados a doença) ou aliadas a síndromes são consideradas prováveis patogénicas na natureza. No entanto, para fins de diagnóstico, estas devem incluir a região crítica da síndrome e, se conhecidos, os genes causadores da doença. Porém, as CNV's detetadas em outras regiões genómicas também têm potencial para serem patogénicas, não podendo ser facilmente descartadas. Com o aumento da resolução do *aCGH*, novas síndromes têm sido descritas, mas em contrapartida, este processo de comprovação da patogenicidade de uma dada CNV tem-se tornado mais complexo. Em determinados casos, as CNV's apresentam uma variabilidade fenotípica distinta, o que ainda dificulta mais a sua interpretação. As bases de dados que coletam CNV's patogénicas e o respetivo significado clínico (DECIPHER, ISCA, ECARUCA) são fundamentais para a caracterização das mesmas, posteriormente detetadas em outros pacientes, uma vez que, permitem a sobreposição dos respetivos desequilíbrios genómicos. Esta comparação, juntamente com a determinação do tamanho das CNV's contribuem para a identificação dos genes responsáveis pelas diferentes características fenotípicas de uma dada síndrome. Outro passo importante, para a interpretação de CNV's patogénicas é a análise dos progenitores, que irá permitir determinar se estas são herdadas ou *de novo* (Gijsbers et al., 2011; Vetro et al., 2012).

1.5.4.3 CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido

Quando não é possível classificar uma CNV como patogénica ou benigna, deve ser classificada como uma variante de significado clínico incerto ou desconhecido. No

entanto, antes desta classificação, se possível, deve-se efetuar o estudo dos pais, de modo a verificar a herança das mesmas. Em concordância, estudos populacionais indicam que 99% das CNV's herdadas são benignas, e que na sua grande maioria são inferiores a 500 Kb (Gijbers et al., 2011; Vermeesch et al., 2012). No entanto, o facto de uma CNV ser herdada de uma pessoa aparentemente normal, não significa que esta seja propriamente benigna, uma vez que a CNV pode possuir um gene sujeito a fenómenos de *imprinting*, em que um dos alelos é metilado, resultando num fenótipo patogénico quando apenas herdado do pai e não da mãe, ou vice-versa. A variabilidade fenotípica também pode ser explicada por fenómenos de haploinsuficiência, em que um gene normal quando não se encontra numa dosagem suficiente, pode provocar um fenótipo patogénico. Por fim, a própria CNV é um fator de risco, que promove uma doença num determinado contexto genómico apesar de desconhecido, ou seja, está associada a um determinado nível de patogenicidade, mas exibe penetrância incompleta (Beaudet e Belmont, 2008; Schaaf et al., 2011; Vetro et al., 2012). Posto isto, o estado de herança das CNV's não deve ser o único critério para classificar uma CNV's como benigna ou patogénica, sendo que, uma apreciação caso-a-caso será sempre necessária. A avaliação irá sempre depender da região envolvida e das suas características, tendo sempre em conta que, pode ser difícil ou mesmo impossível identificar uma ligação entre a alteração encontrada e o fenótipo do feto (Vetro et al., 2012).

1.5.6. Aconselhamento genético

A análise por *microarrays* pode tornar-se o teste de DPN mais sensível disponível atualmente. A sua utilização neste tipo de diagnóstico ainda não é consensual, principalmente, devido aos resultados com significado clínico incerto ou desconhecido que, para além de aumentar a ansiedade dos pais, podem levar a decisões precipitadas, culminando, por vezes, na interrupção médica da gravidez. Assim, um dos aspetos mais difíceis de gerir com a introdução do *aCGH* no DPN é o aconselhamento genético dos progenitores, devido à carga emocional que este processo possa vir a atingir. Deste modo, antes de ser feito qualquer passo para a realização do *aCGH*, é primordial proceder-se a um aconselhamento, devido à natureza deste teste e à informação que este pode fornecer (Srebniak et al., 2011; McGillivray et al., 2012). O aconselhamento deve ser feito por especialistas, que devem explicar tudo de uma forma clara e sem orientar a

tomada de decisão dos futuros pais. Para ser realizado corretamente é necessário terem acesso à história médica da gravidez, que deve incluir as anomalias ecográficas, caso existam, bem como a história médica de ambos os progenitores e a história familiar de três gerações (Vetro et al., 2012). Esta informação poderá revelar uma ou mais doenças genéticas na família e obviamente, serão cruciais na interpretação dos resultados. Neste tipo de consultas devem ser abordadas todas as vantagens e desvantagens do *aCGH*, os diferentes tipos de resultados possíveis e qual o significado clínico que estes podem ter. Assim, deve ser explicado aos futuros pais que as CNV's detetadas podem ou não justificar as anomalias ecográficas encontradas, podendo ser herdadas ou *de novo* e os seus impactos patogénicos podem ser incertos ou desconhecidos. Da mesma forma, deve ser esclarecido o porquê da recolha de amostras de DNA de ambos os pais, e que estas são processadas de acordo com o seu consentimento, no que diz respeito à informação que pretendem. Também devem ser informados acerca do tempo de espera para a obtenção de resultados a partir do *aCGH*. Esclarecidas todas as dúvidas, o consentimento para a realização do *aCGH* deve ser obtido (Vetro et al., 2012; Evangelidou et al., 2013).

O aconselhamento genético após o teste deve ser orientado de forma a diminuir ao máximo, o *stress* procedido dos resultados obtidos. Nesse aspeto, os mais difíceis de gerir são os resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, daí a importância de informar previamente os futuros pais da possibilidade de obter estas conclusões. Entretanto, ainda não existem orientações padrão sobre a forma como deve ser conduzido o aconselhamento genético após os resultados do *aCGH*. Contudo, nos estudos retrospectivos sobre a aplicação desta técnica no DPN, este processo tem sido gerido com sucesso e os casais têm compreendido em que circunstâncias estes testes são realizados, e quando chamados a decidir estão conscientes das suas limitações (Evangelidou et al., 2013; Rooryck et al., 2013; Vestergaard et al., 2013).

1.5.7. Comunicação entre o laboratório e o clínico

Face à complexidade dos resultados gerados por *aCGH*, é extremamente importante existir uma cooperação entre o laboratório e a clínica, de forma a equacionarmos sobre a informação a dar no relatório, nomeadamente sobre a possibilidade de relatar dados não

solicitados, como risco para doenças de gravidade conhecida ou imprevisível para o feto ou progenitores (Savage et al., 2011).

A clínica deve ter noção das técnicas disponíveis no laboratório, e qual a estratégia definida por este, em termos de sequência de utilização, de forma a discutir o seu aproveitamento no DPN. Também é importante que o laboratório informe a clínica sobre a relação entre as CNV's patogénicas detetadas e as anomalias fetais encontradas na ecográfica. Para tal, uma descrição pormenorizada das anomalias fetais deve acompanhar a amostra na sua chegada ao laboratório. A clínica deve comunicar qualquer informação adicional recolhida, mesmo após terem enviado a amostra e as respetivas indicações para o laboratório. Esta cooperação irá permitir uma melhor interpretação dos resultados do *aCGH* no DPN e conseqüentemente, a sua comunicação num período de tempo mais reduzido, contribuindo assim para a diminuição da ansiedade dos pais. Além disso, também permitirá que o aconselhamento genético dos mesmos seja feito de uma forma mais eficiente e clara, devido a troca e discussão de informações entre os dois prestadores de serviços (Savage et al., 2011; McGillivray et al, 2012; Vetro et al., 2012).

CAPITULO II

OBJETIVOS DO TRABALHO

2. Objetivos do trabalho

O *aCGH* tem sido apontado como uma alternativa à citogenética convencional na rotina do DPN, nomeadamente em casos com anomalias ecográficas. Assim, o principal objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade desta tecnologia como teste de rotina no DPN, em fetos com anomalias ecográficas. Este procedimento consistirá na relação dos resultados obtidos por *aCGH*, com os resultados obtidos pela citogenética convencional e com a literatura disponível.

Os estudos retrospectivos publicados acerca da aplicabilidade do *aCGH* no DPN têm apresentado diferentes estratégias quanto à sua análise e interpretação dos seus resultados. Deste modo, este trabalho também visa este ponto de forma a reduzir os resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, sem perder informação genómica clinicamente relevante. Além da capacidade de interpretação dos resultados, a aplicação do *aCGH* acarreta custos elevados, pelo que, o último objetivo será avaliar a sua relação custo-benefício no DPN.

CAPITULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Material biológico

As 22 amostras fetais incluídas neste estudo foram recebidas pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra entre Maio de 2010 e Abril de 2013 para a realização do DPN por citogenética convencional. Estas foram selecionadas para análise por *a*CGH pelo Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra. Das amostras fetais analisadas, 20 continham indicação de anomalias ecográficas associadas a um resultado normal por citogenética convencional. As restantes 2 amostras fetais continham a indicação da translucência da nuca aumentada e obtiveram, respetivamente, um resultado normal e um resultado anormal com a presença de um rearranjo cromossómico aparentemente equilibrado por citogenética convencional.

Tabela 3. Sistema envolvido em cada uma das anomalias fetais observadas nas ecografias relativas às 22 amostras de DPN.

Anomalias congénitas	Número de casos
Anomalias fetais isoladas	
Sistema nervoso central (SNC)	5
Sistema cardíaco	4
Sistema esquelético	2
Sistema renal	1
Sistema muscular	1
Múltiplas anomalias fetais	
SNC e sistema cardíaco	2
Sistema esquelético e sistema muscular	2
SNC e sistema esquelético	1
SNC, Sistema cardíaco e sistema esquelético	1
SNC, sistema cardíaco, sistema esquelético e sistema muscular	1
Sinais ecográficos de Alerta	
Translucência da nuca aumentada (TN>99)	2

3.2. Cultura celular

O estabelecimento de cultura celular com sucesso é um processo crucial para a obtenção de resultados por citogenética convencional, bem como para obtenção de DNA a partir de células para outras análises. Até as amostras de líquido amniótico (LA) ou vilosidades coriônicas (VC) serem processadas para a realização da cultura celular, estas devem ser mantidas à temperatura ambiente, uma vez que a sua exposição a temperaturas baixas ou elevadas pode comprometer o crescimento celular.

Tanto as culturas de LA como as de VC realizam-se através de dois procedimentos distintos, ambos usam meios de cultura diferentes e processados por técnicos especializados diferentes, seguindo as normas de qualidade internacionalmente implementadas.

A extração de DNA para a realização do *a*CGH foi efetuada a partir da cultura celular de LA e VC, inicialmente usada para a obtenção de células em metafase necessárias para o estudo por citogenética convencional.

3.2.1. Cultura de amniócitos

A cultura de amniócitos foi realizada segundo o protocolo adaptado e otimizado pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. De uma forma resumida, os amniócitos foram cultivados em 5 ml de meio completo Ham's F10 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califónia), suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califónia), 1% de L-glutamina 200 mM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califónia), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califónia) e 2 ml de AmnioMAX-II (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califónia), e em 5 ml de meio AmnioMAX-II (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califónia). Após a sementeira, ambas as culturas celulares são incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂, sendo posteriormente avaliado diariamente o seu crescimento celular após os primeiros 5 dias de cultura (Miron, 2001)

3.2.2. Cultura de vilosidades coriônicas

A cultura de VC foi realizada segundo o protocolo adaptado e otimizado pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. De um modo geral, inicialmente procede-se a uma separação das VC do tecido materno aderente e a sua lavagem com PBS1x (*Phosphate Buffered Saline*). Posteriormente, a cultura de VC é feita em 5 ml de meio completo Ham's F10 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califonia), suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califonia), 1% de L-glutamina 200 mM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califonia), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califonia) e 2 ml de AmnioMAX-II (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califonia), e em 5 ml de meio AmnioMAX-II (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califonia). Seguidamente, ambas as culturas celulares são incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂, sendo o crescimento celular avaliado após o terceiro dia de cultura (Jackson et al., 2001).

3.3. Extração e quantificação das amostras de DNA

Para a realização do *a*CGH é necessário obter uma quantidade mínima de DNA genómico puro, de ótica qualidade com uma concentração de 40 ng/μl.

No processo de extração de DNA, a partir da cultura celular de amniócitos ou VC, recorremos a um kit comercial, '*High Pure PCR Template Preparation Kit*' (*Version 20*, Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. De um modo geral, este procedimento consiste, numa fase inicial, na digestão química da amostra por ação da *proteinase K*, na presença do tampão de ligação, seguindo-se a recuperação dos ácidos nucleicos por precipitação com a adição de isopropanol. Através de um sistema de colunas de sílica, são removidos os inibidores dos ácidos nucleicos, procedendo-se posteriormente a sucessivas lavagens com tampão de lavagem. Por fim, o DNA foi eluído num tampão de eluição.

Para a quantificação do DNA procedeu-se à leitura da densidade ótica ou absorbância no comprimento de onda de 260 nm, utilizando um espectrofotómetro, o NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). A densidade ótica de 260 nm (DO₂₆₀)

corresponde ao pico de absorção de radiação ultravioleta (UVs) dos ácidos nucleicos. O NanoDrop 1000 quantifica o DNA de cadeia dupla de acordo com a lei de Lambert-Beer, em que a concentração de DNA vai ser proporcional à densidade ótica e ao coeficiente de extinção (que para o DNA de cadeia dupla é 50 ng.cm/μl), e inversamente proporcional à coluna criada no espectrofotômetro, sendo neste caso de 1 cm. O NanoDrop 1000 quantificou as amostras de DNA usando somente 1,5 μl de amostra, sem recorrer a diluições, sendo os resultados da concentração, bem como o grau de pureza fornecidos imediatamente. Também se procedeu a medição da densidade ótica a 280 nm (DO280) e a 230 nm (DO230), que correspondem ao pico de absorção de UVs das proteínas e dos contaminantes orgânicos, respetivamente. As razões de leitura realizada entre 260/280 nm (DO260/DO280) e 260/230 nm (DO260/DO230) fornecem o grau de pureza do DNA. Normalmente, as amostras DNA consideram-se puras quando possuem quocientes de DO260/DO280 entre 1,8 e 2,0 e valores de DO260/DO230 maiores que 2,0.

3.4. *Array-based comparative genomic hybridization (aCGH)*

O aCGH foi realizado utilizando um *Agilent human genome microarray 8x60K* (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA), representativo de todo o genoma, composto por sondas de oligonucleótidos com 60 mer. Esta plataforma de aCGH contém 60000 sondas de oligonucleótidos complementares a sequências genómicas codificantes e não codificantes de todo o genoma. Para esta plataforma de aCGH é necessária uma quantidade de DNA genómico entre 200 ng a 500 ng para um volume final de 13 μl. Sempre que necessário perfez-se o volume final com água *nuclease-free* (Promega corporation, Wisconsin, USA).

A técnica de aCGH foi realizada conforme as instruções do fabricante: *Oligonucleotide Array-based CGH for Genome DNA Analysis protocol (Version 7.2*, Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA). O procedimento desta tecnologia está subdividido, numa fase inicial, em três etapas principais, que consistem na marcação fluorescente, hibridização e *scanning* das amostras de DNA. Seguidamente, as imagens obtidas pelo *scanner* são processadas e sujeitas a uma avaliação, que engloba diversos parâmetros de

qualidade, de forma a verificar se podem prosseguir para análise e interpretação dos resultados.

3.4.1. Marcação, hibridização e *scanning*

3.4.1.1. Marcação do DNA genómico com fluorocromos

Os corantes fluorescentes utilizados na marcação do DNA genómico no *aCGH* foram Cy5 (Vermelho) para a amostra em estudo e Cy3 (Verde) para a amostra controlo. A marcação foi feita recorrendo a um *kit* comercial, ‘*Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit*’ (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA). Através deste *kit*, os fluorocromos Cy são incorporados nas moléculas de DNA através de uma reação enzimática usando *primers* aleatórios e a polimerase *Exo-Klenow*. Resumidamente, as amostras em estudo foram marcadas com fluorocromos Cy5-dUTP (1 mM) e as amostras controlo com fluorocromos Cy3-dUTP (1 mM). A marcação foi feita com a adição de uma mistura de marcação ao DNA genómico que, para além do respetivos fluorocromos, continha água *nuclease-free* (Promega corporation, Wisconsin, USA), *Buffer5x*, *dNTP10x* e enzima *Exo-Klenow* (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA), seguida da incubação das amostras. O passo seguinte consistiu numa purificação do DNA genómico marcado utilizando filtros Amicon 30KDa (Milipore, Massachusetts, USA) e TE1x (pH 8,0) (Promega corporation, Wisconsin, USA). No final desta operação procedeu-se a uma liofilização das amostras através do SpeedVac, para a obtenção de um volume de 9,5 µl de DNA genómico marcado. Seguidamente, as amostras de DNA genómico marcado foram sujeitas a uma quantificação no NanoDrop 1000, através do qual foram avaliadas as suas concentrações, a incorporação dos fluorocromos e o grau de marcação da atividade específica. Por fim, procedeu-se à combinação das duplas caso-controlo, obtendo-se um volume final 16 µl.

3.4.1.2 Hibridização

Inicialmente, na preparação das amostras para a hibridização, ao tubo contendo a dupla de DNA genómico caso-controlo marcados com Cy5 e Cy3, respetivamente, foi

adicionada uma mistura de hibridização constituída por Cot-1 DNA (1mg/ml) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califonia), *Agilent 10x Blocking Agent* e *Agilent 2x Hi-RPM buffer* (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA). Posteriormente, cada mistura contendo o DNA em estudo e o DNA controlo foram colocadas na respetiva área do *Agilent human genome microarray 8x60K*. A hibridização ocorreu durante 24 horas a 65°C no forno de hibridização (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA) com uma rotação de 20 rpm. Decorrida a hibridização, procedeu-se a lavagem das lâminas com *Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 e 2*, durante 5 minutos à temperatura ambiente e durante 5 minutos a 37°C, respetivamente.

