

João Carlos Martins Gonçalves

Otimização da técnica de Array CGH em Diagnóstico Pré-Natal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Mestrado em Investigação Biomédica

2014



João Carlos Martins Gonçalves

Otimização da técnica de Array CGH em Diagnóstico Pré-Natal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para prestação de provas de Mestrado em Investigação Biomédica. O trabalho foi realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Joana Barbosa de Melo (Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e co-orientação da Professora Doutora Isabel Maria Marques Carreira (Professora Associada com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Junho de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Após a conclusão deste trabalho desejo manifestar os meus sinceros agradecimentos pela compreensão, disponibilidade, auxílio e atenção manifestada por diversas pessoas.

À **Professora Doutora Isabel Carreira**, por todo o apoio disponibilizado ao longo de todo o projeto e pela oportunidade concedida de realizar um estágio nesta área.

À **Professora Doutora Joana Melo** pelo seu papel e apoio dado enquanto Orientadora de Estágio.

A todo o grupo do **Laboratório de Citogenética e Genómica na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra**, em especial ao Miguel Pires e ao José Ferrão por toda a atenção dispensada.

Ao meu **avô António** por tudo o que foi para mim, pelo que me transmitiu, pela humildade, atenção e por ter sido a pessoa que mais admirei em toda a minha vida. O orgulho de ter sido seu neto irá ser das melhores coisas que vou para sempre levar desta vida.

À minha **avó Helena, aos meus tios, primos** e em especial ao meu afilhado **Guilherme** por todo o apoio que me têm transmitido desde sempre, sendo que sem eles não conseguiria ser nada.

Aos meus **amigos** por todo o companheirismo que me ajudaram a ultrapassar muitas dificuldades.

Ao meu **irmão José** por toda a amizade, atenção e ajuda prestada até ao presente momento.

Aos meus **pais João e Margarida** porque tudo o que sou e tudo que tenho até hoje se deve a eles e por todo o orgulho que tenho em ser seu filho

Resumo

A implementação da tecnologia de array CGH como rotina no diagnóstico pré-natal tem vindo a ser discutida nos últimos tempos. Contudo, esta introdução necessita de uma estratégia adequada que garanta a obtenção de DNA de qualidade diretamente a partir de amostras fetais, sem recorrer a cultura de células. Neste estudo delineou-se e otimizou-se uma estratégia de extração e purificação de DNA a partir de líquido amniótico direto, que permitiu a realização de array CGH em diagnóstico pré-natal.

Foram selecionados dois protocolos comerciais de extração de DNA que foram otimizados e comparados entre si, de modo a determinar o que apresentava melhor rendimento e qualidade. O controlo da qualidade do DNA obtido foi feito recorrendo a espectrofotometria, a análise do grau de fragmentação através de corrida em gel de agarose e a uma validação dos resultados através de aplicação comparativa numa plataforma de array CGH 180K. A estratégia que garantiu melhores concentrações de DNA de qualidade para análise foi validada recorrendo a 10 amostras de líquido amniótico direto.

O estudo efetuado demonstrou que a maioria das amostras, principalmente com um menor número de semanas de gestação, necessitam da realização de um protocolo adicional de concentração e purificação de DNA, para além do protocolo de extração de DNA, de modo a garantir os parâmetros mínimos de quantidade e qualidade para a realização de pelo menos um ensaio de array CGH. A comparação de DNA extraído pelos dois protocolos otimizados não revelou diferenças significativas entre si, e, como tal, optou-se por adotar, na estratégia de extração, o protocolo com a melhor relação custo/benefício. A validação da estratégia estudada em 10 amostras de líquido amniótico revelou valores de quantidade e qualidade de DNA que permitem a realização de array CGH para os volumes iniciais de líquido testados.

Os resultados deste trabalho reforçam a importância da tecnologia de array CGH em DPN e demonstram uma estratégia de extração, concentração e purificação de DNA, partindo de líquido amniótico direto recolhido a partir das 15 semanas de gestação com parâmetros de quantidade/qualidade que permitem a realização de array CGH.

Abstract

The implementation of array CGH as a routine in prenatal diagnosis has recently been discussed. However, this introduction needs a proper strategy that ensures obtaining quality DNA directly from fetal samples. This study a strategy was outlined and optimized for extraction and purification of DNA from uncultured amniotic fluid, which allowed for array CGH in prenatal diagnosis.

Two DNA extraction protocols were selected, optimized and compared in order to determine which of them had better yield and quality. The quality control of the DNA obtained was done using spectrophotometry, the analysis of the degree of fragmentation by running agarose gel and a validation of results through a comparative application of array CGH 180K platform. The strategy that assured better concentrations of quality DNA for analysis was validated using 10 samples of amniotic fluid directly.

The study shows that the majority of the samples, particularly those with a smaller number of weeks of pregnancy, need to complete an additional protocol for concentration and purification of DNA, in addition to the DNA extraction protocol, in order to ensure the minimum parameters of quantity and quality to perform at least one test array CGH. A comparison of DNA extracted by the two optimized protocols revealed no significant differences between them, and so, it was decided to adopt the least expensive protocol in the strategy of extraction. The validation of the strategy studied in 10 amniotic fluid samples revealed values of quantity and quality of DNA that allow to carry out the array CGH for the initial liquid volumes tested.

The results of this study reinforce the importance of array CGH technology in prenatal diagnosis and demonstrate a strategy of extraction, concentration and purification of DNA, from direct amniotic fluid collected from 15 weeks of gestation with parameters of quantity / quality that enable to carry out of array CGH.

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice Geral.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xi
1-Introdução.....	1
1.1- Diagnóstico pré-natal	2
1.1.1- Considerações Gerais	2
1.1.2- Indicações clínicas para a realização do diagnóstico pré-natal invasivo	4
1.1.3- Exames não invasivos em diagnóstico pré-natal	6
1.1.4- Exames invasivos em diagnóstico pré-natal	11
1.2 - Tecnologias de Citogenética e Genómica em Diagnóstico Pré-Natal.....	13
1.2.1 – Citogenética Convencional.....	14
1.2.2 – Citogenética Molecular (<i>Fluorescence in situ</i> hybridization).....	15
1.2.3 – Biologia Molecular (<i>Quantitative fluorescence polymerase chain reaction</i>)	16
1.2.4 - Biologia Molecular (Multiplex ligation-dependent probe amplification). 17	
1.3 – Tecnologias de <i>microArrays</i>	17
1.3.1 –Comparative Genome Hybridization Array	19
1.3.2 – <i>Comparative Genome Hybridization Array</i> como teste de primeira linha no diagnóstico pós-natal	21
1.4 - Implementação do <i>Comparative Genome Hybridization Array</i> no Diagnóstico pré-natal	23
1.4.1 – Problemática da implementação do <i>Comparative Genome Hybridization Array</i> no diagnóstico pré-natal	25
1.5 – Perspetivas futuras em diagnóstico pré-natal	26
2-Objetivos	29

3-Materiais e Métodos	31
3.1 – Material Biológico.....	32
3.2 – Metodologias para a extração de DNA.....	33
3.3- Quantificação da amostra por espectrofotometria	34
3.4 – Protocolo da Roche®.....	35
3.4.1 – Otimização do Protocolo da Roche®	36
3.5 – Protocolo da Qiagen®	36
3.5.1 – Otimização do Protocolo da Qiagen®.....	37
3.6 – Protocolo de concentração e purificação DNA - <i>Clean Concentrator kit (Zymo Research, CA)</i>	38
3.6.1 – Otimização do Protocolo da Zymo®.....	38
3.7 – Eletroforese em Gel de Agarose	39
3.8 – Comparative Genome Hybridization Array	40
4-Resultados	42
4.1- Otimização do Protocolo da Roche®.....	43
4.1.1-Avaliação da pré-digestão a 55°C durante 30 minutos após adição de <i>proteinase K</i>	43
4.2-Otimização do Protocolo da Zymo®	44
4.2.1-Ajustamento do volume de eluição	44
4.2.2-Ajustamento da temperatura de eluição	45
4.3-Avaliação espectrofotométrica do DNA extraído pelo Protocolo da Roche® após o Protocolo da Zymo®	46
4.4- Avaliação por espectrofotometria da qualidade do DNA extraído pelo Protocolo da Qiagen® após o Protocolo da Zymo®.....	49
4.5-Avaliação da importância do Protocolo da Zymo® por aCGH	51
4.6-Otimização do Protocolo da Qiagen®	62
4.6.1-Ajustamento do volume de eluição	63
4.6.2-Avaliação da pré-digestão a 55°C durante 30 minutos.....	63
4.7-Comparação dos métodos de extração	64
4.7.1-Resultados da comparação espectrofotométrica dos dois protocolos otimizados.....	65
4.7.2- Resultados da comparação por aCGH dos protocolos otimizados.....	65
4.8-Avaliação da fragmentação do DNA por gel de agarose	69
4.9-Aplicação de <i>Array comparative genomic hybridization</i> em amostras de líquido amniótico direto do Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC.....	70