3.4.1.3 Scanning e processamento das imagens obtidas

O *scanning* das lâminas foi realizado com o *scanner* de *microarrays* de DNA G2565ca (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA). Posteriormente, as imagens obtidas foram processadas através do *software feature extraction v10.7* (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA). Este *software* permitiu converter os valores de intensidade de sinal associados com os *pixels* individuais da imagem de *aCGH* digitalizada em intensidades de sinal processadas para cada sonda, tendo em conta o *background* fluorescente, bem como a atribuição de valores para uma sonda específica e a respetiva localização genómica. Os dados obtidos pelo *aCGH* também foram sujeitos a um processo de normalização *Lowess* pelo *software*, de modo a corrigir os rácios do \log_2 , principalmente na predisposição para a incorporação de corante fluorescente. Assim, permitiu-se remover uma possível influência da intensidade e dos fluorocromos utilizados nos resultados (Allemeersch et al., 2009; Brady e Vermeesch, 2012).

O *background* das intensidades de sinal deve ser o mais reduzido possível, ao longo de todo o *microarray*, uma vez que pode influenciar as leituras de *background* para Cy3 e/ou Cy5, afetando o processamento dos sinais fluorescentes e portanto, o cálculo do *log Ratio* (LR). A sensibilidade e especificidade vão estar dependentes deste valor logaritmo para a distinção de uma deleção ou duplicação no número de cópias normal diplóide. O LR pode ser influenciado pela presença de artefactos de hibridização e de lavagem que surge tipicamente com fluorescência verde, afetando a leituras dos valores de Cy3. Assim, um dos aspetos a ter em conta nesta etapa é a presença de artefactos de hibridização e lavagem, como por exemplo, os presentes na figura 4. As causas para

estes artefactos podem variar amplamente (Brady e Vermeesch, 2012; Vermeesch et al., 2012).

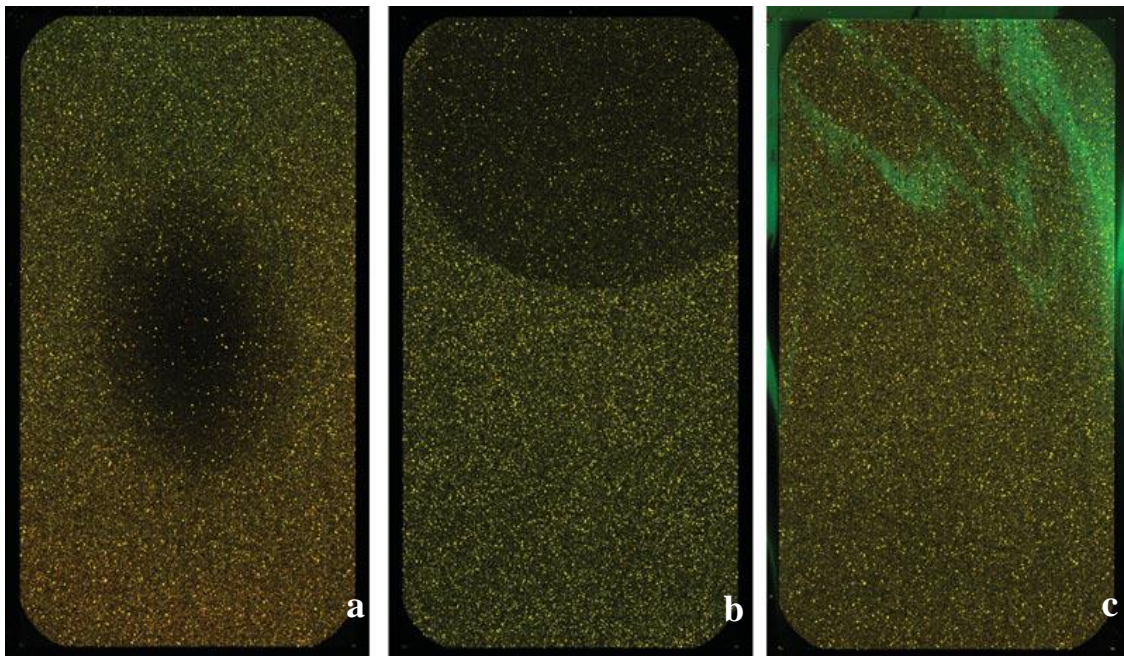


Figura 4. Imagens de *microarrays* exibindo artefactos de hibridização e lavagem. Na imagem a e b, os artefactos resultam de grandes bolhas de ar, durante o processamento das amostras para a co-hibridação. É visível uma hibridização menor nas regiões mais escuras, resultantes da bolha de ar. Na imagem c estão presentes os artefactos típicos de lavagem (Adaptado de Vermeesch et al., 2012).

3.4.1.4 Controlo de qualidade

Antes de se proceder à análise e interpretação dos resultados procedeu-se a avaliação de vários parâmetros para verificar a qualidade dos resultados. Um importante parâmetro avaliado nos resultados obtidos por *aCGH* foi o desvio de padrão (SD) do rácio de intensidade do LR para as regiões com número de cópias semelhantes. Este foi medido como o *derivative log ratio spread* (DRLS). Quanto mais elevado for o SD, maior será a informação perdida, tornando mais difícil a análise exata da informação obtida. Outro parâmetro importante tido em consideração foi o *dynamic range*, uma vez que a identificação do número de cópias genómicas presentes deve ser feita o mais próximo possível dos valores teóricos (ex.: $\log_2 1/2 = -1$ para as deleções e $\log_2 3/2 = 0,58$ para as duplicações). Este dois parâmetros de qualidade, estão dependentes da qualidade de

DNA, bem como de outras variáveis técnicas, incluindo os artefactos resultantes de uma má hibridização e/ou das condições de lavagem (Allemeersch et al., 2009; Brady e Vermeesch, 2012; Vermeesch et al., 2012).

3.5. Análise e interpretação dos resultados do *aCGH*

A análise e interpretação das CNV's obtidas através das amostras analisadas por *aCGH* foi feita de acordo com a classificação adotada pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para análise e interpretação das CNV's no diagnóstico pós-natal. Este consiste na classificação das CNV's encontradas em quatro classes, tendo por base os parâmetros presentes na tabela 4. Este sistema de classificação tem em consideração as regiões associadas às síndromes de microdeleção ou microduplicação, os genes codificantes conhecidos e as alterações genómicas sobreponíveis reportadas na DGV até ao momento da análise, sendo que a baixa frequência considerada na classe IIIA e IIIB foi limitada a três alterações genómicas reportadas na DGV sobreponíveis com a alteração genómica encontrada. Para esta classificação apenas foram consideradas as CNV's com o mínimo de três ou mais sondas consecutivas alteradas. Numa segunda fase as CNV's encontradas foram classificadas como sendo benignas, patogénicas ou de significado clínico incerto ou desconhecido. As CNV's inicialmente classificadas como classe I ou Classe IV foram consideradas patogénicas e benignas, respetivamente. Relativamente às CNV's presentes na Classe II e Classe IIIA/B foram sujeitas a uma análise caso-a-caso de forma a classificar a sua patogenicidade como benigna, patogénica ou de significado clínico incerto ou desconhecido. Para esta classificação foi tido em consideração a hereditariedade da CNV encontrada, o tamanho da CNV, o tipo de alteração (deleção ou duplicação), a presença de genes codificantes conhecidos, principalmente os registados na base de dados do *OMIM Morbid Map* e as CNV's sobreponíveis presentes nas bases de dados DECIPHER e ISCA, bem como os fenómenos de haploinsuficiência e penetrância incompleta. Numa terceira fase, as CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido foram tidas em consideração segundo duas estratégias: na primeira considerou-se as CNV's com o mínimo de oito sondas consecutivas alteradas, enquanto que, na segunda estratégia apenas se considerou as CNV's inferiores a 400 Kb, caso

estivessem associadas as anomalias fetais presentes na ecografia. Por fim, fez-se uma comparação entre estas duas estratégias de modo a perceber qual a que apresentava menor percentagem de resultados com significado clínico incerto ou desconhecido sem perda de CNV's patogénicas.

Tabela 4. Sistema de classificação das CNV's obtidas por *a*CGH adoptado pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para o diagnóstico pós-natal.

Classes	Parâmetros de classificação
Classe I	Deleção ou duplicação em região associada a síndrome de microdeleção ou microduplicação.
Classe II	Deleções ou duplicações que não estão descritas na DGV até à presente data e envolvem genes codificantes conhecidos.
Classe IIIA	Deleções ou duplicações que, até à presente data, estão reportadas em baixa frequência na DGV ou não são totalmente sobreponíveis com as descritas na DGV.
Classe IIIB	Deleções ou duplicações que, até à presente data, estão reportadas em baixa frequência na DGV ou não são totalmente sobreponíveis com as descritas na DGV, não envolvendo genes codificantes conhecidos.
Classe IV	Deleções ou duplicações reportadas em indivíduos normais na DGV.

3.6. Validação dos resultados

Nos casos analisados com resultado normal por citogenética convencional, nos quais foram detetadas CNV's superiores a 3 Mb na análise pelo *a*CGH de oligonucleótidos com 60K, efetuou-se uma revisão do estudo citogenético.

CAPITULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e discussão

A média da idade materna das amostras fetais analisadas por *aCGH* foi de 30,6 anos, variando entre 16 e 40 anos de idade. Das 22 amostras de DNA fetal analisadas, 12 (12/22, 54.5%) foram obtidas a partir da amniocentese entre as 14 e as 24 semanas de gestação e 10 (10/22, 45.5%) através da biópsia de vilosidade coriônicas entre as 11 e as 14 semanas de gestação. Deste grupo faziam parte 8 amostras, que em adição à indicação de anomalias ecográficas ou sinais ecográficos de alerta, apresentavam também idade materna avançada.

Todos os casos analisados possuíam a quantidade e a qualidade mínima de DNA necessária para a realização do *aCGH*. Contudo, em 3 (13,6%) amostras de DNA fetal não foi possível obter resultados interpretáveis (tabela 5), pelo que foram excluídas deste estudo. A sua exclusão deveu-se ao facto de apresentarem um valor de DRLS elevado ($DRLS \geq 0.28$) e valores do *dynamic range* muito afastados dos valores teóricos, não cumprindo os parâmetros de qualidade necessários para um diagnóstico. Estes parâmetros de qualidade indicam alterações ao nível da fluorescência que afetam a especificidade e sensibilidade do *aCGH*, podendo levar a resultados falsos negativos ou positivos.

Tabela 5. 3 Casos que apresentaram resultados inconclusivos através da análise por *aCGH*.

Caso	Amostra fetal	Idade Materna	Anomalias ecográficas	Cariótipo
3	LA	37	Ventriculomegalia fetal	46, XY
4	LA	34	Quistos plexos coróides	46, XY
19	VC	32	Espinha Bífida, malformações cardíacas e malformações nas mãos	46, XY

LA - líquido amniótico; VC - vilosidades coriônicas.

Um dos fatores que pode contribuir para valores elevados de DRLS e para a heterogeneidade do *dynamic range* é a existência de artefactos técnicos provenientes da hibridização ou da lavagem. Estes problemas podem ter ocorrido também a uma escala muito reduzida e deste modo, não terem sido visualizados nesta etapa de controlo de

qualidade. Outro fator que pode afetar a qualidade dos resultados obtidos por *aCGH* é facto de o DNA ter sido extraído através do material fetal após a cultura celular, em que a presença de contaminantes ou inibidores provenientes do meio de cultura celular podem afetar a qualidade do DNA (Vermeesch et al., 2012).

Por último, um dos fatores que também pode estar associado à má qualidade destes 3 resultados é o tempo de criopreservação das amostras de DNA provenientes da cultura celular, uma vez que as 3 amostras de DNA estiveram sujeitas a um longo período de armazenamento. De um modo geral, verificou-se que a qualidade dos resultados obtidos a partir das amostras de DNA criopreservadas foi melhor nos casos em que estas foram sujeitas a um menor período de criopreservação. Tais princípios são apoiados por Filges e colaboradores, uma vez que também verificaram que, geralmente, a qualidade do DNA fetal extraído está dependente do período de armazenamento e é menor do que o DNA extraído a partir de material fetal fresco. Perante as adversidades que possam resultar do processo de cultura celular, nomeadamente, problemas de qualidade nos resultados de *aCGH* obtidos, é notório que a aplicação do *aCGH* diretamente do material fetal não cultivado é a estratégia mais vantajosa. Além disso, a utilização direta do material biológico permite obter um resultado por *aCGH* num período de tempo mais reduzido do que a citogenética convencional, que é dependente da cultura celular, reduzindo assim, o tempo de espera dos progenitores e os problemas de ansiedade que daí possam surgir (Filges et al., 2012; Scott et al., 2013).

A maioria dos casos de DPN analisados por *aCGH* (11/19, 57.9%) apresentaram resultados variáveis mas todos associados a um fenótipo normal (Tabela 6). As alterações observadas nos 11 casos estavam associadas a CNV's benignas (10/19, 52,6%) ou sem quaisquer CNV presente (1/19, 5,3%). Na sua maioria, as CNV's benignas encontradas tinham tamanhos inferiores a 0,5 Mb, estando de acordo com estudos relativos a polimorfismos genéticos existentes numa população normal (Gijssbers et al., 2011; Vermeesch et al., 2012).

Nos restantes 8 casos analisados, em 2 casos (2/19, 10,5%) foram detetadas CNV's classificadas como patogénicas (tabela 7) e em 6 casos (6/19, 31,6%) foram detetadas CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido (tabela 8). Nos 2 casos em que foram detetadas CNV's patogénicas, o caso 11 apresentava anomalias ecográficas e um resultado citogenético normal, e o caso 20 tinha a translucência da nuca aumentada (superior ao percentil 99), idade materna avançada e era portador de uma translocação

reciproca *de novo* aparentemente equilibrada.

Tabela 6. 11 Casos que apresentaram resultados normais através da análise por *aCGH*.

Caso	Amostra fetal	Idade Materna	Anomalias ecográficas	Cariótipo
2	LA	22	Rim precoce	46,XY
7	LA	31	Malformação cardíaca	46,XX
8	LA	20	Cardiopatia complexa: <i>truncos arteriosus</i>	46,XX
10	LA	31	Pé boto bilateral, edema subcutâneo e edema da mucosa	46,XX
12	LA	35	Ventrículo esquerdo hipoplásico	46,XY
13	VC	40	Higroma quístico, hidrúpsia fetal e gemelar bicoriônico	46,XY
15	VC	31	Síndrome polimalformativa: fenda labial, <i>Ectopia cordis</i> , onfolocelo e pé boto	46,XY
17	VC	36	Higroma cístico, sacos jugulares, onda A invertida e derrame pleural	46,XX
18	VC	39	Malformações nos membros inferiores	46,XX
21	VC	22	TN>99	46,XY
22	VC	28	Higroma cístico cervical	46,XX

LA - Líquido amniótico; VC - Vilosidades coriônicas; TN>99 - Tanslucência da nuca superior ao percentil 99.

A elevada percentagem de CNV's patogénicas detetadas por *aCGH* (10,5%) demonstra que esta tecnologia pode fornecer um enorme contributo quando aplicada no DPN. A utilização do *aCGH* neste estudo retrospectivo permitiu detetar uma percentagem importante de desequilíbrios genómicos que estão associados a um fenótipo anormal, e que não seriam detetados caso a citogenética convencional fosse o único teste realizado. Assim, a tecnologia de *aCGH* demonstra uma maior capacidade na deteção de desequilíbrios genómicos, quando comparada com a citogenética convencional, fruto do seu elevado poder de resolução. Além disso, a informação adicional, resultante da aplicação do *aCGH*, poderá ter um papel importante no processo de aconselhamento genético dado aos progenitores, uma vez que fornecerá aos médicos um conjunto de dados adicionais igualmente importantes que, após a explicação dos mesmos e esclarecimento de todas as dúvidas aos progenitores, podem orientar uma tomada de

decisão mais consistente acerca da gravidez, já que podem influenciar o fenótipo previsto (Savage et al., 2011; Vetro et al., 2012; Evangelidou et al., 2013). Exemplo disso é o caso 20 em que foi detetado um rearranjo aparentemente equilibrado *de novo* e posteriormente, através do *aCGH* se verificou que não era equilibrado e apresentava perdas de material genético. Assim, o *aCGH* permitiu uma melhor caracterização deste mesmo rearranjo, proporcionando deste modo uma melhor previsão do fenótipo ou da gravidade da doença.

Englobando apenas os casos com a presença de anomalias ecográficas e com um resultado normal por citogenética convencional, a taxa de deteção por *aCGH* foi de 5,9 % (1/17). Esta percentagem na deteção de CNV's patogénicas foi semelhante à obtida no estudo de Wapner e Shaffer no grupo de casos com características semelhantes, sendo estas de 6% e 6,2%, respetivamente (Wapner et al., 2012; Shaffer et al., 2012b). A percentagem de 5,9% também é suportada por Vetro e colaboradores, uma vez que também referem que esta varia aproximadamente entre 6-8% nos grupos com elevado risco para ter uma cromossomopatia (Vetro et al., 2012). Além disso, tendo em conta as taxas de deteção de CNV's patogénicas por *aCGH* em casos com anomalias ecográficas e cariótipo normal de todos os estudos retrospectivos presentes na tabela 2 do Capítulo I, a taxa de deteção de CNV's patogénicas neste estudo apresentou valores intermédios face ao intervalo das percentagens obtidas. No entanto, este tipo de comparações apresenta como fatores limitantes o facto de entre os diversos estudos serem utilizadas diferentes tipos de plataformas de *aCGH* com diferentes resoluções, que em alguns casos variam dentro do próprio estudo, a ausência de padrões para a análise e interpretação dos resultados e o número bastante variável de amostras que são processadas em cada estudo retrospectivo para aplicação do *aCGH* no DPN. Porém não existe nenhuma dúvida que o *aCGH* proporciona um aumento importantíssimo na taxa de deteção de CNV's patogénicas quando aplicado no DPN. Este ganho é resultado do seu elevado poder de resolução face à citogenética convencional, uma vez que grande percentagem das CNV's que resultam num impacto patogénico para o fenótipo, possuem um tamanho inferior ao limite de resolução da citogenética convencional.