5-Discussão de Resultados	72
5.1 - Utilidade do <i>Array comparative genomic hybridization</i> em diagnóstico pré-natal	73
5.2 - Importância da qualidade do DNA a ser utilizado em <i>Array comparative genomic hybridization</i>	76
5.3- Validação das otimizações em amostras de líquido amniótico direto.....	82
6-Conclusões	84
6-Bibliografia	86

Índice de Figuras

Figura 1- A possibilidade de associação entre alterações num gene e uma determinada patologia permite fazer o seu diagnóstico numa etapa mais precoce possibilitando uma nova abordagem terapêutica	3
Figura 2- Associação entre o aumento do risco do feto ter uma doença genética e a idade materna	5
Figura 3- Avaliação da translucência da nuca por ecografia.	8
Figura 4- Imagem da análise ecográfica da presença ou ausência dos ossos do nariz. . .	8
Figura 5- Comparação do período de realização dos testes de carácter invasivo com os vários testes de carácter não invasivo	9
Figura 6- Testes de carácter invasivo utilizados no DPN.	11
Figura 7- Exemplo de um cariótipo humano obtido por bandeamento GTG.	14
Figura 8- Análise de anomalias cromossómicas utilizando a técnica FISH.	16
Figura 9- Comparação do ano de aparecimento de algumas das tecnologias de diagnóstico.	19
Figura 10- Hibridização competitiva da amostra teste e amostra controlo marcadas com diferentes fluorocromos e análise do ganho ou perda de DNA por parte da amostra teste Várias etapas da realização da tecnologia de aCGH	20
Figura 11- Nova estratégia de decisão de diagnóstico pós-natal de indivíduos com atraso no desenvolvimento, perturbações do espectro do autismo e malformações congénitas múltiplas após introdução do aCGH como tecnologia de primeira linha no diagnóstico pós-natal.	22
Figura 12- Exemplo de uma das metodologias utilizadas em testes de Pré-Natal Não Invasivo para identificação de trissomia 21.	27
Figura 13- Esquema ilustrativo da alteração testada em relação ao protocolo <i>standard</i>	36
Figura 14- Gráficos de absorvância e respetivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA530/13 antes e após aplicação do Protocolo da Zymo®.	47
Figura 15- Gráficos de absorvância e respetivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA531/13 antes e após aplicação do Protocolo da Zymo®.	48
Figura 16- Gráficos de absorvância e respetivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA551/13 antes e após aplicação do Protocolo da Zymo®.	49
Figura 17- Gráficos de absorvância e respetivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA21/14 antes e após aplicação do Protocolo da Zymo®.	50
Figura 18- Gráficos de absorvância e respetivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA759/13 antes e após aplicação do Protocolo da Zymo®.	51
Figura 19- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA30/13 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH.	53

Figura 20- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA30/13 em cultura após realização do Protocolo da Zymo® em aCGH.....	54
Figura 21- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra CV5/14 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH..	55
Figura 22- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra CV5/14 em cultura após realização do Protocolo da Zymo® em aCGH.....	56
Figura 23- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA774/12 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH em aCGH.	57
Figura 24- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA774/12 em cultura após realização do Protocolo da Zymo® em aCGH.....	58
Figura 25- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra Fb33/13 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH em aCGH.	59
Figura 26- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra Fb33/13 em cultura após realização do Protocolo da Zymo® em aCGH.....	60
Figura 27- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA759/13 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH em aCGH.	61
Figura 28- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA759/13 em cultura após realização do Protocolo da Zymo® em aCGH.....	62
Figura 29- Perfil de resultados em aCGH da amostra LA141/14 extraído pelo Protocolo da Roche® em aCGH s.	66
Figura 30- Perfil de resultados de aCGH da amostra LA141/14 extraído pelo Protocolo da Qiagen® em aCGH.....	66
Figura 31- Cariótipo do LA524/12 com t(2;5) e inv(3)	68
Figura 32- Perfil de resultados de aCGH da amostra LA524/12 em aCGH.....	69
Figura 33- Gel de agarose a 1,5% para avaliação do grau de fragmentação do DNA..	70

Índice de Tabelas

Tabela 1- Conjunto de indicações que indicam a necessidade de realização de DPN de carácter invasivo.	6
Tabela 2- Exemplos de malformações congénitas que podem ser detetadas por análise ecográfica.....	7
Tabela 3- Associação entre os níveis de α -fetoproteína, estriol não conjugado e gonadotrofina coriônica humana e o risco do feto ser portador de trissomias 21 ou 18e defeitos no tubo neural.	10
Tabela 4- Valor da taxa de deteção dos testes de rastreio	10
Tabela 5- Características das técnicas de DPN de carácter invasivo	13
Tabela 6- Resultados de um estudo de comparação da capacidade de deteção de alterações com consequências fenotípicas utilizando as técnicas de citogenética convencional, QF-PCR, MLPA e <i>microarrays</i>	25
Tabela 7- Amostras utilizadas na realização deste estudo e indicações clínicas para a realização de estudos citogenéticos.	32
Tabela 8- Avaliação bibliográfica dos métodos de extração de DNA utilizados em estudos reportados de aCGH em DPN.	34
Tabela 9- Valores da concentração e volume das 5 amostras corridas em gel de agarose a 1,5% e volumes de corante e água colocados em cada poço do gel.	40
Tabela 10- Comparação dos valores da concentração e pureza da amostra de DNA final após pré-digestão em relação ao protocolo <i>standard</i>	43
Tabela 11- Valores da concentração, pureza e rendimento antes e após a realização do Protocolo da Zymo®, utilizando diferentes volumes de eluição.....	44
Tabela 12- Valores da concentração antes e depois da aplicação do Protocolo da Zymo® e rendimento da reação, resultantes da realização deste protocolo com temperatura de eluição de 70 e 80°C.	45
Tabela 13- Amostras de líquido amniótico e respetivas indicações e tempo de gestação utilizadas na avaliação espectralométrica do DNA extraído pelo Protocolo da Roche® seguido do Protocolo da Zymo®.....	46
Tabela 14- Amostras de líquido amniótico e respetivo tempo de gestação e indicações, utilizadas na avaliação espectralométrica do DNA extraído pelo Protocolo da Qiagen® seguido do Protocolo da Zymo®.....	50
Tabela 15- Amostras utilizadas na avaliação da influência do Protocolo da Zymo® por aCGH.	52
Tabela 16- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).....	54
Tabela 17- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).....	56

Tabela 18- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).....	58
Tabela 19- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).....	60
Tabela 20- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).....	62
Tabela 21- Valores da concentração e pureza da amostra de DNA final para os dois volumes de eluição utilizados.....	63
Tabela 22- Valores da concentração e pureza da amostra de DNA final sem e com pré-digestão.....	64
Tabela 23- Comparação dos valores de concentração e pureza de amostras extraídas pelos dois métodos de extração (Roche® e Qiagen®).....	65
Tabela 24- Comparação dos valores do parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas) entre amostras extraídas pelo Protocolo da Roche® e Protocolo da Qiagen®.	67
Tabela 25- Valores da avaliação espectralométrica da quantidade e pureza do DNA extraído de líquido amniótico direto de acordo com a estratégia otimizada.	71

Lista de Símbolos e Abreviaturas

aCGH - *Array comparative genomic hybridization*

ACOG – American College of Obstetricians and Gynecologists

AFP - α -fetoproteína

ASD – Alterações no espectro do autismo

BAC - *Bacterial artificial chromosomes*

CMA - *Chromosome MicroArray*

CNVs - *Copy Number Variation*

CVS - Vilosidades coriônicas

Cy3 - Cianina 3

Cy5 – Cianina 5

DD - atraso no desenvolvimento

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

DLRS - *Derivative Log Ratio Spread*

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DPN - Diagnóstico pré-natal

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

FMUC - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

HCG - Gonadotrofina coriônica humana

HCl – Ácido clorídrico

Hg19 – Versão 19 do genoma humano

ISCA - *International Standard Cytogenomic Array*

Kb - Quilobase(s)