O elevado poder de resolução do *aCGH* na deteção de desequilíbrios genómicos torna esta técnica um potencial substituto da citogenética convencional como teste de rotina no DPN, nomeadamente nos casos com indicação de anomalias ecográficas, onde o risco de o feto possuir um desequilíbrio genómico é mais elevado. Tal estratégia irá

permitir a obtenção de informação importante para o DPN, que será fundamental no aconselhamento genético e na avaliação do risco de alterações fenotípicas. Além disso, o facto de o *a*CGH não requerer cultura celular, irá permitir a obtenção de um resultado num período de tempo mais reduzido, em comparação com a citogenética convencional, o que evitará uma maior ansiedade dos pais, que por vezes gera um impacto negativo na gestação (Savage et al., 2011; Vetro et al., 2012). No entanto, apesar do *a*CGH albergar estas duas vantagens importantíssimas, que sem dúvida melhorariam o DPN, a dificuldade de interpretação e análise dos resultados obtidos por esta técnica têm colocado entraves e discussão sobre a sua aplicação no DPN. Para esta situação, contribuem essencialmente os resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, que são na sua maioria devido à pouca experiência existente quanto à utilização do *a*CGH para a deteção de CNV's no DPN (Vetro et al., 2012).

Relativamente aos casos com CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido analisados neste estudo, todos tinham indicação de anomalias ecográficas e todos obtiveram previamente um resultado normal através da citogenética convencional. Além disso, os casos 5 e 16 também apresentavam a indicação de idade materna avançada. A taxa de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido detetadas pelo *a*CGH foi extremamente elevada, pelo que colocaria em dúvida a sua utilização no DPN. A existência deste tipo de resultados é a maior limitação desta técnica no DPN, até porque, aumenta não só a ansiedade dos pais como pode levar a decisões menos adequadas, podendo até culminar com a interrupção médica da gravidez. No entanto, a elevada taxa de resultados com significado clínico incerto ou desconhecido deveu-se, em grande parte, à indisponibilidade de análise dos progenitores através do *a*CGH, o que dificulta bastante a interpretação dos resultados obtidos por esta técnica, uma vez que saber se um desequilíbrio genómico encontrado numa amostra fetal é herdado a partir de um dos progenitores ou é *de novo*, é crucial para a sua classificação como patogénico ou benigno, já que a probabilidade de um desequilíbrio genómico herdado provocar uma alteração fenotípica patogénica é de aproximadamente 0,0001%. Isto é, apesar de existir, a possibilidade de uma alteração herdada afetar negativamente o fenótipo correspondente, essa possibilidade é praticamente nula, pelo que esta informação é importantíssima, e uma das mais relevantes para a classificação de uma CNV (Fiorentino et al., 2011).

Uma percentagem de 12,2% de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido, detetada por *aCGH* foi reportada por D'Amours e colaboradores. Tal como no presente estudo, esta elevada percentagem deveu-se principalmente à indisponibilidade das amostras de DNA dos progenitores, o que não permitiu classificar a hereditariedade das CNV's detetadas (D'Amours et al., 2011). Segundo o mesmo estudo, acreditava-se que a percentagem de casos com CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido sofresse uma diminuição significativa caso tivesse sido possível a análise dos respetivos pais por *aCGH*. Pela mesma razão, uma diminuição em 11% nos resultados com significado clínico incerto ou desconhecido foi também verificada no estudo realizado por Evangelidou e colaboradores. Assim, será crucial que amostra de material fetal para análise por *aCGH* venha sempre acompanhada com uma amostra de sangue em EDTA de ambos os progenitores. Esta situação já levou autores a considerarem que a recolha de uma amostra de sangue de ambos os progenitores dever ser um pré-requisito para a implementação do *aCGH* no DPN. Tal estratégia irá facilitar a análise e interpretação dos resultados no DPN e evitar a ansiedade dos pais que resultaria, de uma posterior recolha de uma amostra de sangue de ambos (Evangelidou et al., 2010; Vetro et al., 2012; Scott et al., 2013).

Como todos os casos analisados no nosso estudo tinham sido sujeitos, previamente, a uma análise por citogenética convencional, foi excluída a presença de qualquer poliploidia, já que caso existissem teriam sido detetadas através desta técnica. No entanto, a não deteção de poliploidias é uma das limitações inerentes ao *aCGH*, sendo outro fator que coloca em causa a sua aplicação como teste de primeira linha no DPN. A deteção deste grupo de alterações cromossómicas é importantíssimo para um bom DPN, uma vez que resultam na morte fetal e deste modo, devem ser detetadas num período precoce da gestação. Porém existem técnicas moleculares com um custo reduzido como a qf-PCR e a FISH, que permitem uma deteção rápida de todo o tipo de poliploidias. Perante estas condições, a aplicação de uma das técnicas em conjunto com o *aCGH* é visto como uma alternativa, já que são técnicas simples, rápidas e baratas. Esta alternativa já foi testada com eficiência por Scott e colaboradores, quando utilizaram no seu estudo retrospectivo o *aCGH* e a técnica de biologia molecular qf-PCR em simultâneo, para a deteção de cromossomopatias no DPN em detrimento da citogenética convencional. Apesar de esta estratégia ser uma alternativa, torna o custo do DPN mais elevado, apesar de o qf-PCR ser uma técnica de custo reduzido, uma vez que por si só a

análise de CNV's por *aCGH* tem um custo bastante elevado face à citogenética convencional. No entanto, é de prever que a aplicação do *aCGH* na rotina do DPN seja feita com o auxílio de técnicas com um custo reduzido que permitam a deteção de poliploidias (Hillman et al., 2012; Scott et al., 2013).

Em todos os casos analisados por ambas as técnicas não foi detetado nenhum mosaísmo. Tanto o *aCGH* como a citogenética convencional apresentam limitações na deteção deste grupo de alterações cromossómicas. O motivo, que faz com que *aCGH* não detete mosaísmos com uma expressão inferior a 10% é que, os dados obtidos são sujeitos a um processo de normalização dos rácios de \log_2 , de modo a corrigir a predisposição do DNA para a incorporação do corante fluorescente, a fim de evitar a presença de resultados falsos positivos. Por sua vez, a deteção de um mosaísmo através da citogenética convencional está dependente do número de células em metafase analisadas, bem com a experiência do técnico que procede a análise, pelo que podem não ser detetados mosaísmos com uma expressão superior a 10% (Evangelidou et al., 2013; Brady e Vermeesch, 2012).

Tabela 7. 2 Casos que apresentaram desequilíbrios cromossômicos associados a um fenótipo patogénico através do *aCGH*.

Caso	Amostra fetal	Idade Materna	Anomalias ecográficas	Cariótipo	Resultado do <i>aCGH</i>	Tipo e tamanho da alteração	Genes
11	LA	30	Restrição de crescimento intra-uterino	46,XX	arr[hg19]10q26.3 (210,300-7,857,198)x1	Deleção de 4,3 Mb	42 Genes envolvidos
					arr[hg19]11p15.5-p15.4(210,300-7,857,198)x3	Duplicação de 7,6 Mb	216 Genes envolvidos
20	VC	38	TN>99	46,XY,t(6;7)(p25;q21.1) <i>dn</i>	arr[hg19]6p25.2-p25.1(2,916,893-4,952,320)x1	Deleção de 2,0 Mb	18 Genes envolvidos
					arr[hg19]6q13-q14.1(74,331,521-76,321,358)x1	Deleção de 1,99 Mb	<i>SLC17A5, CD109, COL12A1, COX7A2, TMEN30A, FILIP1, LOC100506804, SENP6</i>
					arr[hg19]15q26.2-26.3(98,001,002-98,527,322)x1	Deleção de 0,52 Mb	<i>ARRDC4, LOC91948</i>

LA - Líquido amniótico; VC - Vilosidades coriônicas; Mb - Megabases; hg19 - Versão 19 do genoma humano; TN>99 - Translucência de nuca superior ao percentil 99.

Tabela 8. 6 Casos que apresentaram desequilíbrios genômicos com significado clínico incerto ou desconhecido para o fenótipo.

Caso	Amostra fetal	Idade Materna	Anomalias ecográficas	Cariótipo	Resultado do aCGH	Tipo e tamanho da alteração	Genes
1	LA	21	Comunicação interventricular e quistos plexos coroides	46,XX	arr[hg19]18q21.3 1 (54,687,950-55,071,340)x4	Amplificação de 0,38 Mb	<i>WDR7, BOD1L2, LINC-ROR, ST8SIA3</i>
5	LA	35	Ventrículo cerebral em forma de gota e agenesia de corpo caloso	46,XX	arr[hg19]10p15.3 (1,168,803-1,690,800)x3	Duplicação de 0,52 Mb	<i>WDR37, ADARB2, LINC00200, ADARB2-AS1</i>
6	LA	26	Holoprocéfalos	46,XY	arr[hg19]6q27 (166,298,237-166,579,349)x1	Deleção de 0,28 Mb	<i>T, LINC00473, LINC00602</i>
9	LA	33	Cardiopatias graves	46,XX	arr[hg19]18q23 (76,903,814-77,063,633)x3	Duplicação de 0,16 Mb	<i>ATP9B</i>
14	VC	16	Onfalocelo volumoso	46,XY	arr[hg19]4q28.31 (38,128,986-138,812,274)x1	Deleção de 0,68 Mb	<i>PCDH18</i>
16	VC	36	Excesso de parede abdominal e angulação da coluna	46,XY	arr[hg19]19q13.4 3 (57,349,301-57,351,566)x3	Duplicação de 0,002 Mb	<i>ZIM2, PEG3</i>

LA - Líquido amniótico; VC - Vilosidades coriônicas; Mb - Megabases; hg19 - Versão 19 do genoma humano.

4.1. Descrição dos casos com um resultado patogénico

A classificação das CNV's patogénicas detetadas por *a*CGH teve em consideração o tipo de alteração encontrada (deleção ou amplificação), o tamanho do desequilíbrio genómico, os genes envolvidos e as CNV's sobreponíveis com as presentes nas bases de dados e os respetivos fenótipos. Todas as CNV's patogénicas identificadas nos casos analisados por *a*CGH eram superiores 1,9 Mb, apresentavam genes codificantes conhecidos e nenhuma teria sido possível detetar pela citogenética convencional.

Caso 11

A avaliação ecográfica identificou um feto com restrição de crescimento intra-uterino. A análise por citogenética convencional das metafases obtidas a partir da cultura de LA, mostrou um resultado normal 46,XX (figura 5).

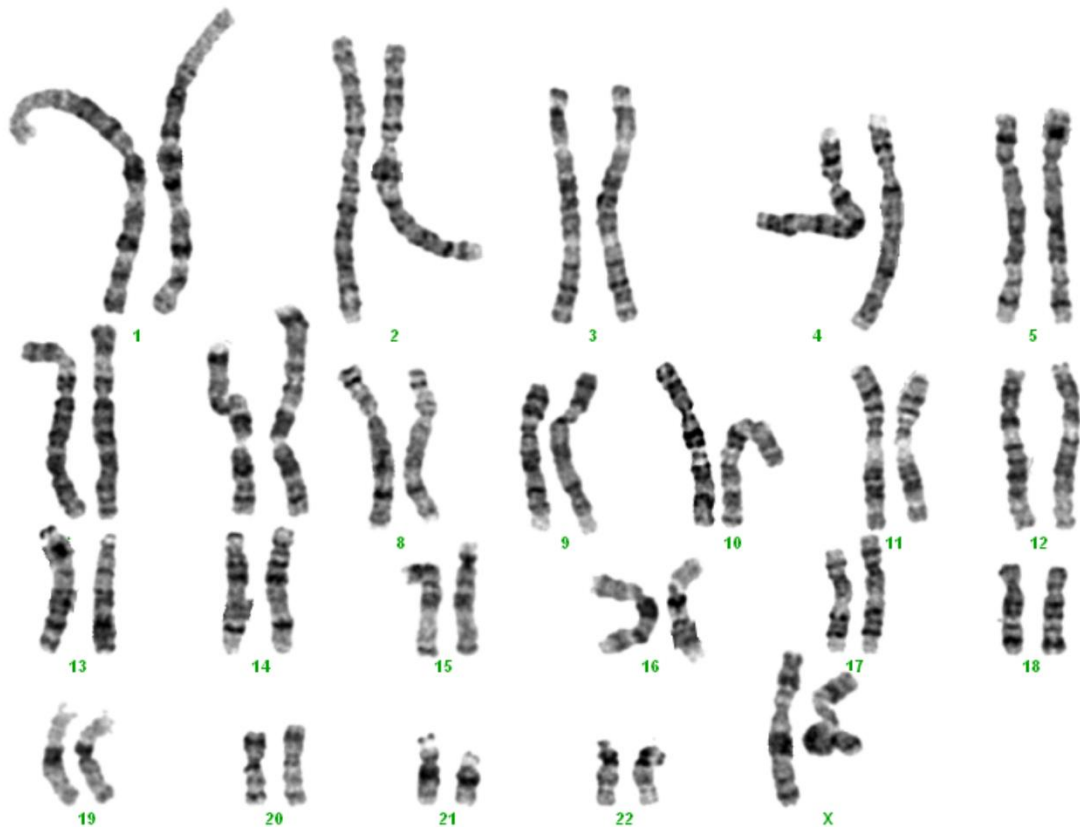


Figura 5. Cariótipo 46,XX obtido através da técnica de bandagem GTG correspondente ao feto com restrição de crescimento intra-uterino (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

A análise por *a*CGH de oligonucleótidos com 60K revelou uma deleção terminal no braço longo do cromossoma 10(q26.3), entre as posições nucleotídicas 131,058,396 e 135,421,826 numa extensão de 4,363,431 pb, arr[hg19] 10q26.3(131,058,396-135,421,826)x1 (figura 6).

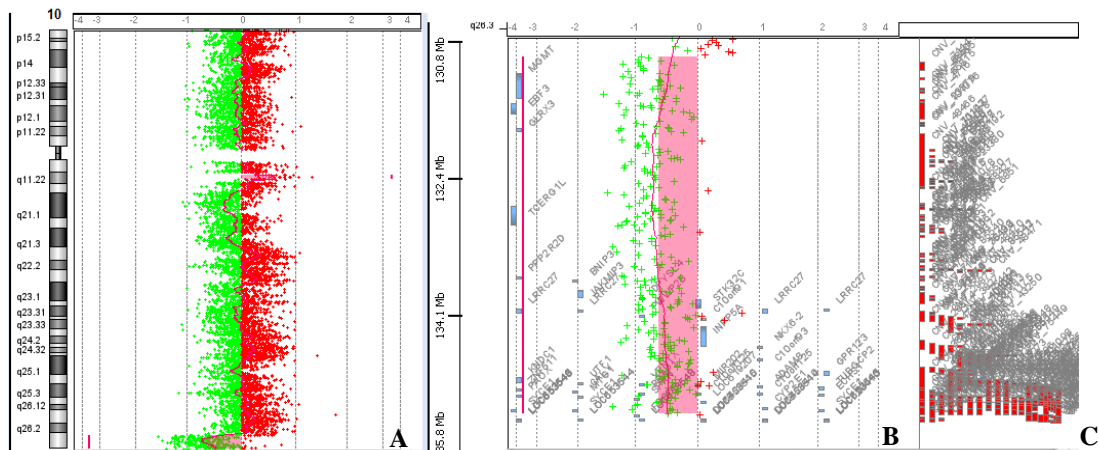


Figura 6. A - Perfil de *a*CGH para o cromossoma 10, representando a deleção de 4.3 Mb em 10q26.3; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

Segundo *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly*, este desequilíbrio genómico de 4.3 Mb envolve 42 genes conhecidos. Na base de dados DECIPHER existem vários pacientes descritos com uma deleção sobreponível envolvendo esta região, associados a fenótipos de défice cognitivo e vários dismorfismos. O mesmo se sucede na base de dados ISCA, na qual se encontram pacientes descritos com deleções sobreponíveis à deleção presente em 10(q26.3) classificadas como patogénicas e com impacto no fenótipo. Em adição, na base dados DGV não existe nenhuma CNV descrita em indivíduos normais envolvendo toda esta região terminal do cromossoma 10. Tendo em conta o tamanho da deleção, a quantidade de genes envolvidos e as CNV's presentes nas bases de dados DECIPHER e ISCA, a deleção terminal presente em 10(q26.3) foi classificada como patogénica.

A análise por *a*CGH de oligonucleótidos com 60K revelou ainda uma duplicação terminal no braço curto do cromossoma 11(p15.5p15.4), entre as posições nucleotídicas 210,300 e 7,857,198 numa extensão de 7,646,899 pb. A duplicação arr[hg19] 11p15.5p15.4(210,300-7,857,198)x3 envolve 216 genes conhecidos presentes no *UCSC*

Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly, dos quais 26 encontram-se reportados no OMIM Morbid Map, por estarem associados a patologias (figura 7).

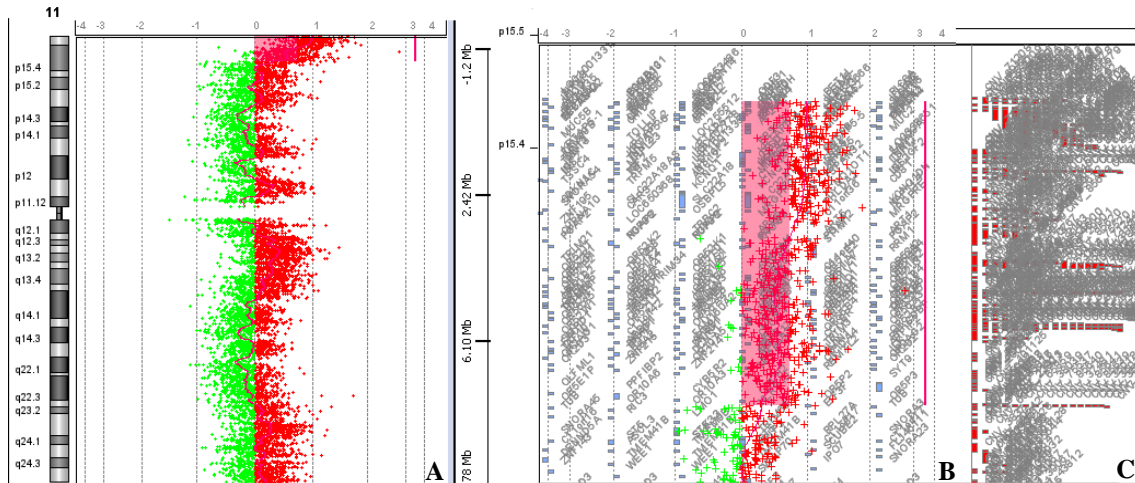


Figura 7. A - Perfil de *aCGH* para o cromossoma 11, representando a duplicação de 7.6 Mb em 11p15.5-p15.4; B - Constituição génica do segmento envolvido na duplicação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

Na base de dados DECIPHER estão descritos vários pacientes com uma duplicação sobreponível a esta e com fenótipos associados a défice cognitivo e vários dismorfismos. Na base de dados ISCA também estão reportados pacientes que contêm uma duplicação sobreponível, associadas a um fenótipo patogénico. Ao nível da DGV não existe numa CNV envolvendo toda esta região terminal do cromossoma 11, o que é de esperar, tendo em conta o seu tamanho e a quantidade de genes codificantes nela presente. Assim, esta duplicação envolvendo a região terminal do braço curto do cromossoma 11(p15.5p15.4) foi classificada como sendo patogénica para o fenótipo. O cariótipo molecular final deste feto é 46,XX. arr[hg19] 10q26.3(131,058,396 - 135,421,826)x1,11p15.5p15.4(210,300-7,857,198)x3.

Posteriormente, os desequilíbrios detetados no estudo realizado por *aCGH* neste caso permitiram direcionar o estudo dos progenitores por citogenética molecular FISH com as sondas subteloméricas para os cromossomas envolvidos nos desequilíbrios cromossómicos. A análise pela técnica FISH das metafases obtidas através da cultura sincronizada de linfócitos de sangue periférico, revelou que o pai não apresentava

desequilíbrios genômicos similares ao do feto, e juntamente com a citogenética convencional verificou-se que tinha um cariótipo normal 46,XY. Contrariamente, a análise cromossômica da mãe por citogenética convencional e FISH das metafases obtidas a partir da cultura sincronizada de linfócitos de sangue periférico, revelou um cariótipo do sexo feminino portador de uma translocação críptica recíproca 46,XX.ish t(10;11)(q26.3-,p15.5+;p15.5-,q26.3+)(D10S2290-,D11S2071-;D11S2071-,D10S2290+) (figura 8). Assim, verificou-se que a mãe era portadora de uma translocação recíproca entre as regiões terminais do braço longo do cromossoma 10(10q) e o braço curto do cromossoma 11(11p).

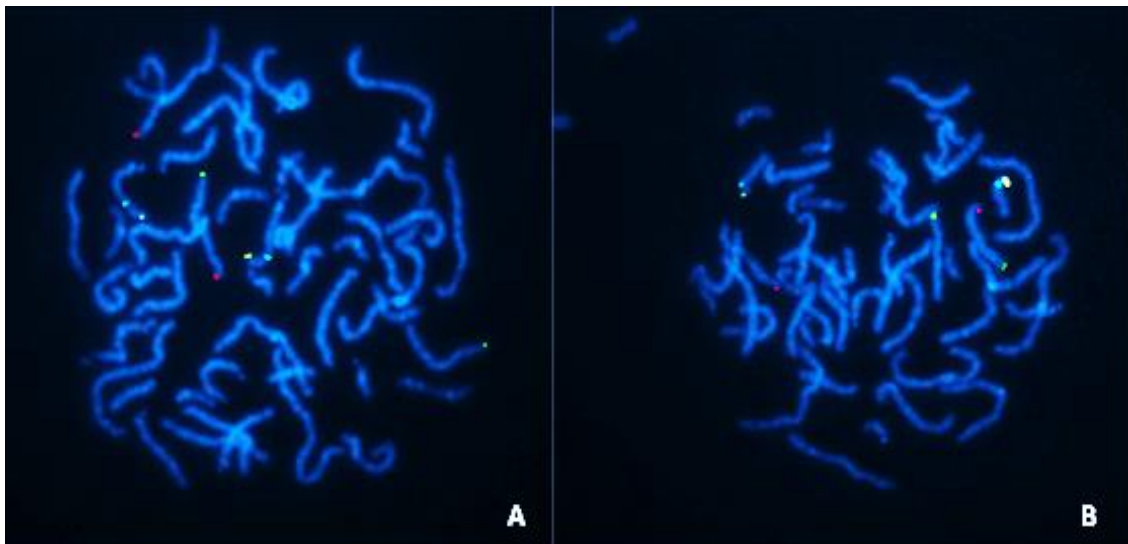


Figura 8. FISH em metafases com a t(10;11). A - Sondas com referência M10 (Totalvysion – Vysis, Abbott Molecular): a sonda verde marca o *locus* 10PTTEL006, do cromossoma 10p15.3, a sonda vermelha corresponde ao *locus* D10S2290 do cromossoma 10q26.3, a sonda amarela marca o *locus* D15S936 do cromossoma 15q26.3 e a sonda aqua hibridiza na região q24.1 do cromossoma 15; B - Sondas com referência M11 (Totalvysion – Vysis, Abbott Molecular): a sonda verde marca o *locus* D11S2071, do cromossoma 11p15.5, a sonda vermelha marca ao *locus* D11S1037 do cromossoma 11q25, a sonda amarela corresponde ao *locus* D18S552 do cromossoma 18q11.32 e a sonda aqua marca o centrômero do cromossoma 18 (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

Este rearranjo cromossómico não afeta o fenótipo da mãe, mas pode afetar o fenótipo da descendência através de desequilíbrios genómicos resultantes de segregações anómalas, adjacentes -1 ou -2 ou 3:1 durante a gametogénese, como se sucedeu neste caso, em que o feto herdou um cromossoma derivativo do cromossoma 10 da mãe.

Apesar da extensão dos desequilíbrios genómicos detetados no caso 11, estes não eram detetáveis por citogenética convencional, sendo que o DPN foi dado como normal. Tal facto deveu-se as alterações, agora identificadas, estarem associadas a um rearranjo críptico envolvendo bandas e padrões semelhantes na citogenética convencional. O mesmo não se sucederia, caso o *aCGH* fosse o teste realizado no DPN, uma vez que a deteção de desequilíbrios genómicos é feita de modo quantitativo e seu poder de deteção é muito superior. Neste caso, o *aCGH* além de detetar alterações que não eram detetáveis por citogenéticas convencional, permitiu direccionar o estudo dos progenitores para outras técnicas moleculares com um custo mais reduzido.

Caso 20

O caso 20 era um feto com tanslucência da nuca superior ao percentil 99 e mãe com idade materna avançada. Na presença destas duas indicações, o feto foi sujeito a uma análise por citogenética convencional das metafases obtidas a partir da cultura de vilosidades coriónicas, que revelaram um cariótipo do sexo masculino com uma translocação recíproca *de novo* com pontos de quebra em 6(p25) e 7(q21.1), 46,XY,t(6;7)(p25;q21.1) *dn* (figura 9A).

Uma vez que a região do cromossoma 6(p25) envolvida na translocação presente no caso 20 era terminal, foi avaliada a região subtelomérica através da citogenética molecular FISH (6PTEL, Totalvysion – Vysis, Abbott Molecular), que confirmou a sua integridade (Figura 9B). Assim, esta translocação foi considerada aparentemente equilibrada, não sendo, no entanto, possível a exclusão da presença de um desequilíbrio críptico.

Como ambas as técnicas citogenéticas não conseguiram excluir a presença de desequilíbrios crípticos, uma amostra de DNA fetal deste caso foi submetida à análise por *aCGH*. Além disso, o facto de o ponto de quebra 6(p25) ser uma região terminal do cromossoma 6, apesar de o estudo das suas subteloméricas já ter sido realizado pela técnica FISH e de estudos revelarem que 40% dos rearranjos cromossómicos

aparentemente equilibrados, identificados por citogenética convencional, não são realmente equilibrados motivaram a realização do *aCGH* neste caso (Fiorentino et al.,2011). Contudo, se o rearranjo cromossômico detetado por citogenética convencional fosse verdadeiramente equilibrado, não seria detetável por *aCGH* e deparar-nos-íamos com uma das suas limitações.

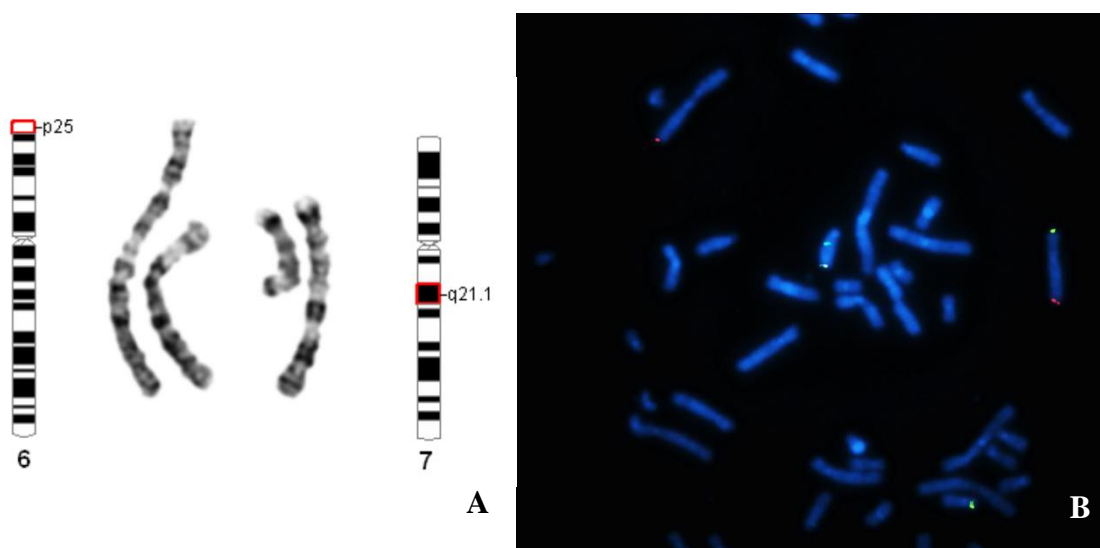


Figura 9. A - Translocação recíproca *de novo* aparentemente equilibrada, presente no feto do caso 20 detetada através da técnica de bandagem GTG, que envolve o braço curto do cromossoma 6 e o braço longo do cromossoma 7 com pontos de quebra em 6(p25) e 7(q21.1), respetivamente. B - Resultado da técnica FISH que confirma a integridade do rearranjo: a sonda verde marca o *locus* 6PTEL, a sonda vermelha corresponde ao *locus* VIJyRM2158 e a sonda controlo amarela marca o *locus* VIJyRM2002 do cromossoma 13q (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

O estudo por *aCGH* de oligonucleótidos com 60K do DNA fetal deste caso revelou que o rearranjo cromossômico detetado através da análise por citogenética convencional, de facto não era equilibrado. Este revelou que a translocação cromossômica apresentava um desequilíbrio genético, na mesma banda citogenética de um dos pontos de quebra, inferior ao limite de resolução da citogenética convencional, numa região não coberta pelas sondas usadas na técnica FISH para o estudo das regiões subtelo méricas do cromossoma 6 envolvido na translocação. O *aCGH* também detetou mais 2 desequilíbrios no genoma do feto analisado, que não eram detetáveis por citogenética convencional.

A análise por *a*CGH de oligonucleótidos 60K, portanto revelou uma deleção terminal no braço curto do cromossoma 6(p25.2-p25.1), entre as posições nucleotídicas 2,916,893 e 4,952,320 numa extensão de 2,035,428 pb (figura 10). De acordo com o *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly*, o desequilíbrio genómico, arr[hg19] 6p25.2p25.1(2,916,893-4,952,320)x1 envolve 18 genes conhecidos descritos nas bases de dados OMIM. Dos genes pertencentes a esta região deletada, encontram-se reportados no OMIM *Morbid Map*, os genes *SERPINB6* e *TUBB2B* por estarem associados a patologias.

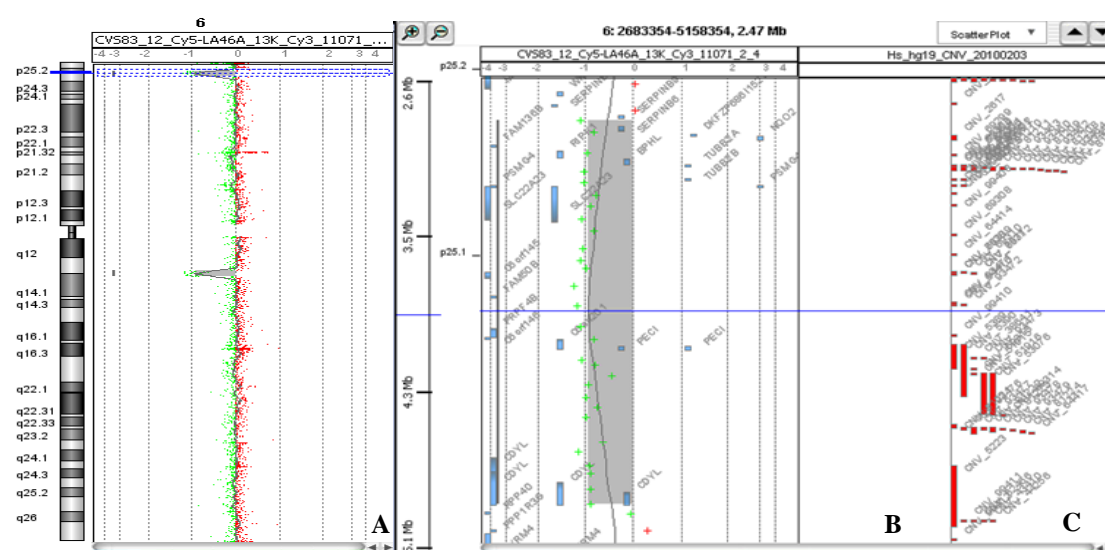


Figura 10. A - Perfil de *a*CGH para o cromossoma 6, representando a deleção de 2.0 Mb em 6p25.2-p25.1; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

O gene *SERPINB6* é expresso nas células ciliadas da crista da orelha interna durante o desenvolvimento embrionário, e também na idade pós-natal. A sua mutação resulta na ausência completa da expressão do transcrito ou na sua alteração estrutural, que por sua vez está associada a uma perda auditiva congénita, que pode ser progressiva e dependente da idade (McKusick, 1993). O transcrito do gene *TUBB2B* é uma das β -tubulinas presente na estrutura dos microtúbulos. A sua mutação ou ausência é apontada como sendo a causa da polimicrogiria simétrica e assimétrica. A polimicrogiria é uma malformação no desenvolvimento cerebral, caracterizada pelo excessivo número de convulsões sobre a superfície cerebral, que podem estar distribuídas de modo generalizado ou em determinadas zonas cerebrais. As crianças que nascem com esta

doença podem também sofrer um amplo espectro de outros problemas adicionais, tais como, outras anomalias cerebrais, déficit cognitivo, disfunções motoras, deficiências ao nível do desenvolvimento global, problemas respiratórios e problemas ao nível da fala. Notoriamente, todos os pacientes descritos no OMIM *Morbid Map*, em que uma alteração no gene *TUBB2B* foi descrita como sendo a causa da polimicrogiria, apresentavam outras deficiências, principalmente ao nível do sistema nervoso central (Hartz, 2009; Guerrini et al., 2012).

Ao nível da base de dados DGV, a deleção arr[hg] 6p25.2p25.1(2,916,893-4,952,320)x1 não apresenta nenhuma CNV totalmente sobreponível, apenas apresenta CNV's parcialmente sobreponíveis em pequenas regiões da mesma. Por sua vez, na base de dados DECIPHER e ISCA estão descritos vários pacientes com CNV's sobreponíveis. No entanto, o tamanho das CNV's descritas nas bases de dados DECIPHER e ISCA são substancialmente superiores, pelo que não foi possível comparar a sua patogenicidade. Mesmo não sendo possível uma comparação com os casos reportados nas bases de dados DECIPHER e ISCA, a deleção do cromossoma 6 foi classificada como sendo patogénica, tendo em consideração a ausência de CNV's totalmente sobreponíveis descritas na DGV para a região envolvida, o tamanho do desequilíbrio, e a presença de um número considerável de genes codificantes conhecidos, em especial os genes *SERPINB6* e *TUBB2B*, que segundo o OMIM *morbid Map* estão associados a patologias. No entanto, esta análise teria de ser confirmada pelo estudo dos pais a partir do aCGH ou por outras técnicas de biologia molecular como o MLPA, através do uso de um painel de sondas direcionado para esta região.

A análise por aCGH ainda revelou uma deleção no braço longo do cromossoma 6(q13-q14.1), entre as posições nucleotídicas 74,331,521 e 76,321,358 com uma extensão de 1,989,428 pb (figura 11). Segundo o UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (*GRCh37/hg19*) Assembly, o desequilíbrio genómico arr[hg19] 6q13q14.1(74,331,521-76,321,358)x1 envolve os genes *SLC17A5*, *CD109*, *COL12A1*, *COX7A2*, *TMEN30A*, *FILIP1*, *LOC100506804* e *SENP6*.

O gene *SLC17A5* é o único reportado na base de dados OMIM *Morbid Map* como associado a uma doença no armazenamento de ácido siálico livre ou doença Salla. Esta é uma doença ao nível do armazenamento lisossómico em que, o gene *SLC17A5* codifica transportadores vesiculares excitatórios de aminoácidos que, quando presentes nas vesículas sinápticas do sistema nervoso central, são responsáveis pelo

armazenamento vesicular e posterior libertação dos neurotransmissores. Quando presentes nos lisossomas agem como um exportador de ácido siálico. As doenças no armazenamento de ácido siálico são neurodegenerativas autossômicas recessivas, e podem apresentar-se de uma forma infantil severa ou numa forma adulta lentamente progressiva. Estas apresentam como principais sintomas hipotonia, ataxia cerebelar, défice cognitivo e visceromegalias (McKusick et al., 1999; Biancheri et al., 2005).