LA - Líquido amniótico

LCG - Laboratório de Citogenética e Genómica

Log - Logarítmo

MLPA - *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

Mb – Megabase (s)

MCA – Anomalias congénitas múltiplas

NTD - Defeitos no tubo neural

OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*

PAPP-A - Proteína Plasmática Associada à Gravidez

pb - pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PGH - Projeto do Genoma Humano

QF-PCR - *Quantitative fluorescence polymerase chain reaction*

Rpm- rotações por minuto

SNP - *Single Nucleotide Polymorfism*

SNV - *Single Nucleotide Variants*

uE3 - estriol não conjugado

VOUS - *Variant of uncertain significance*

β -hCG - Subunidade β da gonadotrofina coriônica humana

μ L - microlitros

INTRODUÇÃO

1.1- Diagnóstico pré-natal

1.1.1- Considerações Gerais

O século XX ficou marcado por uma notável expansão da Ciência espelhada num enorme desenvolvimento de áreas como a Genética, tendo a Genética Médica em particular atingido um papel de reconhecimento como a especialidade da Medicina que lida com o diagnóstico, tratamento e abordagem de distúrbios considerados hereditários. Toda a expansão desta ciência teve começo em Abril de 1953, quando James Watson e Francis Crick anunciaram a descoberta da estrutura em dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA), que se viria a revelar como ponto de partida para o diagnóstico e estudo das síndromes hereditárias que afetam alguns seres humanos (Roberts *et al.*, 2001).

Um outro marco da História da Ciência, é o Projeto do Genoma Humano (PGH), finalizado em Abril de 2003 (National Human Genome Research Institute, 2014), teve como principal objetivo o mapeamento e compreensão de todos os genes presentes no genoma humano (Genome Research Institute, 2014).

Tal como a descoberta do DNA, também o PGH revelou enormes benefícios no desenvolvimento de outras áreas, destacando-se o desenvolvimento das técnicas de diagnóstico e tratamento de anomalias genéticas, aparecimento de novos fármacos, surgimento do conceito de “terapia génica” e novos achados para a investigação do cancro (Figura 1) (Collins e McKusick, 2001).

O aumento do conhecimento no âmbito da genética, que tornou possível a associação entre determinado tipo de patologia e o gene que nela se encontra mutado ou alterado, fez com que por exemplo sensivelmente a partir do ano de 1990, o conceito promissor de “terapia génica” passasse a ser testado em doenças monogénicas. O crescente aumento da exploração deste tema, levou a que em 1994 fossem aprovados mais de 100 protocolos de ensaios clínicos de terapia génica (Connor e Ferguson-Smith, 1997). Atualmente estima-se que haja cerca de 1800 ensaios clínicos de terapia génica aprovados em todo o mundo estando a sua maior parte (65%) associados ao tratamento do cancro (Wirth *et al.*, 2013).

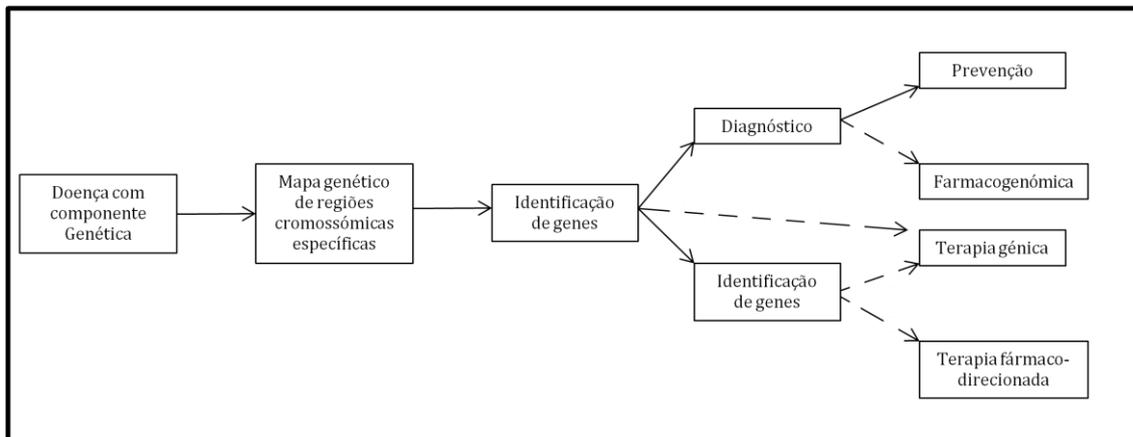


Figura 1- A possibilidade de associação entre alterações num gene e uma determinada patologia permite fazer o seu diagnóstico numa etapa mais precoce possibilitando uma nova abordagem terapêutica (Adaptado de Collins e McKusick, 2001).

A Genética Molecular foi responsável ao longo destes últimos anos pelo desenvolvimento de novas tecnologias laboratoriais que foram gradualmente aplicadas na área Médica, permitindo por exemplo que atualmente seja possível identificar a suscetibilidade de um indivíduo desenvolver uma determinada patologia através da análise de alguns marcadores genéticos presentes no seu genoma (Collins e McKusick, 2001).

Apesar de todos estes avanços há muitas doenças genéticas que permanecem sem cura nem tratamento e conseqüentemente o que está mais disponível nestes casos é a capacidade de diagnosticar alterações genéticas no feto, ou seja o diagnóstico pré-natal (DPN). O DPN invasivo começou a ser utilizado no ano de 1966 quando Steele e Breg demonstraram que era possível fazer a análise dos cromossomas fetais partindo de uma cultura de células de líquido amniótico (Steele, *et al.*, 1966), sendo em 1969 detetada pela primeira vez uma trissomia 21 num feto através da amniocentese. Mais tarde, foi demonstrada que esta análise de alterações genéticas também podia ser feita partindo de amostras de vilosidades coriônicas (ACOG, 2013).

O DPN permite a deteção de anomalias ou problemas no feto correspondendo a uma série de testes que vão da análise molecular à do número e estrutura do cromossoma que permitem recolher informações acerca do feto poder ser ou não portador de uma determinada mutação ou alteração que se encontra associada a uma anomalia genética (Binns e Hsu, 2002).

Os resultados provenientes da realização do DPN permitem que após consultas de aconselhamento genético, seja tomada uma decisão acerca da gestão da gravidez.

Deste modo, a realização do DPN contribui também para uma diminuição da ansiedade dos pais, em gravidezes de alto risco. Por outro lado, permite também que em situações na qual os pais decidam prosseguir com uma gravidez, na qual o feto é afetado por uma doença genética, antecipar a estratégia de tratamento da mesma (Nussbaum, *et al.*, 2004). Em caso de ser detetada uma cromossomopatia ou malformação ecográfica grave é oferecido ao casal, após avaliação da situação pela comissão de ética e técnica, a opção da interrupção médica da gravidez. Esta pode ser realizada até às 24 semanas em caso de haver seguros motivos de que o feto possa vir a sofrer de uma doença incurável grave ou malformação fetal, segundo o Artigo nº 142 da Lei nº16/2007 (Diário da República, 2007).

Durante o primeiro trimestre é realizada a primeira fase dos exames de DPN, de carácter não invasivo: a ecografia e o rastreio bioquímico, cujos resultados irão influenciar a necessidade ou não de realização do DNA de carácter invasivo (Pennings *et al.*, 2009).

As técnicas de DPN invasivo que podem ser utilizadas são: a amniocentese, a biópsia do trofoblasto e a cordocentese. Apesar de diferentes entre si estas técnicas têm em comum a finalidade de obtenção de uma amostra biológica do feto, para análise por técnicas de citogenética, genética molecular e genómica, permitindo a avaliação da possibilidade do feto sofrer de alguma alteração genética (Nussbaum *et al.*, 2004).

1.1.2- Indicações clínicas para a realização do diagnóstico pré-natal invasivo

Desde a década de 70 que foi estipulado um conjunto de indicações, que no caso de se manifestarem numa determinada gravidez, permitem considerar um caso como uma gravidez risco. De entre as indicações clínicas para a realização do DPN de carácter invasivo destaca-se a idade materna avançada. O aumento da idade da grávida é diretamente proporcional aos riscos que o feto corre de ser portador de uma aneuploidia cromossómica. Em Portugal assume-se que acima dos 35 anos a idade materna é considerada de risco (Figura 2) (Nussbaum *et al.*, 2004).