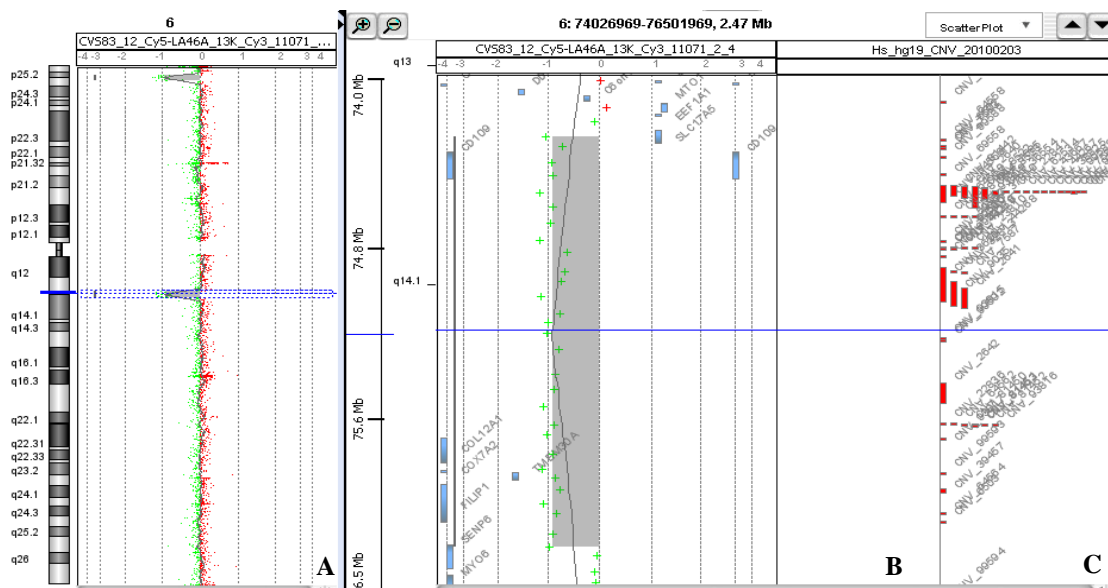


Figura 11. A - Perfil de aCGH para o cromossoma 6, representando a deleção de 1.99 Mb em 6q13-q14.1; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

Na base de dados DGV não se encontra reportada nenhuma CNV totalmente sobreponível a esta deleção, existindo apenas CNV's sobreponíveis a pequenas regiões deste desequilíbrio genómico. Esta deleção não foi comparada com as deleções sobreponíveis existentes nas bases de dados DECIPHER e ISCA, já que apresentava uma extensão significativamente inferior. Contudo, tendo em consideração o tipo de alteração, o seu tamanho, e os genes codificantes conhecidos envolvidos, foi classificada como sendo patogénica. Também é de referir que as deleções arr[hg19] 6q13q14.1(74,331,521-76,321,358)x1 e arr[hg] 6p25.2p25.1(2,916,893-4,952,320)x1 detetadas no DNA fetal do caso 20 envolvem um único cromossoma, afetando uma extensão considerável do mesmo, que por sua vez está envolvido numa translocação recíproca *de novo* e que segundo a citogenética convencional era aparentemente

equilibrada. Assim, neste caso o *a*CGH permitiu uma melhor caracterização do rearranjo cromossômico detetado, uma vez que identificou perda de material genético em um dos cromossomas envolvidos na translocação, o que não seria possível apenas com a citogenética convencional e a citogenética molecular FISH.

Ainda no caso 20, o *a*CGH de oligonucleótidos com 60K também revelou uma deleção na região terminal do braço longo do cromossoma 15(q26.2-q26.3), entre as posições nucleotídicas 98,001,002 e 98,527,322 numa extensão de 526,321 pb (figura 12).

De acordo com *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly*, a deleção *arr[hg19] 15q26.2q26.3(98,001,002-98,527,322)x1* envolve os genes *LOC91948* e *ARRDC4*. Apenas o gene *ARRDC4* é codificante, mas a sua função é ainda desconhecida.

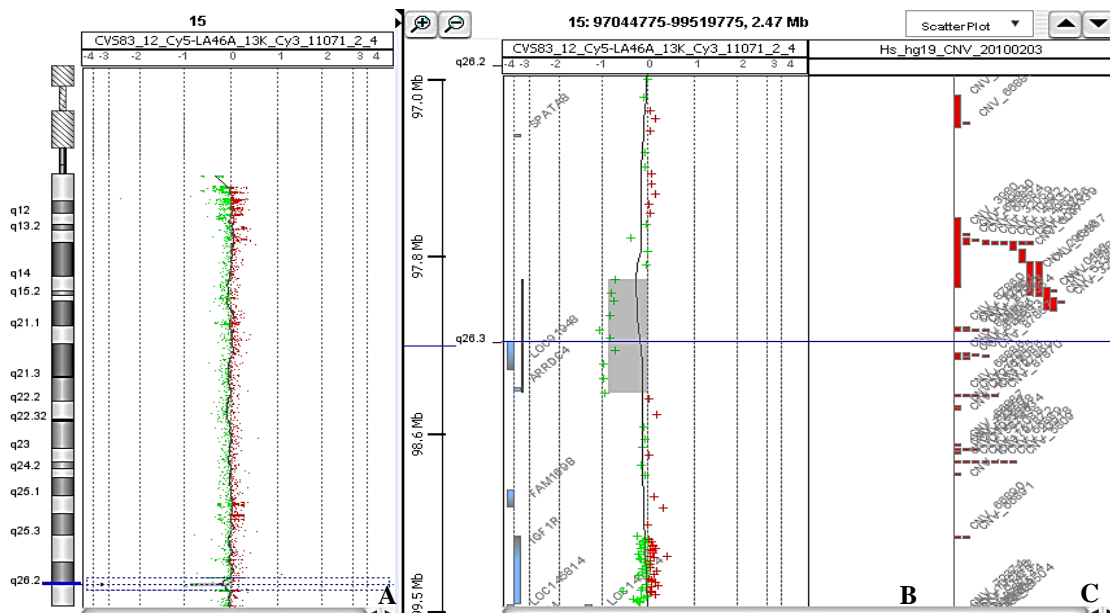


Figura 12. A - Perfil de *a*CGH para o cromossoma 15, representando a deleção de 0.53 Mb em 15q26.2-q26.3; B - Constituição gênica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

Na base de dados DGV, apenas se encontra descrito uma baixa frequência de CNV's parcialmente sobreponíveis a esta deleção presente na região terminal do braço longo do cromossoma 15(q26.2-q26.3). A sua comparação não foi possível com as deleções sobreponíveis presentes nas bases de dados DECHIPER e ISCA, já que todas apresentavam um tamanho superior a 6 Mb. Assim, a deleção *arr[hg19] 15q26.2q26.3(98,001,002-98,527,322)x1* foi classificada como sendo de significado

clínico incerto ou desconhecido, já que tendo em conta o seu tamanho, os genes envolvidos e a informação disponível nas bases de dados consultadas não foi possível definir se esta provocaria alguma alteração fenotípica.

A análise do DNA fetal do caso 20 por *aCGH* permitiu uma melhor caracterização da translocação recíproca *de novo* detetada por citogenética convencional através da deteção de desequilíbrios genómicos que de outro modo não seriam detetáveis. Isto resultaria num DPN diferente do fornecido pelas técnicas de citogenética convencional e FISH utilizadas neste diagnóstico, uma vez que a informação adicional fornecida pelo *aCGH* foi importante para a previsão do fenótipo. Neste caso, em que foram detetadas CNV's patogénicas e uma CNV com significado clínico incerto ou desconhecido, o estudo dos progenitores por *aCGH* seria importante para um melhor interpretação do resultado, principalmente na CNV classificada como sendo de significado clínico incerto ou desconhecido.

4.2. Descrição dos casos com um resultado de significado clínico incerto ou desconhecido

Nos casos analisados, todas as CNV's classificadas como sendo de significado clínico incerto ou desconhecido apresentavam genes codificantes conhecidos e eram inferiores a uma extensão de 0,7 Mb, pelo que não eram detetáveis por citogenética convencional. Abaixo estão descritos os casos que apresentaram um resultado de significado clínico incerto ou desconhecido.

Caso 1

A análise ecográfica identificou um feto com comunicação interventricular e quisto plexos coroides, pelo que foi sujeito a uma análise por citogenética convencional das metafases obtidas a partir da cultura de LA, que revelou um cariótipo normal 46,XX. Posteriormente, a análise do DNA fetal por *aCGH* de oligonucleótidos com 60K revelou uma amplificação no braço longo do cromossoma 18(q21.31), entre as posições nucleotídicas 54,687,950 e 55,071,340 numa extensão de 383,391 pb, arr[hg19]

18q21.31(54,687,950-55,071,340)x4 (figura 13). Até à presente data, na base de dados DGV não se encontrava descrito nenhuma CNV totalmente sobreponível a esta amplificação detetada por *a*CGH. A sua comparação não foi possível com as CNV's sobreponíveis presentes nas bases de dados DECHIPER e ISCA, uma vez que apresentavam uma extensão significativamente superior.

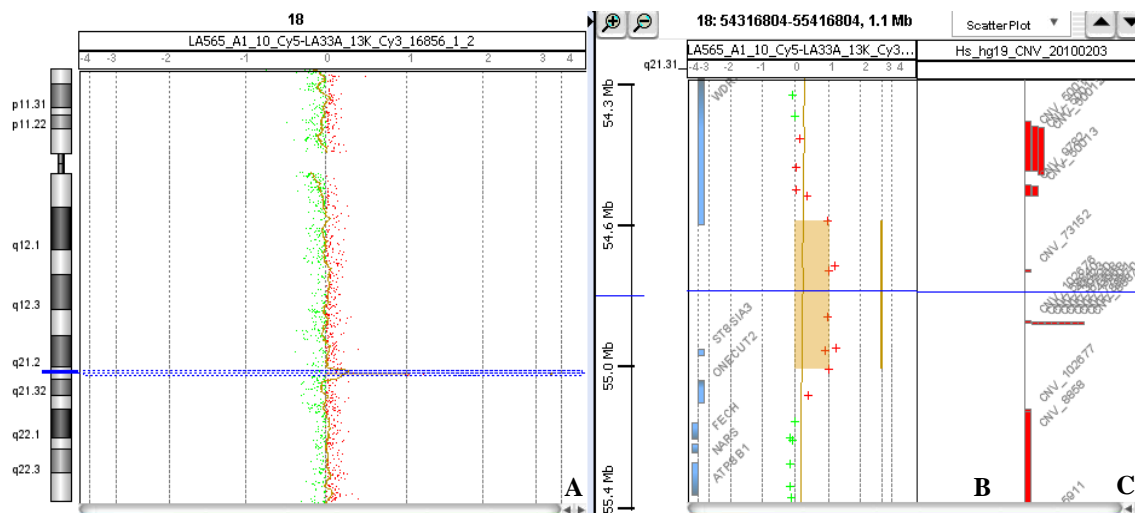


Figura 13. A - Perfil de *a*CGH para o cromossoma 18, representando a amplificação de 0.38 Mb em 18q21.31; B - Constituição génica do segmento envolvido na amplificação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

Segundo *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly*, o desequilíbrio genómico arr[hg19] 18q21.31(54,687,950-55,071,340)x4 envolve os genes conhecidos *WDR7*, *LINC-ROR*, *BODIL2* e *ST8SIA3*. O gene *WDR7*, também conhecido por Rabconnectin-3 beta, é um gene altamente conservado e é membro da família de proteínas de repetição *WD*. A proteína Rabconnectin-3 beta liga-se diretamente com a proteína Rab3A GDP/GTP e indiretamente com a proteína ativada Rab3A GDP/GTP. Estas proteínas são reguladoras de Rab3 que esta envolvido no controlo da exocitose dependente de cálcio dos neurotransmissores (Hartz, 2010; van Diepen et al., 2011). O gene *LINC-ROR* é um longo RNA não codificante regulador do *splicing* de mais de 200 nucleótidos de comprimento Este também funciona como supressor tumoral da p53 em resposta ao DNA danificado (Hartz, 2013). Por sua vez o gene *BODIL2*, também conhecido por gene putativo da biorientação dos cromossomas na divisão celular, tem sido proposto a sua participação no ciclo celular, nomeadamente

no processo de divisão celular e mitose (Porter et al., 2007). Por último, o gene ST8SIA3 pertence à família das sialiltransferases que formam ligações *sialyl-alpha-2-8-sialyl-R* nos terminais não redutores dos gliconjugados (Hartz, 2005).

Os desequilíbrios genómicos distais no braço longo do cromossoma 18 são pouco frequentes e exibem diferentes manifestações, que vão desde o défice cognitivo, atraso no desenvolvimento e vários dismorfismos. No geral, o tamanho do desequilíbrio cromossómico pode estar correlacionado com a gravidade do fenótipo. Isto dificulta a previsão do fenótipo resultante da CNV presente no feto do caso 20, uma vez que apresenta uma extensão na ordem dos 0,38 Mb e os resultados publicados estão baseados em estudos citogenéticos padrão, pelo que os desequilíbrios distais detetados no braço longo do cromossoma 18 são de uma extensão muito superior e não estão caracterizados ao nível molecular. Também não foi possível verificar a hereditariedade da CNV detetada, o que dificulta ainda mais a previsão do fenótipo resultante. (Ceccarini et al., 2007; van Diepen et al., 2011). No entanto, é de referir, que já foi descrita uma deleção intersticial *de novo* no braço longo do cromossoma 18(q21.21) com uma extensão de 797 Kb, envolvendo os genes *WDR7* e *TXNLI*. O paciente com esta alteração apresentava um quadro clínico mais complexo. Esta variação está de acordo com a relação deleção-duplicação, em que a última tem geralmente um fenótipo mais atenuado (van Diepen et al., 2011). Assim, a amplificação detetada por *aCGH* no braço longo do cromossoma 18(q21.21) foi classificada como sendo uma CNV de significado clínico incerto ou desconhecido, uma vez que não foi possível prever o fenótipo resultante.

Caso 5

O caso 5 é o de um feto de uma senhora com idade materna avançada, e que na ecografia foi detetado um ventrículo cerebral em forma de gota e agenesia do corpo caloso. Na presença destas indicações, o feto foi sujeito a uma análise por citogenética convencional das metafases obtidas a partir da cultura de LA, que revelaram um cariótipo normal do sexo feminino 46,XX.

Posteriormente, a análise do DNA fetal por *aCGH* de oligonucleótidos com 60K revelou uma duplicação na região terminal do braço curto do cromossoma 10(p15.3), entre as posições nucleotídicas 1,168,803 e 1,690,800 numa extensão de 521,998 pb,

arr[hg19] 10p15.3(1,168,803-1,690,800)x3 (figura 14).

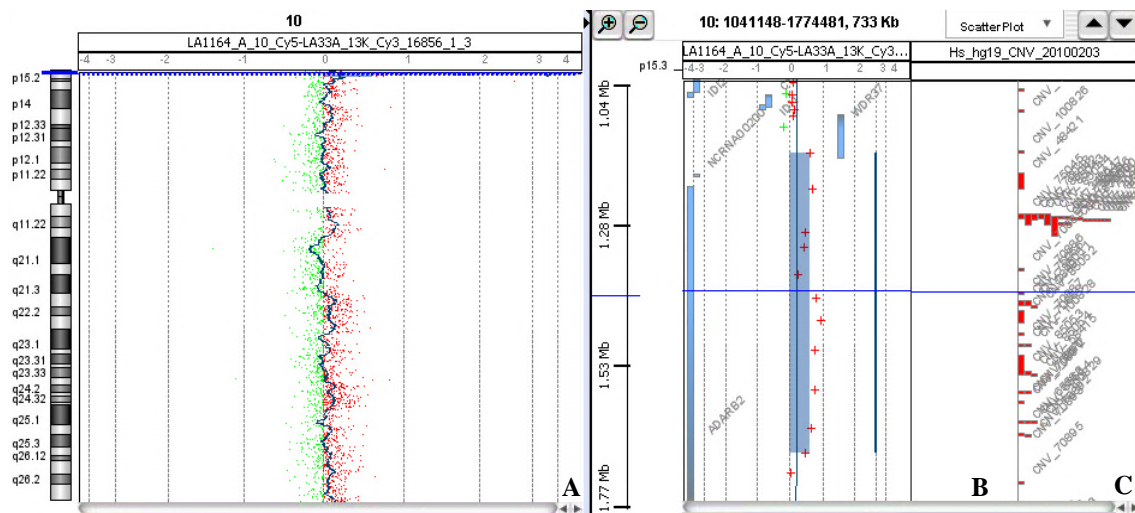


Figura 14. A - Perfil de *a*CGH para o cromossoma 10, representando a duplicação de 0.52 Mb em 10p15.3; B - Constituição génica do segmento envolvido na duplicação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

Segundo *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly*, esta duplicação com o tamanho de 0,52 Mb envolve os genes conhecidos *WDR37*, *LINC00200*, *ADARB2*, *ADARB2-AS1*. O gene *WDR37* é altamente conservado e codifica um membro da família de proteínas de repetição *WD*. As proteínas desta família estão envolvidas numa grande variedade de processos celulares, que incluem a progressão do ciclo celular, a transdução de sinal, o processo de apoptose e a regulação de genes. O gene *ADARB2* codifica um membro da família das adenosinas deaminase de RNA de cadeia dupla que podem desempenhar um papel regulador no RNA *editing*. Finalmente, os genes *LINC00200* e *ADARB2-AS1* são RNA's não codificantes, sendo que o último é um RNA *antisense* do gene *ADARB2*.

A duplicação detetada por *a*CGH envolvendo a região terminal do braço curto do cromossoma 10(p15.3) não se encontra descrita na base de dados DGV, existindo apenas pequenas CNV's parcialmente sobreponíveis, pelo que foram excluídas. As duplicações nesta região terminal do cromossoma 10(p15) estão, geralmente, associadas a anomalias no SNC, défice cognitivo e atraso de desenvolvimento, o que coincide com as anomalias encontradas na análise ecográfica do feto do caso 20 (Dabir e Hultén, 2011).

Segundo as bases de dados ISCA e DECIPHER, a sua maioria estão descritas com base em estudo citogenéticos padrão, apresentando uma extensão muito superior à detetada neste caso e envolvendo muito mais genes conhecidos. Contudo, na base de dados DECIPHER, está descrito uma paciente com uma duplicação sobreponível com uma extensão de 2.93 Mb envolvendo 8 genes codificantes conhecidos, para além dos genes *WDR37* e *ADARB2*. Porém, o fenótipo deste paciente não se encontra descrito na bases de dados, e não foi estudada a hereditariedade do desequilíbrio genómico detetado. Ainda na base de dados DECIPHER, está descrito um paciente com uma duplicação sobreponível, envolvendo os genes *WDR37*, *ADARB2* e mais quatro genes conhecidos, com uma extensão de aproximadamente 0.80 Mb, que apresentava crises convulsivas tónico-clónica generalizadas. No entanto, este paciente também apresentava uma deleção no braço longo do cromossoma 7, numa extensão de 0.51 Mb envolvendo o gene *CNTNAP2* descrito na base de dados OMIM *Morbid Map*, que pode justificar o fenótipo, uma vez que o gene *CNTNAP2* tem sido referido como causador da síndrome displasia cortical - epilepsia focal. Ambas as alterações foram herdadas de pais normais (McKusick, 1986).

Com base na informação recolhida acerca da duplicação detetada por *aCGH* na região terminal do braço curto do cromossoma 10(p15.3), não foi possível prever o fenótipo resultante, pelo que foi classificada como sendo uma CNV de significado clínico incerto ou desconhecido. Mesmo com o estudo da hereditariedade, a sua classificação como patogénica ou benigna seria difícil, por via dos fenómenos de haploinsuficiência e prenenência incompleta dos genes codificantes envolvidos.

Caso 6

A análise ecográfica no caso 6 identificou um feto com holoprosencefalia. A análise por citogenética convencional das metafases obtidas a partir da cultura de LA, revelaram um cariótipo normal do sexo masculino 46,XY.

Posteriormente, a análise do DNA fetal por *aCGH* de oligonucleótidos com 60K revelou uma deleção na região terminal do braço longo do cromossoma 6(q27), entre as posições nucleotídicas 166,298,237 e 166,579,349 numa extensão de 281,113 pb, arr[hg19] 6q27(166,298,237-166,579,349)x1 (figura 15).

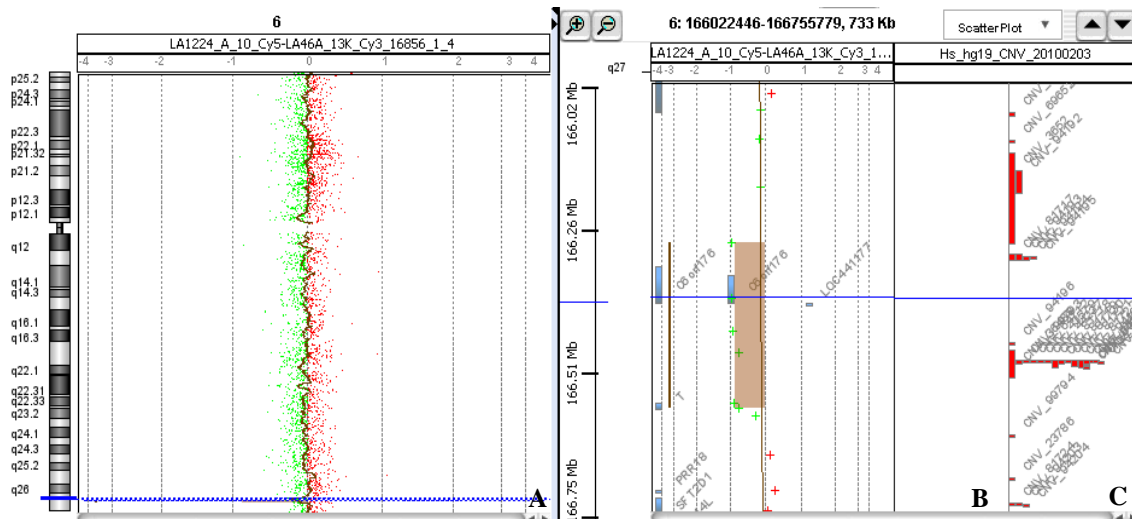


Figura 15. A - Perfil de aCGH para o cromossoma 6, representando a deleção de 0.28 Mb em 6q27; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

De acordo com o *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly*, esta deleção envolve os genes, *LINC00473*, *LINC00602* e *T*, dos quais apenas o último se encontra reportado na base de dados *OMIM Morbid Map*, como associado a uma patologia. A sequência do gene *T* é altamente conservada, e o seu transcrito é vital para a formação e diferenciação da mesoderme posterior bem como para o desenvolvimento axial em todos os vertebrados, enquanto que os genes *LINC00473* e *LINC00602* são RNA's não codificantes (McKusick, 1996). A ausência ou mutação do gene *T* está reportada na base de dados *OMIM Morbid Map* por estar associada a defeitos no tubo neural. É a partir desta estrutura embrionária que se inicia o desenvolvimento do SNC sendo que, cada uma das regiões do tubo neural dá origem às diferentes estruturas do SNC, incluindo o prosencéfalo, no qual a anomalia foi detetada, uma vez que a holoprosencefalia é uma malformação cerebral que resulta da divisão defeituosa do prosencéfalo (McKusick et al., 1996; Dubourg et al., 2007; Gerber et al., 2011).

Na base de dados DGV, existem apenas pequenas CNV's parcialmente sobreponíveis à deleção arr[hg19] 6q27(166,298,237-166,579,349)x1. Deleções na região terminal do braço longo do cromossoma 6(q26-q27) estão geralmente associadas a diversas anomalias cerebrais e défice cognitivo (Gerber et al., 2011), o que pode ser comprovado através da base de dados DECIPHER, uma vez que a maioria dos pacientes descritos

apresentam anomalias ao nível do SNC e défice cognitivo. O mesmo se sucedeu neste caso, já que na análise ecográfica foi detetada uma malformação cerebral. Contudo, tanto os pacientes relatados na base de dados DECIPHER como na base de dados ISCA apresentam deleções sobreponíveis à detetada por *a*CGH no caso 6, mas só que com uma extensão muito superior, pelo que não é possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo.

A deleção detetada na região terminal do cromossoma 6(q27) pode ser responsável pela malformação fetal detetada na análise ecográfica e conseqüentemente, pode dar origem a um fenótipo patogénico. Isto porque, a malformação fetal está correlacionada com a atividade funcional do gene *T* presente na deleção. No entanto, sem ter conhecimento se o equilíbrio genómico detetado neste caso é herdado ou *de novo* e tendo em conta o seu pequeno tamanho, bem como o pequeno número de genes envolvidos, a deleção presente neste caso foi classificada como sendo de significado clínico incerto ou desconhecido.

Caso 9

A análise ecográfica identificou no caso 9, um feto com uma cardiopatia grave, pelo que foi sujeito a uma análise por citogenética convencional das metafases obtidas a partir da cultura de LA, que revelaram um cariótipo normal do sexo feminino 46,XX.

Posteriormente, a análise do DNA fetal por *a*CGH de oligonucleótidos com 60K revelou uma duplicação na região terminal do braço longo do cromossoma 18(q23), entre as posições nucleotídicas 76,903,814 e 77,063,633 numa extensão de 159,820 pb, arr[hg19] 18q23(76,903,814-77,063,633)x3 (figura 16). De acordo com o *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly*, esta duplicação com o tamanho de 0,16 Mb envolve apenas um gene conhecido, *ATP9B*, que pertence a uma classe de ATPases designadas de transportadoras da membrana (Hartz, 2012). As duplicações na região terminal do braço longo do cromossoma 18(q23) estão associadas a diversas manifestações fenotípicas, como atraso no desenvolvimento, défice cognitivo, vários dimorfismos e diversas anomalias congénitas (Ceccarini et al., 2007).

Ao nível da base de dados DECIPHER e ISCA estão reportados vários pacientes com CNV's sobreponíveis à duplicação detetada na região terminal do braço longo do cromossoma 18, mas todas elas incluem mais genes e apresentam um tamanho superior,

designado por *PCDH18*. A estrutura do gene *PCDH18* é altamente conservada, e é responsável pela expressão de um recetor neural, membro de uma subfamília das caderinas, que desempenha um papel importante na adesão célula-a-célula dependente de cálcio existente no cérebro. Este também é expresso durante o desenvolvimento embrionário, no qual é associado ao desenvolvimento cerebral (Kasnauskiene et al., 2012).

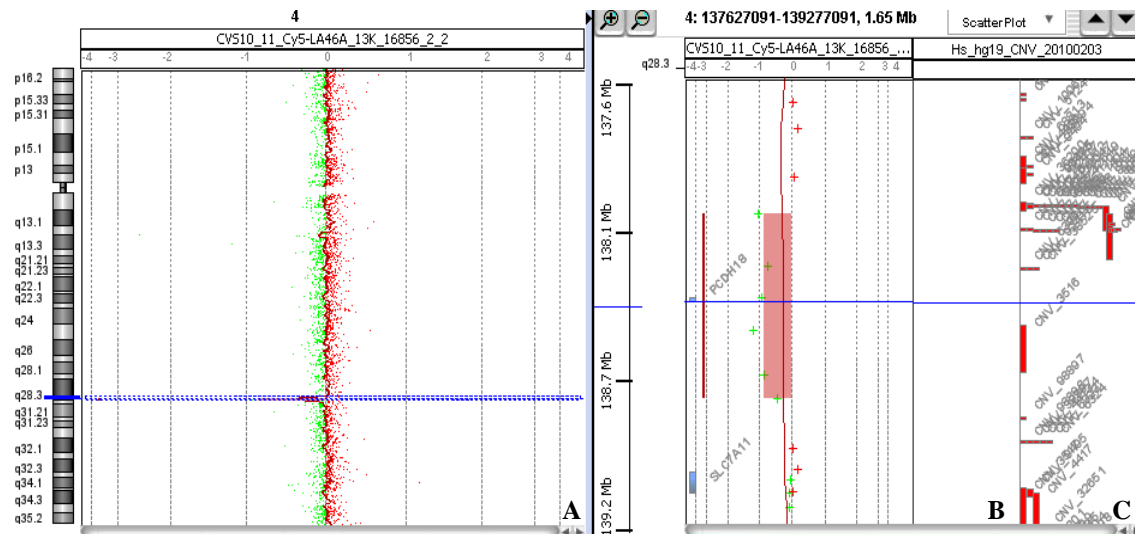


Figura 17. A - Perfil de aCGH para o cromossoma 4, representando a deleção de 0.68 Mb em 4q28.31; B - Constituição génica do segmento envolvido na deleção e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

A deleção envolvendo o braço longo do cromossoma 4(q28.31) não se encontra reportada na base de dados DGV, na qual estão reportadas apenas CNV's parcialmente sobreponíveis. Na base de dados DECIPHER e ISCA encontram-se descritos vários pacientes com CNV's sobreponíveis à detetada neste caso, mas todas elas incluem outros genes e possuem um tamanho superior. Nenhum dos pacientes com caracterização clínica, reportado na base de dados DECIPHER, apresentava a malformação fetal detetada ou outras malformações ao nível da parede abdominal. Na sua maioria apresentam défice cognitivo como característica comum, por vezes associadas a dimorfismos e outras anomalias congénitas graves. Contudo, a comparação entre as CNV's sobreponíveis à deleção detetada no braço longo do cromossoma 4(q28.31), presentes nesta base de dados, é limitante e desafiadora, uma vez que os seus tamanhos variam significativamente (Thuresson et al., 2007).

Em adição, o gene *PCDH18* já foi proposto como um provável candidato a déficit cognitivo num estudo envolvendo uma deleção, herdada de mãe normal, no braço longo do cromossoma 4(q28.3) com uma extensão de 1.53 Mb envolvendo apenas o gene *PCDH18*. Segundo Kasnauskiene e colaboradores, este desequilíbrio não podia ser excluído apenas por causa da sua hereditariedade, uma vez que o gene implicado na deleção desempenha um papel funcional nos processos de desenvolvimento neural. Por sua vez fenómenos de haploinsuficiência e penetrância incompleta do gene *PCDH18* podem justificar o fenótipo. Assim, concluíram que a deleção detetada no longo braço do cromossoma 4(q28.3) envolvendo apenas o gene *PCDH18* é uma CNV particular, associada com as malformações presentes no paciente, pelo que propuseram o gene *PCDH18* como um possível gene candidato para o déficit cognitivo. Contudo, a possível contribuição da deleção deste gene para o fenótipo manifestado pode ser desafiada pela presença da alteração na sua mãe saudável (Kasnauskiene et al., 2012).

Deste modo, a deleção envolvendo o braço longo do cromossoma 4(q28.31) foi classificada como sendo de significado clínico incerto ou desconhecido, uma vez que é difícil ou praticamente impossível prever o fenótipo resultante, mesmo com os estudo dos progenitores. Isto porque, apesar de não justificar as malformações fetais identificadas na ecografia, alterações no gene *PCDH18* podem estar associadas a déficit cognitivo.

Caso 16

Através da análise ecográfica foi identificado no caso 16 um feto com excesso de parede abdominal e angulação da coluna. A mãe também apresentava idade materna avançada. Na presença destas duas indicações, o feto foi sujeito a uma análise por citogenética convencional das metafases obtidas a partir da cultura de vilosidades coriônicas, que revelaram um cariótipo normal do sexo masculino 46,XY.

A análise por *aCGH* de oligonucleótidos com 60K revelou a existência de uma duplicação na região terminal do braço longo do cromossoma 19(q13.43), entre as posições nucleotídicas 57,349,301 e 57,351,566 numa extensão de 2,266 pb, arr[hg19] 19q13.43(57,349,301-57,351,566)x3 (figura 18). De acordo com o *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly*, esta duplicação envolve os genes conhecidos *ZIM2* e *PEG3*. Apesar de serem dois genes distintos, compartilham

um conjunto de exões 5' e partilham o mesmo promotor. Ambos os fatores de transcrição estão envolvidos nas vias de sinalização responsáveis pela proliferação celular e pelos processos apoptóticos. O gene *PEG3* também está associado a vários tipos de cancro. Em particular, a não expressão do gene *PEG3* está presente em muitos casos de glioma, cancro da mama e dos ovários, que são geralmente causados pela completa metilação do DNA da sua região promotora (Paalman, 1996).

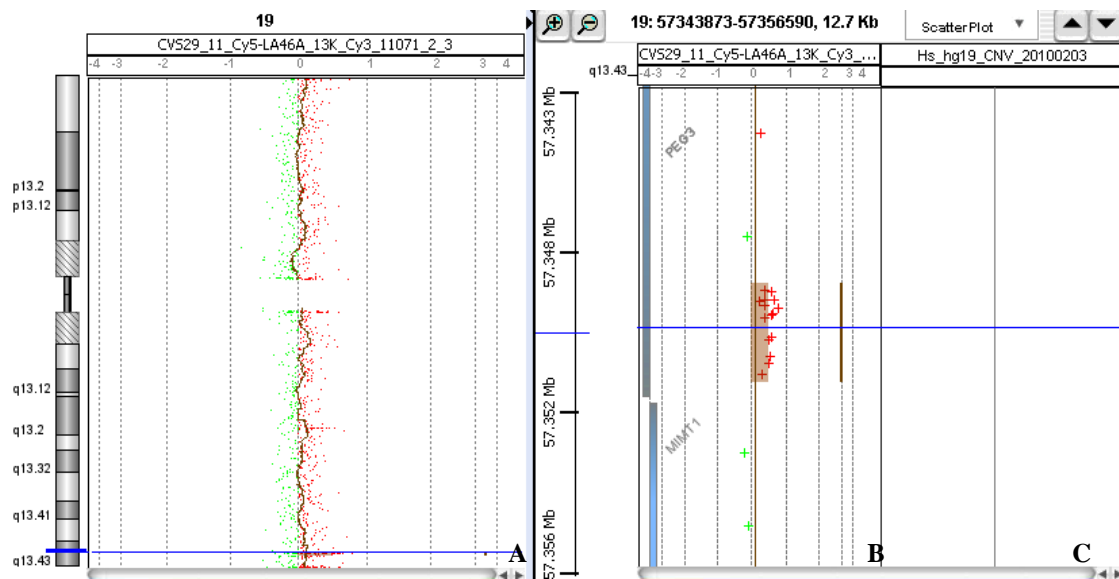


Figura 18. A - Perfil de *a*CGH para o cromossoma 19, representando a duplicação de 2.2 Kb em 19q13.43; B - Constituição génica do segmento envolvido na duplicação e perfil das CNV's descritas na DGV (C) (Imagem cedida pelo LCG-FMUC).

A duplicação envolvendo esta região terminal do braço longo do cromossoma 19(q13.43) não se encontra reportada na base de dados DGV, onde apenas estão reportadas 2 deleções sobreponíveis à duplicação presente neste caso. Na base de dados DECIPHER e ISCA encontram-se descritos vários pacientes com CNV's sobreponíveis à detetada neste caso, mas todas elas incluem outros genes e possuem um tamanho superior. Nenhum dos pacientes com a caracterização clínica, reportada na base de dados DECIPHER, apresentava malformações ao nível da parede abdominal ou angulação da coluna. Apenas um paciente portador de uma duplicação *de novo* sobreponível à do presente caso, com uma extensão de 0,5 Mb, apresentava anomalias no osso do sacro localizado na base da coluna vertebral. O Paciente também apresentava atresia anal, atresia ureteral hipoplasia de um polegar, fistula uretral e anomalias no

retorno venoso pulmonar. No entanto, esta duplicação envolvia mais 11 genes para além dos genes *ZIM2*, *PEG3* e estava associada a uma outra duplicação *de novo* no braço longo do cromossoma 19(q13.43) com uma extensão de 0.41 Mb que poderia ser responsável pelo fenótipo do paciente.