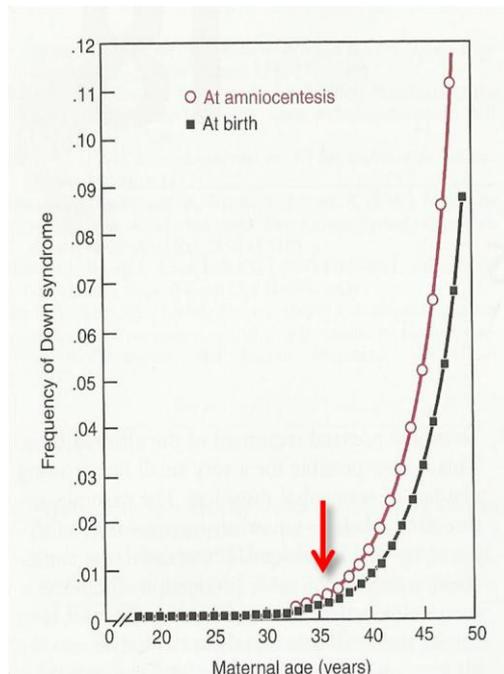


Figura 2- Associação entre o aumento do risco do feto ter uma doença genética e a idade materna (Adaptado de Nussbaum *et al.*, 2004)

De entre as outras indicações clínicas destaca-se: a existência de um filho/feto anterior portador de uma dada anomalia cromossômica; situações na qual um dos pais é portador de um rearranjo cromossômico equilibrado; histórico familiar de X-frágil; risco elevado para a ocorrência de uma doença de causa monogénica; anomalias ou sinais de alerta detetados no exame ecográfico (por exemplo translucência da nuca) e ansiedade materna (Tabela 1) (Rooney, 2001; Nussbaum *et al.*, 2004; Valayatham *et al.*, 2013).

Por fim encontra-se a avaliação dos resultados dos rastreios bioquímicos à qual a mãe é submetida, feita através da quantificação de proteínas cuja variação aponta para um maior risco do feto ser afetado (Maya *et al.*, 2010).

É ainda importante ter em conta que em caso de ser proposto pela parte médica, a realização de DPN invasivo carece da autorização do casal ou da mãe.

Tabela 1- Conjunto de indicações que indicam a necessidade de realização de DPN de carácter invasivo (Rooney, 2001; Nussbaum *et al.*, 2004; Maya *et al.*, 2010; Valayatham *et al.*, 2013).

Indicações para a realização do DPN de carácter invasivo
<ul style="list-style-type: none">• Idade materna igual ou superior a 35 anos;• Filho/feto anterior com anomalia cromossómica ou problema genético;• Histórico familiar de X-frágil;• Risco elevado para a ocorrência de uma doença de causa monogénica;• Nado morto anterior com anomalia cromossómica potencialmente viável;• Pais com rearranjo cromossómico, com mosaicismo ou com aneuploidia dos cromossomas sexuais;• Rastreio bioquímico positivo no sangue materno;• Anomalias detetadas na ecografia com alerta indicativo de um risco aumentado de anomalia cromossómica do feto;• Resolução de mosaicismo fetal detetado num estudo anterior;• Risco de síndrome de instabilidade cromossómica;• Ansiedade materna;• Infecção materna por microorganismo. Ex: toxoplasmose, rubéola...

1.1.3– Exames não invasivos em diagnóstico pré-natal

Durante o processo normal de gravidez e no decorrer das primeiras consultas de Obstetrícia procede-se à realização dos chamados testes de rastreio. De entre estes testes destacam-se o rastreio bioquímico e o exame ecográfico que são juntamente com a idade materna combinados entre si e usados, para fazer um cálculo do risco de uma gravidez, que é mais tarde utilizado na avaliação da necessidade de se realizarem testes de DPN de carácter invasivo (Connor e Ferguson-Smith, 1997).

1.1.3.1- Exame ecográfico

O exame ecográfico que deteta defeitos morfológicos em aproximadamente 5% das gestações, é pelo menos realizado 3 vezes em cada gravidez, durante cada um dos trimestres, com o objetivo geral de fazer uma avaliação de marcadores que permitem a identificação de sinais suspeitos de anomalia fetal (Viaux-Savelon *et al.*, 2012).

A ecografia de primeiro trimestre é realizada preferencialmente entre as 11 e as 13 semanas tendo como objetivos: (1) verificar se o feto está dentro do útero ou se a gravidez é ectópica; (2) determinar o número de fetos; (3) fazer a determinação do tempo exato de gravidez; (4) observar algumas estruturas fetais e (5) identificar alguns marcadores anatómicos importantes no rastreio de algumas patologias. Já durante o segundo trimestre a ecografia é realizada entre as 20 e as 22 semanas de gestação sendo mais pormenorizada, de modo a fazer a deteção da presença de algumas anomalias fetais (Connor e Ferguson-Smith, 1997) (Tabela 2).

Por fim, a ecografia do 3º trimestre é realizada entre as 28 e 32 semanas de gestação e serve essencialmente para avaliar o crescimento fetal, estimar o peso do feto e fazer uma nova repetição da avaliação morfológica (Nussbaum *et al.*, 2004).

Tabela 2- Exemplos de malformações congénitas que podem ser detetadas por análise ecográfica (Adaptado Connor e Ferguson-Smith, 1997).

Estrutura anatómica	Anomalia genética
Sistema Nervoso Central	Anencefalia, Espinha bífida, Hidrocefalia, Microcefalia, Encefalocelo
Membros	Polidactilia, Osteogénese imperfeita, Malformação congénita
Coração	Cardiopatia congénita
Rim	Agenesia renal, Obstrução do trato urinário, Doença renal poliquística
Trato Gastrointestinal	Atresia duodenal, Defeitos da parede abdominal, Hérnia diafragmática

O aumento da translucência da nuca (Figura 3) é um dos marcadores avaliados entre as 11 e as 13 semanas com recurso a exame ecográfico. Nesta fase da gestação o valor normal da translucência nuca deve ser inferior a 3,5 mm (Callaway *et al.*, 2013). A combinação entre a avaliação da translucência da nuca e marcadores bioquímicos ambos avaliados no decorrer do primeiro trimestre tem o potencial de detetar mais de 80% dos fetos que com trissomia 21, ou outra das trissomias mais comuns numa fase bastante precoce da gravidez (Crossley *et al.*, 2002).

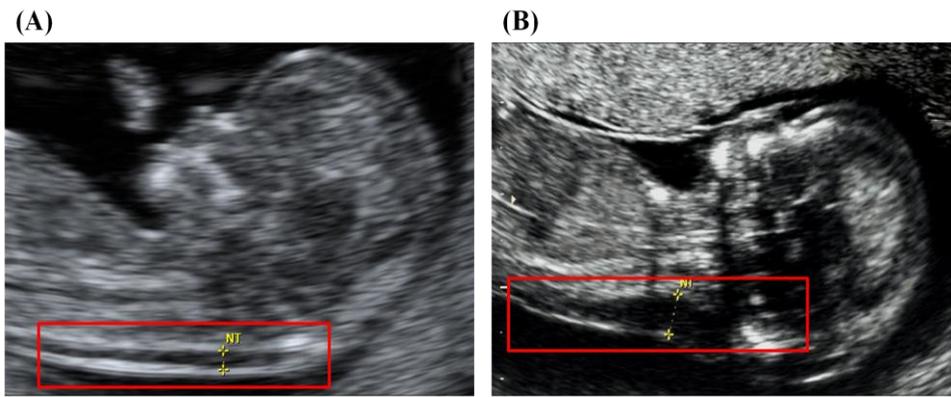


Figura 3- Avaliação da translucência da nuca por ecografia. O feto em (A) revela valores de translucência da nuca normais ($< 3,5\text{ mm}$). Feto (B) apresenta valores de translucência da nuca acima do normal ($> 3,5\text{ mm}$) (Fonte: Adaptado Fetal Medicine, 2014).

Mais recentemente foi proposto um segundo marcador ecográfico avaliado entre a 11^a e a 24^a semana de gestação, que se baseia na análise da presença ou ausência dos ossos do nariz. Estudos tendo como base o exame ecográfico revelam que no caso particular da trissomia 21, 65% dos fetos apresentam nariz em tamanho reduzido ou até ausência do mesmo (Kagan *et al.*, 2009) (Figura 4). A avaliação desta estrutura anatômica durante a realização do exame ecográfico entre a 11^a e a 14^a semana de gestação, faz com que a capacidade de detecção de fetos com trissomia 21 possa atingir valores acima dos 95% (Wieacker e Steinhard, 2010).

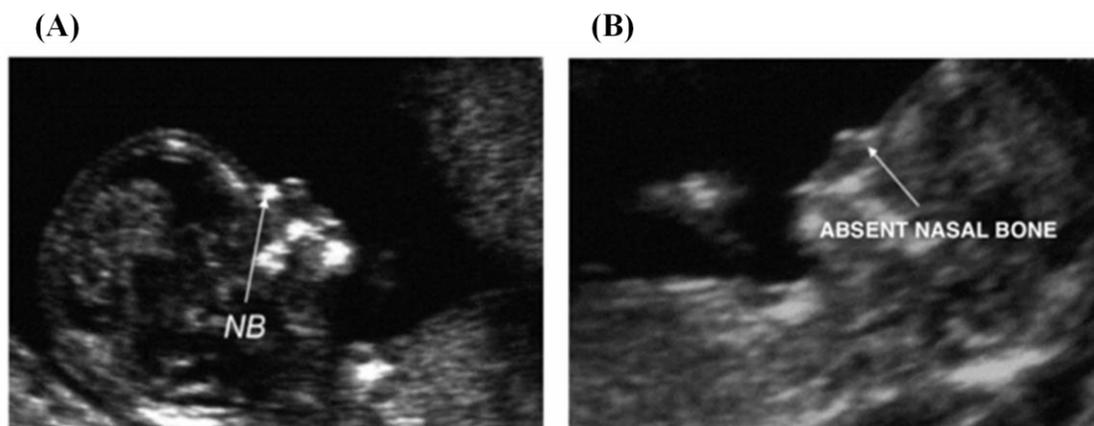


Figura 4- Imagem da análise ecográfica da presença ou ausência dos ossos do nariz presentes. (B) demonstra um feto com ausência de ossos do nariz (Adaptado Dellaglio, 2004).

1.1.3.2- Rastreio Bioquímico

O rastreio bioquímico pode ser realizado durante o 1º ou 2º trimestre gestacional e tem como objetivo quantificar a concentração de algumas proteínas no sangue materno, cuja variação em relação ao valor normal aponta para a suspeita da existência de anomalias fetais.

O rastreio bioquímico de 1º trimestre, que não permite a deteção de defeitos no tubo neural, é realizado preferencialmente a partir da 8ª semana de gestação (Figura 5) (Summers *et al.*, 2007), tendo como objetivo a avaliação dos níveis de Proteína Plasmática Associada à Gravidez (PAPP-A do inglês: *Pregnancy-Associated Plasma Protein A*) e ainda da subunidade β da gonadotrofina coriônica humana (β -hCG do inglês: *human chorionic gonadotropin*) (Binns e Hsu, 2002; Nussbaum *et al.*, 2004; Pennings *et al.*, 2009).

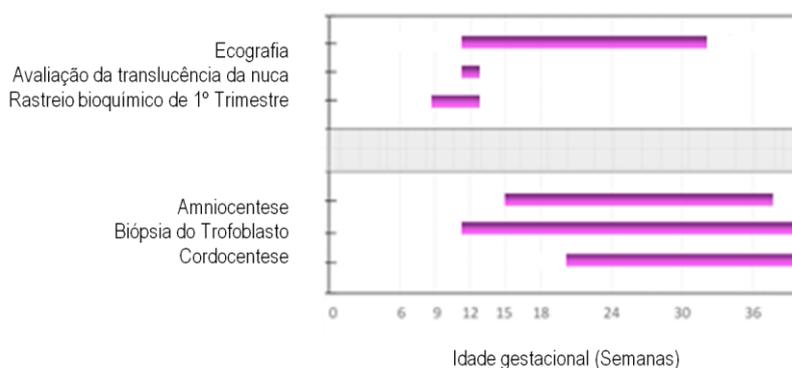


Figura 5- Comparação do período de realização dos testes de carácter invasivo com os vários testes de carácter não invasivo (Adaptado Bartholdi, 2013)

Já em relação ao rastreio bioquímico do 2º trimestre, é realizado a partir da 14ª, tendo como objetivo, quantificar os valores da α -fetoproteína (AFP), inibina-A e estriol não conjugado (uE3), para além das proteínas também quantificadas no rastreio de 1º trimestre (Summers *et al.*, 2007). Estas 3 proteínas apenas quantificadas durante o 2º trimestre são consideradas biomarcadores importantes no cálculo do risco do feto ter alguma das trissomias mais comuns ou defeitos no tubo neural (Tabela 3) (Binns e Hsu, 2002; Pennings *et al.*, 2009).

Os resultados provenientes da quantificação de proteínas no soro materno são combinados juntamente com o resultado dos outro exame não invasivo e idade

materna, permitindo deste modo fazer a inclusão da gravidez num de dois grupos: grupo de risco elevado ou grupo de baixo risco. Esta divisão irá mais tarde ser fundamental para tomar a decisão de realização ou não de testes de DPN de carácter invasivo.

Tabela 3- Associação entre os níveis de α -fetoproteína, estriol não conjugado e gonadotrofina coriónica humana e o risco do feto ser portador de trissomias 21 ou 18 e defeitos no tubo neural (Adaptado Nussbaum *et al.*, 2004).

	AFP	uE3	β -hCG
Risco aumentado de Síndrome de Down	↓	↓	↑
Trissomia do 18	↓	↓	↓
Defeitos no tubo neural	↑	Não-aplicável	Não-aplicável

A principal desvantagem dos exames de rastreio são os falsos positivos, situações em que são identificados como casos de risco fetos que mais tarde se vêm a revelar saudáveis (Wapner *et al.*, 2003).

A possibilidade de deteção de indivíduos doentes recorrendo a testes não invasivos, varia tendo em conta o teste de rastreio e o trimestre na qual o teste é realizado (Tabela 4).

Tabela 4- Valor da taxa de deteção dos testes de rastreio (Fonte: Sociedade Portuguesa de Obstetrícia e Ginecologia, 2010)

Teste de rastreio	Taxa de deteção
Rastreio bioquímico de 1º trimestre	±70%
Rastreio ecográfico de 1º trimestre	±75%
Rastreio combinado de 1º trimestre	±85%
Rastreio bioquímico de 2º trimestre	±65%
Rastreio integrado*	±90%

*Envolve a medição da translucência da nuca, concentração da PAPP-A entre a 11ª e 14ª semana de gestação e ainda concentração da AFP, uE3, β HCG e inibina-A entre a 15ª e 20ª semana de gestação

1.1.4- Exames invasivos em DPN

Atualmente distinguem-se 3 métodos de DPN de carácter invasivo: a amniocentese, a biópsia do trofoblasto e a cordocentese (Figura 6). Todos têm em comum a finalidade de obter uma amostra fetal para análise citogenética ou genética, sendo que a opção da realização da técnica é baseada sobretudo nas semanas de gestação da gravidez em questão e nas indicações (Machado *et al.*, 2012).