Uma vez que, a duplicação envolvendo a região terminal do cromossoma 19(q13.43) não justifica as malformações encontradas e a informação presente na bases de dados consultadas não esclarecem a sua patogenicidade, esta foi classificada como sendo de significado clínico incerto ou desconhecido. Para esta decisão também foi tido em consideração, o seu tamanho, os genes envolvidos e o facto de ser uma duplicação. Por último, estudo de hereditariedade desta CNV's será essencial para a sua classificação como benigna ou patogénica, já que a probabilidade de uma CNV's herdada de pais normais, provocar um fenótipo patogénico ser praticamente nula. No entanto, este não deverá ser o único critério para excluir a patogenicidade de uma CNV.

4.3. Redução dos resultados de significado clínico incerto ou desconhecido

O presente estudo apresentou uma elevada percentagem de casos com CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido, o que numa abordagem poderia ser indicativo de fragilidade de utilização do *aCGH* no DPN. Se a informação fornecida pela técnica de *aCGH* não permitir uma correlação genótipo-fenótipo, esta colorará em causa o resultado fornecido no DPN, já que não será possível prever, que impacto os desequilíbrios genómicos detetados têm no fenótipo. Esta situação de incerteza poderá levar à tomada de decisões menos corretas e a um aumento da ansiedade dos progenitores, o que por si só pode afetar negativamente a gravidez (Savage et al., 2011). Mesmo que seja possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo, esta terá de ser sempre bem definida e não depender de pressupostos que descredibilizem a utilização do *aCGH* no DPN, por exemplo, é imperativo a disponibilidade de análise dos progenitores através do *aCGH* ou técnica complementar nos casos que apresentaram CNV's patogénicas e CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido. É facto que a probabilidade de um desequilíbrio genómico herdado afetar a função de gene é praticamente nula (Fiorentino et al., 2011). Contudo este não deve ser o único critério a ter em consideração para definir uma CNV como benigna ou patogénica, uma vez que

fenómenos como *imprinting*, haploinsuficiência e penetrância incompleta podem também afetar a função dos genes envolvidos, o que pode resultar num fenótipo patogénico (Kasnauskiene et al., 2012)

Com a introdução do *aCGH* no DPN, novas síndromes serão caracterizadas, e a interpretação dos seus resultados será cada vez menos complexa, pelo que a percentagem de resultados com significado clínico incerto ou desconhecido também será cada vez mais reduzida. Estudos retrospectivos do *aCGH* no DPN contribuíram para o aumento da capacidade de análise e interpretação dos resultados obtidos por esta tecnologia. Assim como para o estabelecimento de padrões de análise para *aCGH* no DPN, que por sua vez permitirão esclarecer muitas questões, de entre as quais, o tipo de plataformas de *microarrays* a utilizar no DPN, o número de sondas consecutivas alteradas que a CNV deve ter para ser considerada no DPN e o limite mínimo de resolução a ter em consideração. O estabelecimento de padrões de análise para o *aCGH* tornará a interpretação dos seus resultados menos complexa, o que resultará, certamente, numa diminuição dos resultados com significado clínico incerto ou desconhecido, obtidos por *aCGH* no DPN (Machado et al., 2012; Vetro et al., 2012). Assim, de modo a reduzir os casos com CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido, estas foram consideradas segundo dois critérios, presentes na bibliografia, para a análise de CNV's através do *aCGH* no DPN. O primeiro consistiu em apenas considerar as CNV's com o mínimo de oito sondas consecutivas alteradas (Rooryck et al., 2013), enquanto que, o segundo considerou as CNV's inferiores a 400 Kb, caso estivessem associadas as anomalias fetais presentes na ecografia (Scott et al., 2013).

Considerando o primeiro critério, a análise somente das CNV's com o mínimo de 8 sondas consecutivas alteradas, apenas as CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido presentes nos casos 5 e 16 seriam analisadas (2/19, 10,5%), pelo que a percentagem de casos com CNV's de significados clínico incerto ou desconhecido sofreria uma redução significativa na ordem dos 21,1%. Caso tivéssemos em consideração o segundo critério, de somente considerar CNV's inferiores a 400 Kb se associadas as anomalias fetais presentes na ecografia, apenas as CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido presentes nos casos 5, 6, e 14 seriam consideradas (3/19, 15,8%), pelo que a percentagem de casos com CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido era reduzida para metade. Caso considerássemos os dois critérios em simultâneo, somente a CNV de significado clínico incerto ou desconhecido

presente no caso 5 seria considerada, pelo que a percentagem final de resultados de significado clínico incerto ou desconhecido seria de 5,3%.

No presente estudo, ambos os critérios se mostraram eficientes na redução de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido. No entanto, a presença destes critérios pode também ser limitante, uma vez que CNV's patogénicas podem não ser detetadas. Face à citogenética convencional, pelo *aCGH* há um aumento significativo no poder de resolução e digamos que pode revelar-se importante para o DPN. No presente estudo se um dos critérios ou os dois em simultâneo fossem aplicados *à priori*, a percentagem de casos com CNV's de significado clínico incerto ou desconhecido seria substancialmente reduzida, sem afetar a deteção das CNV's patogénicas, o que seria uma mais valia para o DPN.

Apesar de ambos os critérios reduzirem a percentagem de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido, ambos excluíram CNV's distintas, sendo que, apenas a CNV de significado clínico incerto ou desconhecido presente no caso 5 tenha sido considerada em ambas as situações. Deste modo, a análise de determinados desequilíbrios genómicos por *aCGH* vai depender da estratégia definida pelo laboratório, o que causa alguma controvérsia de interpretação nos serviços de pré-natal. Assim, a elaboração de padrões de análise universais para a utilização do *aCGH* no DPN natal será um passo importantíssimo para a sua implementação neste tipo de diagnóstico. Isto porque, a ausência de padrões de análise acentua a incerteza que existe nos resultados obtidos por *aCGH*, o que pode colocar em causa o DPN. É provável, que no futuro o *aCGH* possa substituir a citogenética convencional como teste de primeira linha no DPN, nomeadamente nos casos com indicação de anomalias ecográficas. Para que tal aconteça, é necessário que a sua utilização passe por um processo de otimização, no qual a elaboração de padrões de análise para o *aCGH* no DPN e a experiência adquirida terão um papel preponderante. Também um maior conhecimento acerca dos genes e dos fenómenos de expressão génica envolvendo as CNV's presente no genoma humano será necessário, de modo a proporcionar uma clara interpretação quanto à sua patogenicidade. Assim, mais estudos serão necessários, de modo a esclarecer todas as controvérsias em torno da aplicabilidade do *aCGH* na deteção de desequilíbrios cromossómicos no DPN.

CAPITULO V

CONCLUSÃO

5. Conclusão

Este estudo demonstrou que a técnica de *aCGH* pode torna-se uma mais-valia para o DPN em fetos com alterações morfológicas à ecografia, uma vez que permitiu a deteção de desequilíbrios cromossómicos clinicamente significativos que não seriam detetáveis por citogenética convencional, bem como uma caracterização mais detalhada dos rearranjos cromossómicos detetados no cariótipo.

Embora o número de casos analisados seja reduzido, este estudo forneceu evidências sobre o contributo que a introdução da tecnologia de *aCGH* pode trazer para o DPN de gestações com indicação de anomalias ecográficas, já que esta tecnologia detetou CNV's patogénicas em 5,9% dos casos com esta indicação e resultado citogenético normal. No entanto, as dificuldades de interpretação dos resultados obtidos por *aCGH* também foram evidentes, o que exige cautela quanto à sua introdução na rotina do DPN, já que os seus resultados podem causar incerteza neste ambiente clínico, o que dificulta o aconselhamento genético, bem como pode levar a incerteza nas decisões. Porém, a elevada percentagem de resultados com significado clínico incerto ou desconhecido pode ser, em grande parte, colmatada com a análise dos progenitores por *aCGH* ou técnicas complementares, como por exemplo o MLPA ou FISH direcionada. Relativamente a esta questão, o nosso estudo mostrou que ambos os critérios de seleção de CNV's para análise, presentes na bibliografia consultada, mostraram-se eficazes na redução de CNV's com significado clínico incerto ou desconhecido, sem perda de CNV's patogénicas. Contudo, ambos excluem CNV's distintas, pelo que a análise de determinados desequilíbrios genómicos obtidos por *aCGH* se mostrou dependente da estratégia definida por cada laboratório. Assim, para uma prudente e objetiva introdução do *aCGH* no DPN, questões relativas à sua metodologia e análise terão de continuar a ser debatidas, de modo a produzir critérios para a sua utilização neste tipo de diagnóstico, sendo que a recolha de sangue de ambos os progenitores deve ser definida como um dos critérios obrigatórios, uma vez que o estudo da hereditariedade de uma dada CNV pode ser fundamental para sua classificação como patogénica ou benigna.

Em adição, serão necessários mais estudos funcionais acerca da maquinaria génica envolvida nas alterações cromossómicas presentes no genoma, de modo a perceber que tipo de distúrbios podem causar fenótipo, o que também facilitará, no DPN, uma

correlação do genótipo com as malformações fetais detetadas na ecografia.

Por fim, numa primeira fase, é notório que o *aCGH*, possa ser, em alguns casos, utilizado como teste de primeira linha no DPN. Porém, a citogenética convencional, continua a ter um papel importante neste tipo de diagnóstico, particularmente, nos casos em que é preciso fornecer aos progenitores, o risco de recorrência de uma cromossomopatia.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

AHN, J.W.; BINT, S.; BERGBAUM, A.; MANN, K.; HALL, R.P.; OGILVIE, C.M. - Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients. **Molecular Cytogenetics**. ISSN 1755-8166. 6:16 (2013) 1-9.

AGNIESZKA, S.; OELÉZAK, R.; PESZ, K.; GIL, J.; SIADEK, M.M. - Prenatal diagnosis - principles of diagnostic procedure and genetic counseling. **Folia Histochemica et Cytobiologia**. ISSN 0239-8508. 45:1 (2007) 11-16.

AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R. - Aspectos modernos da divisão celular. **Temas da Biologia: Actualidades Biológicas** ISSN 0304-3584. 1:8 (1998) 1-7.

ALLERMEESCH, J.; VAN VOOREN, S.; HANNES, F.; De MOOR, B.; VERMEESCH, J.R.; MOREAU, Y. - An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. **BMC Bioinformatics**. ISSN 1471-2105. 10: 380 (2009) 1-12.

BATISTA, M.P.; COSTA, L.M.; GOMES, A.C.; AMARAL, W.N. - Importância do estudo genético pré-natal. **Femina**. ISSN 0100-7254. 40:1 (2012) 5-11.

BIANCHERI, R.; ROSSI, A.; VERBEEK, H.A.; SCHOT, R.; CORSOLINI, F.; ASSERETO, S.; MANCINI, G.M.; VERHEIJEN, F.W.; MINETTI, C.; FILOCAMO M. - Homozygosity for the p.K136E mutation in the SLC17A5 gene as cause of an Italian severe Salla disease. **Neurogenetics**. ISSN 1364-6745. 6:4 (2005) 195-199.

BEAUDET, A.L.; BELMONT, J.W. - Array-based DNA diagnostics: let the revolution begin. **Annual Review of Medicine**. ISSN 0066-4219. 59 (2008) 113-129.

BEJJANI, B.A.; NATOWICZ, R.M. - Array-based Cytogenetic Testing. **Clinical Laboratory News**. [Em linha]. 36:5 (2010) 8-10. [consult. 27 Jun. 2013]. Disponível em WWW:<<http://www.aacc.org/publications/cln/2010/may/Pages/SeriesArticle.aspx>>. ISSN 0161-9640

BENN, P.A.; TANTRAVAHU, U. - Chromosome staining and banding techniques. In **Human Cytogenetics: constitutional analysis**. New York: Oxford University Press, 2001. ISBN 0-19-963840-3. Capítulo 4, p.99-109.

BICKMORE, W.A. - Karyotype Analysis and Chromosome Banding. **Encyclopedia of Life Sciences**. ISSN 1476-9506. (2001) 1-7.

BISHOP, R. - Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. **Bioscience Horizons** ISSN 1754-7431. 3:1 (2010) 85-95.

BOORMANS, E.; BIRNIE, E.; HOFFER, M.; MACVILLE, M.; GALJAARD, R.; SCHURING-BLOM, B.; BHOLA, S.; HUIJSDENS, K.; SMITS, A.; VAN LITH, J. - Economic evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification and karyotyping in prenatal diagnosis: a cost-minimization analysis. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. ISSN 0932-0067. 285:1 (2012) 67-75.

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

BREMAN, A.; PURSLEY, A.N.; HIXSON, P.; BI, W.; WARD, P.; BACINO, C.A.; SHAW, C.; LUPSKI, J.R.; BEAUDET, A.; PATEL, A.; CHEUNG, S.W.; VAN DEN VEYVER I. - Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. **Prenatal Diagnosis**. ISSN 0197-3851. 32:4 (2012) 351-361.

CAVALLI, P.; CAVALLARI U.; NOVELLI, A. - Array CGH in routine prenatal diagnosis practice. **Prenatal Diagnosis**. ISSN 0197-3851. 32:7 (2012). 708-709.

CECCARINI, C.; SINIBALDI, L.; BERNARDINI, L.; DE SIMONE, R.; MINGARELLI, R.; NOVELLI, A.; DALLAPICCOLA, B. - Duplication 18q21.31-q22.2. **American Journal of Medical Genetics Part A**. ISSN 1552-4825. 143:4 (2007) 343-348.

CLANCY, S. - Copy Number Variation. **Nature Education** [Em linha] 1:1 (2008). [15 Abr. 2013]. Disponível em WWW:<<http://www.nature.com/scitable/topicpage/copy-number-variation-445>>. ISSN 0028-0836

CLOUSTON, H. J. - Lymphocyte culture. In ROONEY, D. E. – **Human Cytogenetics: constitutional analysis**. New York: Oxford University Press, 2001. ISBN 0-19-963840-3. Capítulo 1, p.1-5.

DABIR, T.; HUTLÉN, M. – Duplications of 10p. **Unique**. 1:1 (2011) 1-20.

D'AMOURS, G.; KIBAR, Z.; MATHONNET, G.; FETNI, R.; TIHY, F.; DÉSILETS, V.; NIZARD, S.; MICHAUD, J.L. LEMYRE, E. - Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. **Clinical Genetics**. ISSN 0009-9163. 81:2 (2012) 128-141.

DATABASE OF CHROMOSOMAL IMBALANCE AND PHENOTYPE IN HUMANS USING ENSEMBL RESOURCES - DECIPHER. [Base de dados em linha]. Wellcome Trust Genome Campus Hinxton, Cambridge, United Kingdom. Disponível em WWW:<<http://decipher.sanger.ac.uk/>>.

DATABASE OF GENOMIC VARIANTS - DGV. [Base de dados em linha]. Canada/Ontario Genomics Institute, the McLaughlin Centre for Molecular Medicine, the Wellcome trust and the Canadian Institutes for Health Research. Disponível em WWW:<<http://projects.tcag.ca/variation/>>.

DUBOURG, C.; BENDAVID, C.; PASQUIER, L.; HENRY, C.; ODENT, S.; DAVID, V. – Holoprosencephaly. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. ISSN 1750-1172. 2:8 (2007) 1-14.

EVANGELIDOU, P.; SISMANI, C.; IOANNIDES, M.; CHRISTODOULOU, C.; KOUMBARIS, G.; KALLIKAS, I.; GEORGIU, I.; VELISSARIOU, V.; PATSALIS, P.C. - Clinical application of wholegenome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. **Molecular Cytogenetics**. ISSN 1755-8166. 3:24 (2010) 1-10.

EVANGELIDOU, P.; ALEXANDROU, A.; MOUTAFI, M.; IOANNIDES, M.; ANTONIOU, P.; KOUMBARIS, G.; KALLIKAS, I.; VELISSARIOU, V.; SISMANI, C.; PATSALIS, P.C. - Implementation of high resolution whole genome array CGH in the prenatal clinical setting: advantages, challenges, and review of the literature. **BioMed Research International**. ISSN 2314-6133. 2013 (2013) 1-14.

FILGES, I.; KANG, A.; KLUG, V.; WENZEL, F.; HEINIMANN, K.; TERCANLI, S.; MINY, P. - Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis of first trimester pregnancies at high risk for chromosomal anomalies. **Molecular Cytogenetics** ISSN 1755-8166. 5:38 (2012) 1-7.

FIorentino, F.; CAIAZZO, F.; NAPOLITANO, S.; SPIZZICHINO, L.; BONO, S.; SESSA, M.; NUCCITELLI, A.; BIRICIK, A.; GORDON, A.; RIZZO, G.; BALDI, M. - Introducing array comparative genomic hybridization into routine prenatal diagnosis practice: a prospective study on over 1000 consecutive clinical cases. **Prenatal diagnosis**. ISSN 0197-3851. 31:13 (2011) 1270-1282.

GARDNER, R.J.M.; SUTHERLAND, G.R. - **Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling**. 3^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2004. ISBN 0 195 14960 2.

GERBER, J.C.; NEUHANN, T.M.; TYSHCHENKO, N.; SMITKA, M.; HACKMANN, K. Expanding the clinical and neuroradiological phenotype of 6q27 microdeletion: olfactory bulb aplasia and anosmia. **American Journal of Medical Genetics**. ISSN: 1552-4825. 155A:8 (2011) 1981-1986.

GIJSBERS, A.C.; SCHOUMANS, J.; RUIVENKAMP, C.A. - Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. **Cytogenetic and genome research**. ISSN 1424-8581. 135:3-4 (2011) 222-227.

GUERRA, M. – **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1-92.

GUERRINI, R.; MEI, D.; CORDELLI, D.M.; PUCATTI, D.; FRANZONI, E.; PARRINI E. - Symmetric polymicrogyria and pachygyria associated with TUBB2B gene mutations. **European Journal of Human Genetics**. ISSN 1018-4813. 20:9 (2012) 995-998.