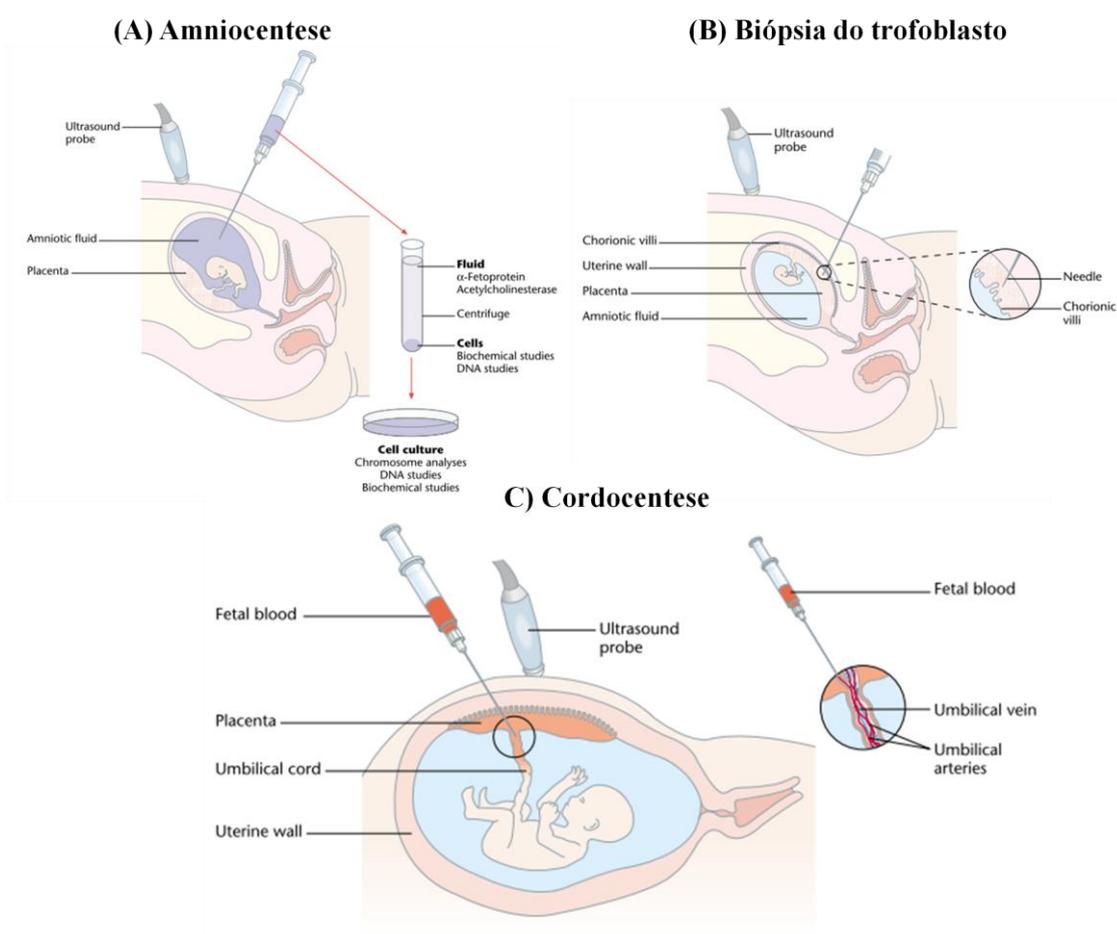


Figura 6- Testes de carácter invasivo utilizados no DPN (Binns e Hsu, 2002).

1.1.4.1- Amniocentese

A amniocentese foi pela primeira vez realizada no ano de 1952 com a finalidade de diagnosticar a doença hemolítica em pré-natal. Porém, no decorrer do final da década de 60, começou a ser utilizada com o objetivo de obtenção de um cariótipo fetal (Horger *et al.*, 2001). É atualmente realizada, na maioria dos casos, a

partir das 15 semanas de gestação de modo a que seja obtida uma amostra de líquido amniótico, que é por sua vez constituído por células que derivam da pele, rins, bexiga, intestino e outros tecidos fetais (Rooney, 2001). Esta amostra de líquido pode ser utilizada para a realização de um cariótipo fetal a partir de células provenientes de cultura celular (Nussbaum *et al.*, 2004).

Relativamente ao procedimento, a amniocentese consiste na inserção de uma agulha na região abdominal da mãe, que sob a orientação ecográfica atinge a cavidade amniótica. Neste local procede-se a uma aspiração de uma quantidade de líquido amniótico, que corresponde a cerca de 1 mL por cada semana de gestação (Horger *et al.*, 2001; Binns e Hsu, 2002).

Considerado atualmente como o teste de carácter invasivo do DPN mais utilizado tem como principal complicação o facto de se encontrar associado a um risco de aborto estimado entre 0,5 e 1% (Tongsong *et al.*, 2000).

1.1.4.2- Biópsia do trofoblasto

A biópsia do trofoblasto é outra das técnicas invasivas onde se procede à colheita de uma amostra fetal, neste caso vilosidades coriônicas - CVS (do inglês: *Chorionic villus sampling*), a partir de uma pequena amostra da placenta. É usada no DPN desde a década de 70 e pode ser realizada entre as 11 e 12 semanas de gestação (Gardner e Sutherland, 2004).

A principal vantagem deste teste face à amniocentese é que a biópsia do trofoblasto permite a obtenção de resultados num período mais inicial da gravidez. Porém, este teste encontra-se associado a um risco de aborto de cerca de 1%. (Nussbaum *et al.*, 2004). Além disso, esta técnica apresenta ainda outras limitações na qual se destaca o risco elevado de haver contaminação materna e ainda problemas em casos de existência de mosaicismo placentário (Antsaklis *et al.*, 2002).

1.1.4.3- Cordocentese

O outro teste invasivo também utilizado no DPN é a cordocentese, cuja metodologia se baseia na obtenção de sangue fetal diretamente do cordão umbilical através de orientação ecográfica. É um tipo de teste realizado numa fase mais avançada da gravidez, entre as 20 e as 23 semanas de gestação, sendo considerado um

método bastante mais arriscado comparativamente aos outros testes de caráter invasivo também utilizados no DPN (procedimento associado a uma perda fetal estimada entre 2 a 3 %) (Gardner e Sutherland, 2004). Esta técnica pode ainda ser utilizada como forma de diagnosticar doenças hematológicas através da medição das variações de determinados fatores sanguíneos fetais (Binns e Hsu, 2002).

A cordocentese é frequentemente utilizada em casos dos resultados fornecidos por outras técnicas não serem esclarecedores ou quando é necessário um diagnóstico mais rápido face às semanas de gestação e prazo legal para a interrupção médica da gravidez (Wieacker e Steinhard, 2010).

Tabela 5- Características das técnicas de DPN de carácter invasivo (Tongsong *et al.*, 2000; Binns e Hsu, 2002; Nussbaum *et al.*, 2004)

	Amniocentese	Biópsia do Trofoblasto	Cordocentese
Período de realização	A partir da 15ª semana de gestação	A partir da 11ª semana de gestação	A partir da 20ª semana de gestação
Risco associado	0,5-1%	1%	1-2%
Vantagens	-Baixo risco de perda fetal (comparativamente a outros procedimentos invasivos) -A possibilidade de contaminação materna é bastante reduzida	-Permite obter resultados numa fase mais precoce da gestação	-Possibilidade de ser realizada numa fase mais tardia da gravidez -Permite a obtenção mais rápida do cariótipo (3-4 dias)
Desvantagens	-A realização de um cariótipo partindo de líquido amniótico é demorada (10-14 dias)	-Problema associado ao mosaicismos placentário -Risco elevado de contaminação materna	-Maior risco associado ao procedimento -Risco de contaminação materna

1.2 - Tecnologias de Citogenética e Genómica em Diagnóstico Pré-Natal

A análise do cariótipo por bandagem GTG foi introduzida no DPN durante a década de 60. Ao longo dos anos, aliado a um crescente desenvolvimento da ciência, novas técnicas surgiram tais como: a técnica de FISH (do inglês: *Fluorescence in situ hybridization*), a técnica de QF-PCR (do inglês: *Quantitative fluorescence polymerase chain reaction*, a técnica do MLPA (do inglês: *Multiplex ligation-dependent probe amplification*) e a técnica de aCGH (do inglês: *Array comparative genomic hybridization*), tendo em comum a particularidade de aumentar a capacidade do DPN

em detetar alterações cromossómicas que a citogenética convencional não tem capacidade de detetar (Armengol *et al.*, 2012).

1.2.1 – Citogenética Convencional

A Citogenética Convencional, aplicada no DPN a partir do ano de 1966 (Steele *et al.*, 1966), é um tipo de técnica relativamente simples que necessita de uma cultura prévia da amostra a analisar, podendo esta ser de líquido amniótico, vilosidades coriônicas ou sangue fetal. As células são bloqueadas durante a metáfase ou prometáfase, possibilitando uma análise posterior do cariótipo, normalmente por bandagem GTG (Figura 7).