HARTZ, P.A. - **ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase3; ST8SIA3** [Em linha]. United States: Online Mendelian Inheritance, 2005. [Consult. 4 Jul. 2013]. Disponível em WWW:<<http://www.omim.org/entry/609478>>.

HARTZ, P.A. - **Tubulin, BETA-2B; TUBB2B** [Em linha]. United States: Online Mendelian Inheritance, 2009, atual. 28 Fev. 2013. [Consult. 2 Jul. 2013]. Disponível em WWW:<<http://www.omim.org/entry/612850>>.

HARTZ, P.A. - **WD Repeat-Containing Protein 7; WDR7** [Em linha] United States: Online Mendelian Inheritance, 2010. [Consult. 4 Jul. 2013]. Disponível em WWW:<<http://www.omim.org/entry/613473>>.

HARTZ, P.A. - **ATPase, Class II, Type 9B; ATP9B** [Em linha] United States: Online Mendelian Inheritance, 2012. [Consult. 17 Jul. 2013]. Disponível em WWW:<<http://www.omim.org/entry/613473>>.

HARTZ, P.A. - **Long Intergenic Noncoding RNA, Regulator of Reprogramming; LINC-ROR** [Em linha] United States: Online Mendelian Inheritance, 2013. [Consult. 4 Jul. 2013]. Disponível em WWW: <<http://www.omim.org/entry/615173>>.

HSIEH, C.L. - Cytogenetic Techniques. **Encyclopedia of Life Sciences**. ISSN 1476-9506. (2011) 1-4.

HILLMAN, S.C.; PRETLOVE, S.; COOMARASAMY, A.; MCMULLAN, D.J.; DAVISON, E.V.; MAHER, E.R.; KILBY, M.D. - Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. **Ultrasound Obstet Gynecol**. ISSN 0960-7692. 37:1 (2011) 6-14.

HILLMAN, S.C.; MCMULLAN, D.J.; WILLIAMS, D.; MAHER, E.R.; KILBY, M.D.
- Microarray comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: a review.
Ultrasound Obstet Gynecol. ISSN 0960-7692. 40:4 (2012) 385-391.

INTERNACIONAL STANDARDS FOR CYTOGENOMIC ARRAYS CONSORTIUM
AND PUBLIC DATABASE – ISCA. [Base de dados em linha]. Disponível em
WWW:<<https://www.iscaconsortium.org/>>.

JACKSON, L.; GIBAS, L.M.; BARR, M.A. - Preparation of metaphase spreads from
chorionic villus samples. **Current Protocols in Human Genetics.** ISSN 1934-8266.
8:8.3 (2001) 1-7.

JÚNIOR, W.P. - Diagnóstico pré-natal. **Ciência & Saúde Coletiva.** ISSN 1413-8123.
7:1 (2002) 139-157.

KASNAUSKIENE, J.; CIULADAITE, Z.; PREIKSAITIENE, E.; MATULEVIČIENĖ,
A.; ALEXANDROU, A.; KOUMBARIS, G.; SISMANI, C.; PEPALYTĖ, I.;
PATSAKIS, P.C.; KUČINSKAS, V. - A single gene deletion on 4q28.3: PCDH18--a
new candidate gene for intellectual disability?. **European Journal of Medical
Genetics.** ISSN 1769-7212. 55:4 (2012) 274-277.

KHMELINSKII, A. - **Emparelhamentos de Cromossomas Para Propósitos de
Carotipagem.** Lisboa: [s.n], 2007. 6-19.

LEUNG, T.Y.; VOGEL, I.; LAU, T.K.; CHONG, W.; HYETT, J.A.; PETERSEN,
O.B.; CHOY, K.W. - Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in
fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype.
Ultrasound Obstet Gynecol. ISSN 0960-7692. 38:3 (2011) 314-319.

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

LEE, C.N.; LIN, S.Y.; LIN, C.H.; SHIH, J.C.; LIN, T.H.; SU, Y.N. - Clinical utility of
array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171

pregnancies. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. ISSN 1470-0328. 119:5 (2012) 614-625.

LICHTENBELT, K.D.; KNOERS, N.V.A.M.; SCHURING-BLOM, G.H. - From Karyotyping to Array-CGH in Prenatal Diagnosis. **Cytogenetic and Genome Research**. ISSN 1424-8581. 135:3-4 (2011) 241-250.

LOCKWOOD, W.W.; CHARI, R.; CHI, B.; LAM, W.L. - Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. **European Journal of Human Genetics**. ISSN 1018-4813. 14:2 (2006) 139-148.

MACHADO, I.N. HEINRICH-MUÇOUÇA, J.K.; BARINI, R. - Testes genéticos em diagnóstico pré-natal: onde estamos, para onde vamos. **Femina**. ISSN 0100-7254. 46:2 (2012) 87-96.

MAYA, I.; DAVIDOV, B.; GERSHOVITZ, L.; ZALZSTEIN, Y.; TAUB, E.; COPPINGER, J.; SHAFFER, L.G.; SHOHAT, M. - Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. **Prenatal diagnosis**. ISSN 0197-3851. 30:12-13 (2010) 1131-1137.

MCKUSICK, V.A. – **Chronic motor tics included** [Em linha]. United States: Online Mendelian Inheritance, 1986, atual. 3 Ago. 2012. [Consult. 2 Jul. 2013]. Disponível em WWW: <<http://omim.org/entry/137580>>.

MCKUSICK, V.A. - **Serpi Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 6; SERPINB6** [Em linha]. United States: Online Mendelian Inheritance, 1993, atual. 17 Jun. 2010. [Consult. 23 Jun. 2013]. Disponível em WWW: <<http://www.omim.org/entry/173321>>.

MCKUSICK, V.A. - **T Brachyury, Mouse, Homologo of; T** [Em linha]. United States: Online Mendelian Inheritance, 1996, atual. 1 Nov. 2013. [Consult. 7 Jul. 2013]. Disponível em WWW: <<http://www.omim.org/entry/601397>>.

MCKUSICK, V.A. - **Solute Carrier Family 17 (Sodium Phosphate Cotransporter), Member 5; SLC17A5** [Em linha]. United States: Online Mendelian Inheritance, 1999,

atual. 30 Nov. 2009. [Consult. 2 Jul. 2013]. Disponível em WWW: <<http://www.omim.org/entry/604322>>.

MIRON, P.M. - Preparation, culture, and analysis of amniotic fluid samples. **Current Protocols in Human Genetics**. ISSN 1934-8266. 8:8.4 (2001) 1-17.

MCGILLIVRAY, G.; ROSENFELD, J.A.; MCKINLAY, R.J.; GILLAM, L.H. - Genetic counselling and ethical issues with chromosome microarray analysis in prenatal testing. **Prenatal Diagnosis**. ISSN 0197-3851. 32:4 (2012) 389-395.

MILLER, D.T.; ADAM, M.P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L.G.; BROTHMAN, A.R.; CARTER, N.P.; CHURCH, D.M.; CROLLA, J.A.; EICHLER, E.E.; EPSTEIN, C.J.; FAUCETT, W.A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J.M.; HAMOSH, A.; JACKSON, L.; KAMINSKY, E.B.; KOK, K.; KRANTZ, I.D.; KUHN, R.M.; LEE, C.; OSTELL, J.M.; SCHERER S.W.; TEPPERBERG, J.H.; THORLAND, E.C.; VERMEESCH, J.R.; WAGGONER, D.J.; WATSON, M.S.; MARTIN C.L.; LEDBETTER, D.H. -Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **American Journal of Human Genetics**. ISSN 0002-9297. 86:5 (2010) 749-764.

NICOLAIDES, K.H. - Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. **Prenatal Diagnosis**. ISSN 0197-3851. 31:1 (2011) 7-15.

NICOLAIDES, K.H.; DEFIGUEIREDO, D.B. - **O exame ultra-sonográfico entre 11–13⁺⁶ semanas**. Londres: Fetal Medicine Foundation, 1994. Capítulo 1-2.

NOVELLI, A.; GRATI, F.R.; BALLARATI, L.; BERNARDINI, L.; BIZZOCO, D.; CAMURRI, L.; CASALONE, R.; CARDARELLI, L.; CAVALLI, P.; CICCONE, R.; CLEMENTI, M.; DALPR`A, L.; GENTILE, M.; GELLI, G.; GRAMMATICO, P.; MALACARNE, M.; NARDONE, A.M.; PECILE, V.; SIMONI, G.; ZUFFARDI, O.; GIARDINO, D. - Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. **Ultrasound Obstet Gynecol**. ISSN 0960-7692. 39:1 (2012) 384-388.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN – OMIM. United States: Johns Hopkins University [base de dados em linha]. Disponível em URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>>.

OSTROVERKHOVA, N.V.; NAZARENKO, S.A.; CHEREMNYKH, A.D. - Comparative genomic hybridization as a new method for detection of genomic imbalance. **Genetika**. ISSN 0016-6758. 38:2 (2002). 149-160.

PARK, S.J.; JUNG, E.H.; RYU, R.S.; KANG, H.W.; KO, J.M.; KIM, H.J.; CHEON, C.K.; HWANG, S.H.; KANG, H.Y. - Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. **Molecular Cytogenetics** ISSN 1755-8166. 4:12 (2011) 1-10.

PAALMAN, M.H. – **Paternally Expressed Gene 3; PEG3** [Em linha]. United States: Online Mendelian Inheritance, 1996, atual. 10 Dez. 2012. [Consult. 29 Jul. 2013]. Disponível em WWW: <<http://www.omim.org/entry/601483>>.

PONNURAJ, K.T. - Cytogenetic Techniques in Diagnosing Genetic Disorders. In **Advances in the Study of Genetic Disorders**. Croatia: InTech, 2011. ISBN. 978-953-307-305-7. 3, 45-64.

PORTER, I.M.; MCCLELLAND, S.E.; KHOUDOLI, G.A.; HUNTER, C.J.; ANDERSEN, J.S.; MCAINSH, A.D.; BLOW, J.J.; SWEDLOW, J.R. - Bod1, a novel kinetochore protein required for chromosome biorientation. **The Journal of Cell Biology** ISSN 0021-9525. 179:2 (2007) 187-97.

ROORYCK, C.; TOUTAIN, J.; CAILLEY, D.; BOURON, J.; HOROVITZ, J.; LACOMBE, D.; ARVEILER, B.; SAURA, R. - Prenatal diagnosis using array-CGH: a French experience. **European Journal of Medical Genetics**. ISSN 1769-7212. 56:7 (2013) 341-345.

SAVAGE, M.S. MOURAD, M.J. WAPNER, R.J. - Evolving applications of microarray analysis in prenatal diagnosis. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**. ISSN 1040-872X. 23:2 (2011) 103-108.

SCHAAF, C.P.; WISZNIEWSKA, J.; BEAUDET, A.L. - Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. ISSN 1527-8204. 12 (2011) 25-51.

SCHAEFFER, A.J.; CHUNG, J. HERETIS, K. WONG, A. LEDBETTER, D.H. MARTIN, L.C. - Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. **American Journal of Human Genetics**. ISSN 0002-9297. 74:6 (2004) 1168-1174.

SCOTT, F.; MURPHY, K.; CAREY, L.; GREVILLE, W.; MANSFIELD, N.; BARAHONA, P.; ROBERTSON, R.; MCLENNAN, A. - Prenatal diagnosis using combined quantitative fluorescent polymerase chain reaction and array comparative genomic hybridization analysis as a first-line test: results from over 1000 consecutive cases. **Ultrasound Obstet Gynecol**. ISSN 0960-7692. 41:5 (2013) 500-507.

SHAFFER, L.G.; DABELL, M.P.; FISHER, A.J.; COPPINGER, J.; BANDHOLZ, A.M.; ELLISON, J.W.; RAVNAN, J.B.; TORCHIA, B.S.; BALLIF, B.C.; ROSENFELD, J.A. - Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. **Prenatal Diagnosis**. ISSN 0197-3851. 32:10 (2012) 976-985.

SHAFFER, L.G.; ROSENFELD, J.A.; DABELL, M.P.; COPPINGER, J.; BANDHOLZ, A.M.; ELLISON J.W.; RAVNAN, J.B.; TORCHIA, B.S.; BALLIF, B.C.; FISHER, A.J. - Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. **Prenatal Diagnosis**. ISSN 0197-3851. 32:10 (2012) 986-995.

SHAFFER, L.G.; VAN DEN VEYVER, I.B. - New technologies for the assessment of chromosomes in prenatal diagnosis. **Prenatal Diagnosis**. ISSN 0197-3851. 32:4 (2012) 307-308.

SHAFFER L.G.; DABELL, M.P.; ROSENFELD, J.A.; NEILL, N.J.; BALLIF, B.C.; COPPINGER, J.; DIWAN, N.R.; CHONG, K.; SHOHAT, M.; CHITAYAT, D. - Referral patterns for microarray testing in prenatal diagnosis. **Prenatal Diagnosis**. ISSN 0197-3851. 32:6 (2012) 344-350.

SCHERECK, R. R.; DISTÈCHE, C. – Chromosome Banding Techniques. In **Current Protocols in Human Genetics**. United States of America: John Wiley & Sons, 2005. ISBN 0-471-03420-7. Capítulo 4.2.1-4.2.3.

SREBNIAK, M.; BOTER, M.; OUDESLUIJS, G.; JOOSTEN, M.; GOVAERTS, L.; VAN OPSTAL, D.; GALJAARD, R.J. - Application of SNP array for rapid prenatal diagnosis: implementation, genetic counselling and diagnostic flow. **European Journal of Human Genetics**. ISSN 1018-4813. 19:12 (2011) 1230-1237.

SREBNIAK, M.I.; BOTER, M.; OUDESLUIJS, G.O.; COHEN-OVERBEEK, T.; GOVAERTS, L.C.; DIDERICH, K.E.; OEGEMA, R.; KNAPEN, M.F.; VAN DE LAAR, I.M.; JOOSTEN, M.; VAN OPSTAL, D.; GALJAARD, R.J. - Genomic SNP array as a gold standard for prenatal diagnosis of foetal ultrasound abnormalities. **Molecular Cytogenetics**. ISSN 1755-8166. 5:14 (2012) 1-4.

THEISEN, A. - Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). **Nature Education**. [Em linha] 1:1 (2008). [15 Abr. 2013]. Disponível em WWW:<<http://www.nature.com/scitable/topicpage/microarray-based-comparative-genomic-hybridization-acgh-45432>>. ISSN 0028-0836

THOMPSON, M. W.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. - **Thompson & Thompson Genética médica**, 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. ISBN 85-277-0248-7. Capítulo 1, p.1-21.

THURESSON, A.C.; BONDESON, A.C.; EDEBY, C.; ELLIS, P.; LANGFORD, C.; DUMANSKI, J.P.; ANNERÉNA, G. - Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation. **Cytogenetic and Genome Research** ISSN 1424-8581. 118:1 (2007) 1-7.

UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly. [Base de dados em linha]. Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz, the Regents of the University of California. [Consult. 13 Ago. 2013]. Disponível em WWW:<<http://genome-euro.ucsc.edu/>>.

VAN DIEPEN, M.M.; GIJSBERS, A.C.; BOSCH, C.A.; OUDESLUYS-MURPHY, A.M.; RUIVENKAMP, C.A.; BIJLSMA, E.K. - A 797 kb de novo deletion of 18q21.31 in a patient with speech delay, mental retardation, sleeping problems, facial dysmorphism, and feet anomalies. **European Journal of Human Genetics**. ISSN 1018-4813. 54:1 (2011) 86-88.

VERMEESCH, J.R.; MELOTTE, C.; FROYEN, G.; VAN VOOREN, S.; DUTTA, B.; MAAS, N.; VERMEULEN, S.; MENTEN, B.; SPELEMAN, F.; MOOR, B.; VAN HUMMELEN, P. MARYNEN, P.; FRYNS, J.P.; DEVRIENDT, K. - Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. ISSN 0022-1554. 53:3 (2005) 413-422.

VERMEESCH, J.R.; BRADY, P.D.; SANLAVILLE, D.; KOK, K.; HASTINGS, R.J. - Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. **Human Mutation**. ISSN 1059-7794. 33:6 (2012) 906-915.

VESTERGAARD, E.M.; CHRISTENSEN, R.; PETERSEN, O.B.; VOGEL, I. - Prenatal diagnosis: array comparative genomic hybridization in fetuses with abnormal sonographic findings. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**. ISSN 0001-6349. 92:7 (2013) 762-768.

VETRO, A.; BOUMAN, K.; HASTINGS, R.; MCMULLAN, D.J.; VERMEESCH, J.R.; MILLER, K.; SIKKEMA-RADDATZ, B.; LEDBETTER, D.H.; ZUFFARDI, O.; VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C.M. - The introduction of arrays in prenatal diagnosis: a special challenge. **Human Mutation**. 33:6 (2012) 923-929.

WANG, N. - Methodologies in Cancer Cytogenetics and Mulecular Cytogenetics. **American Journal of Human Genetics**. ISSN 0002-9297. 115: 118–124 (2002) 118-124.

WAPNER, R.J.; MARTIN, C.L.; LEVY, B.; BALLIF, B.C.; ENG, C.M.; ZACHARY, J.M.; SAVAGE, M.; PLATT, L.D.; SALTZMAN, D.; GROBMAN, W.A.; KLUGMAN, S.; SCHOLL, T.; SIMPSON, J.L.; MCCALL, K.; AGGARWAL, V.S.; BUNKE, B.; NAHUM, O.; PATEL, A.; LAMB, A.N.; THOMM E.A.; BEAUDET, A.L.; LEDBETTER, D.H.; SHAFFER, L.G.; JACKSON, L. - Chromosomal microarray

versus karyotyping for prenatal diagnosis. **The New England Journal of Medicine**. ISSN 0028-4793. 367:23 (2012) 2175-2184.

WIEACKER, P.; STEINHARD, J. - The Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases. **Deutsches Ärzteblatt International** ISSN 1866-0452. 107:48 (2010) 857-868.

ZUFFARDI, O.; VETRO, A.; BRADY, P.; VERMEESCH, J. - Array technology in prenatal diagnosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**. ISSN 1744-165X. 16:2 (2011) 94-98.