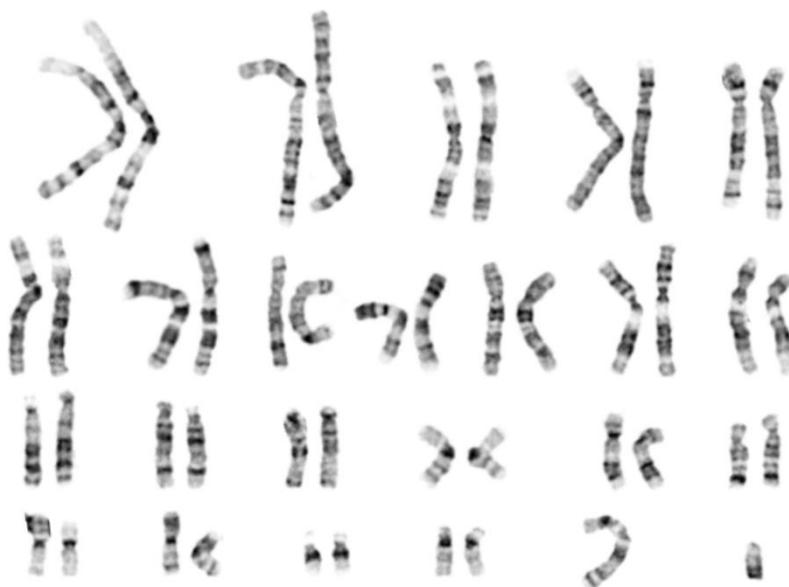


Figura 7- Exemplo de um cariótipo humano obtido por bandeamento GTG (Fonte: Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra)

Na bandagem GTG os cromossomas são inicialmente desnaturados por ação da tripsina e renaturados na presença do Giemsa, permitindo que os cromossomas adquiram um padrão de bandas específico (Evangelidou *et al.*, 2010; Maluf e Riegel, 2011).

Relativamente às vantagens deste tipo de técnica no contexto de DPN destaca-se a capacidade de deteção de alterações de tamanho superior a 3-5 Mb, tendo

normalmente em conta a análise de um número de células superior a 20 (Machado *et al.*, 2012). A relação custo/benefício associada a esta técnica e a capacidade de deteção de alterações citogenéticas equilibradas e de mosaicos de baixa expressão faz com que seja considerada como tecnologia de primeira linha no DPN (De Jong *et al.*, 2010; Savage *et al.*, 2011).

É de referir contudo que esta técnica é detentora de um certo número de limitações tal como o intervalo de tempo que leva até emitir resultados (10-14 dias), devido à necessidade de realização de uma prévia cultura celular (Park *et al.*, 2010) e a impossibilidade de detetar alterações de tamanho inferior a 3-5 Mb, que correspondem a cerca de 15% das doenças genéticas (ACOG, 2009).

1.2.2 – Citogenética Molecular (*Fluorescence in situ hybridization*)

A técnica de FISH (Figura 8) surgiu por volta da década de 80, é uma tecnologia de resolução superior, direcionada e com custos superiores quando comparada com a citogenética convencional. Em caso de ser utilizada para fazer o despiste das aneuploidias mais comuns, esta técnica tem a particularidade de não necessitar da realização de uma cultura celular prévia, podendo ser concluída em 24 horas utilizando células em interfase. Por outro lado em caso do objetivo da aplicação desta técnica ser a identificação da presença ou ausência de uma determinada região no genoma há necessidade de realização de uma cultura celular de modo a que a análise seja feita com as células bloqueadas em metáfase. Em termos de metodologia, permite com recurso a uma vasta gama de sondas fluorescentes, marcar regiões do genoma de relevância clínica significativa, permitindo identificar alterações como microdeleções e microduplicações impossíveis de identificar por citogenética convencional (Bishop, 2010).

Sendo atualmente a única tecnologia de DPN com capacidade de deteção de alterações equilibradas com tamanho inferior a 3-5 Mb, a técnica de FISH tem como principais desvantagens o facto de ser uma técnica dirigida sendo necessária uma suspeita clínica precisa, de modo a que a técnica possa identificar a presença ou

ausência da zona genómica associada à patologia suspeita (Binns e Hsu, 2002). Por outro lado apesar do poder de resolução desta técnica ser superior ao da citogenética convencional, é inferior à resolução atingida por outro tipo de técnicas como a técnica de aCGH (Savola *et al.*, 2007).

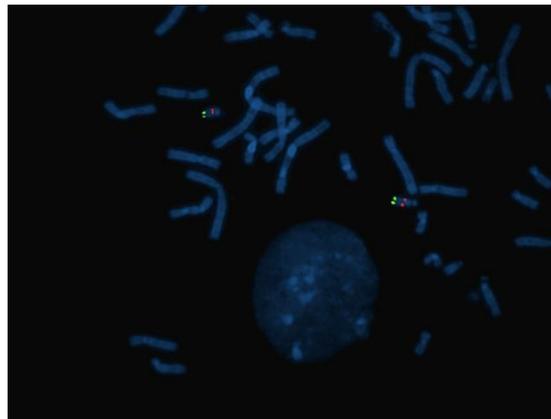


Figura 8- Análise de anomalias cromossómicas utilizando a técnica FISH (Fonte: Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra)

1.2.3 – Biologia Molecular (*Quantitative fluorescence polymerase chain reaction*)

A técnica de QF-PCR é uma técnica que se baseia na amplificação de regiões de interesse através da sua delimitação com *primers* marcados com fluorescência. Tendo em conta que na fase de amplificação a quantidade de produto produzido é proporcional à quantidade de sequência alvo inicial, esta técnica pode ser utilizada na deteção de aneuploidias. Os resultados são obtidos através de uma análise dos picos de fluorescência emitidos pelos fragmentos amplificados, calculando os rácios destes mesmos picos utilizando a sua altura, área ou ambos (Langlois e Duncan, 2011).

Esta técnica tem como vantagens: necessitar de uma baixa quantidade de DNA, ser sensível a níveis de contaminação materna, ser uma técnica bastante automatizada o que faz com que se evitem erros associados ao manuseamento, ser mais barata quando comparado com a citogenética convencional e ter ainda um intervalo reduzido

entre recepção da amostra biológica e emissão de resultados (Nicolini *et al.*, 2004; Bui *et al.*, 2011; Langlois e Duncan, 2011).

Como desvantagens destacam-se a dificuldade ou impossibilidade de obtenção de resultados em situações de alterações equilibradas, mosaicismos ou presença de cromossomas marcadores (Nicolini *et al.*, 2004).

1.2.4 - Biologia Molecular (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*)

A técnica de MLPA é uma tecnologia que envolve um método de quantificação de variações no número de cópias no genoma. Apesar de ter a capacidade de detecção de alterações à escala de um único exão, esta técnica não tem a capacidade de fazer uma análise ao longo de todo o genoma. Tem ainda a particularidade de poder fazer numa só reação a análise de um elevado número de sequências (40-45) (Willis *et al.*, 2012). Destaca-se ainda como vantagens necessitar de uma quantidade de amostra biológica bastante reduzida (cerca de aproximadamente 20 ng de DNA), permitir a emissão de resultados num curto intervalo de tempo e ter uma boa relação custo/benefício (Diego-alvarez *et al.*, 2007; Willis *et al.*, 2012).

Em termos de desvantagens não deteta triploidias e anomalias estruturais equilibradas; revela problemas de contaminação materna e não deteta trissomias parciais em regiões que não são abrangidas pelas sondas nem deteta mosaicos em baixa percentagem (Willis *et al.*, 2012).

1.3 – Tecnologias de *microArrays*

As variações existentes no genoma humano, que estão na base da existência de patologias genéticas podem ser provocadas por alterações num único nucleótido (SNV do inglês: *Single Nucleotide Variants*) ou então por uma variação estrutural que afeta um segmento maior, envolvendo um maior número de nucleótidos, onde se incluem

fenómenos como translocações, deleções ou duplicações (CNVs do inglês: Copy Number Variation) (Lupski *et al.*, 2011). Dependendo do seu conteúdo génico e localização, as CNVs podem ser avaliadas como benignas ou patogénicas, sendo que a sua identificação se pode tornar particularmente útil na avaliação de alterações fenotípicas tais como anomalias congénitas, alterações no desenvolvimento neuro cognitivo, de onde se destacam, por exemplo, as alterações no espectro do autismo (Wapner *et al.*, 2012).

A sequenciação da quase totalidade do genoma humano e consequente avanço científico, fez com que sensivelmente por volta do ano de 2003 surgisse uma nova tecnologia de diagnóstico, os *microarrays* que revelaram uma grande capacidade de identificação de alterações do número de cópias a uma resolução nunca antes atingida (Figura 9). Esta tecnologia baseia-se numa comparação entre o genoma da amostra do doente com uma amostra controlo, permitindo identificar alterações de tamanho reduzido (50 a 100 Kb) (Scott *et al.*, 2013) e impossíveis de identificar por citogenética convencional. Além disso, esta técnica de diagnóstico tem ainda a particularidade de poder fazer a análise ao longo de todo o genoma (Tachdjian, 2009). Porém, esta particularidade acabou por se tornar numa das limitações desta tecnologia, face à identificação de alterações em regiões cujo significado clínico permanece desconhecido, denominadas VOUS (do inglês: *variant of uncertain significance*), tornando impossível fazer uma relação entre genótipo e fenótipo nestes casos (Armengol *et al.*, 2012).

Além da técnica de aCGH existe ainda uma outra plataforma de *array*, o SNP *array* (do inglês: *Single nucleotide polymorphism arrays*), que permite por sua vez a deteção de SNVs (do inglês: *Single nucleotide variants*) por comparação com genomas referência. Atualmente ambas são utilizadas no diagnóstico de doenças em indivíduos com atraso mental, anomalias congénitas múltiplas, distúrbios neuropsiquiátricos, alterações do espectro do autismo, entre outras (Wiszniewska *et al.*, 2014).

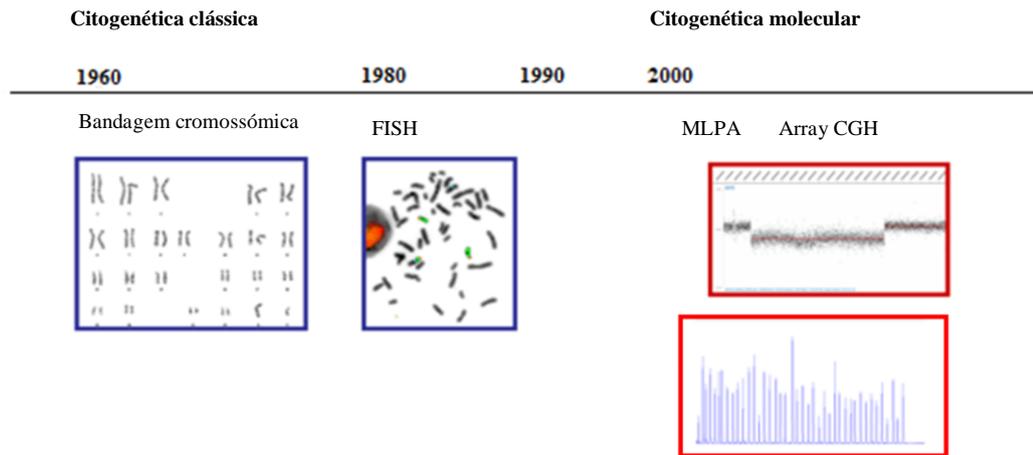


Figura 9- Comparação do ano de aparecimento de algumas das tecnologias de diagnóstico (Fonte: Adaptado de Bartholdi, 2013)

1.3.1 – Comparative Genome Hybridization Array

A tecnologia de aCGH corresponde a um teste onde se procede a uma comparação do genoma em análise com um genoma controle, através da marcação de ambos com fluorocromos de diferentes cores vermelho – Cianina 5 (Cy5) e verde – Cianina 3 (Cy3) (Figura 10). Após a marcação de ambas as amostras segue-se uma hibridização competitiva entre o DNA de ambas as amostras com sondas específicas representantes do genoma humano que estão dispostas numa lâmina. Hoje em dia existem mais de 1,000,000 de fragmentos representativos do genoma disponíveis comercialmente para poderem ser utilizados neste teste (Zuffardi *et al.*, 2011).

Esta plataforma de array pode ser realizada utilizando dois tipos de sondas diferentes: sondas de BACs (do inglês: bacterial artificial chromosomes) com um tamanho variável entre 80 e 200 pb ou sondas de oligonucleótidos que têm um tamanho entre 25-85 pb (Shaffer e Bui, 2007). A utilização de oligonucleótidos é tida como mais vantajosa para a realização desta tecnologia devido não só a existir um maior número destas sondas disponíveis comercialmente como também devido ao número de sequências repetitivas ser mais baixo, possibilitando uma maior exploração de zonas com maior relevância clínica e permitindo ainda obter melhores parâmetros de qualidade, o que facilita e dá maior confiança ao processo de análise dos resultados (Bi *et al.*, 2008).

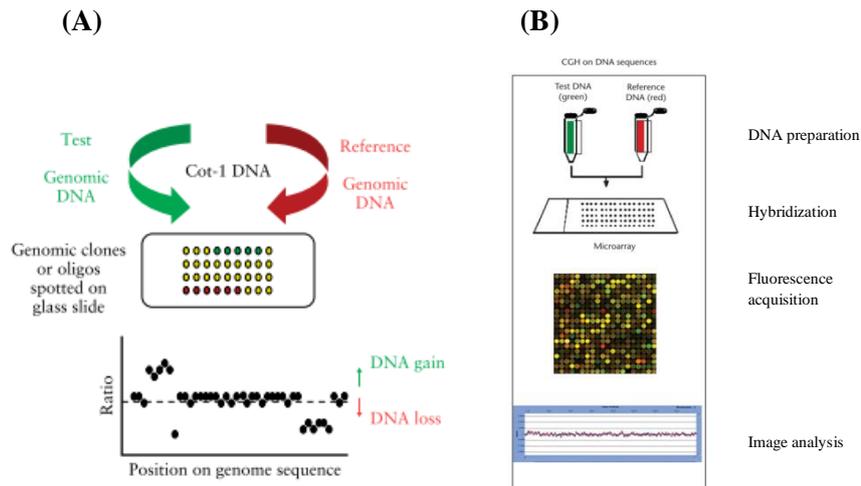


Figura 10- (A) Hibridização competitiva da amostra teste e amostra controlo marcadas com diferentes fluorocromos e análise do ganho ou perda de DNA por parte da amostra teste (B) Várias etapas da realização da tecnologia de aCGH (Adaptado de Tachdjian, 2009)

Numa placa de array estão fixas um conjunto de sondas conhecidas. As duas amostras (controlo e doente) marcadas com os diferentes fluorocromos vão hibridizar com as diferentes sondas, sendo responsáveis em caso de hibridização pela emissão de diferentes padrões de cor, sendo esta emissão detetada por um *scanner*. Posteriormente as intensidades de fluorescência detetadas são analisadas por um *software* que permite a comparação da amostra com o controlo. À partida, se a amostra em estudo for marcada com fluorocromos de cor verde e a amostra controlo de cor vermelha, a cor verde emitida por uma determinada sonda irá demonstrar o ganho de DNA por parte da amostra em análise. Em oposição a cor vermelha é representativa de uma perda de DNA desta mesma amostra. Por sua vez a cor amarela indica uma hibridização igual por parte de ambas as amostras em análise o que indica similaridade entre o número de cópias do controlo e o caso em estudo (Park *et al.*, 2011; Hillman *et al.*, 2012).

Tendo como principal vantagem a sua enorme capacidade de resolução, responsável pelo aumento da capacidade de diagnóstico e permitindo consequentemente a deteção de alterações submicroscópicas com tamanho inferior a 3-5 Mb, o aCGH destaca-se também pelo curto espaço de tempo que demora até emitir resultados, cerca de 4 a 7 dias, consequência de não ser necessária a realização de cultura de células (Bi *et al.*, 2008). Além disso, outro fator importante no aCGH é a capacidade de estudo em simultâneo de milhares de regiões genómicas numa única análise (Machado *et al.*, 2012). Estas vantagens revelarão ter grande impacto no

diagnóstico pós-natal devido por exemplo a terem capacidade de detetar anomalias genéticas em 10% de doentes com cariótipo normal e com atraso mental (Sagoo *et al.*, 2009). Numa outra abordagem estas particularidades do aCGH fazer uma análise geral do genoma possibilita fazer a associação entre variações existentes no genoma e manifestações fenotípicas, permitindo a identificação de novas síndromes genéticas que até ao momento não estejam descritas (ACOG, 2009).

Porém, tal como todos os testes de diagnóstico, também o aCGH possui desvantagens. Sendo uma técnica mais precisa e complexa, necessita de um suporte económico superior em relação a outros testes, causando uma divergência de opiniões face à sua integração como parte do DPN. É ainda de referir que esta técnica não permite detetar alterações equilibradas (tais como translocações ou inversões no genoma), apresentando ainda limitações quando se trata da análise de uma amostra que apresente um grau de mosaicismo abaixo de 30% (Novelli *et al.*, 2012), e poliploidias (Park *et al.*, 2010).

A outra grande desvantagem do aCGH verifica-se quando o resultado aponta para alterações em regiões do genoma cuja relevância clínica ainda se encontra desconhecida. No entanto de forma a que este problema seja ultrapassado há uma tentativa de fazer uma análise de uma forma mais dirigida, dando mais importância a zonas genómicas cuja variação se encontra associada a alterações fenotípicas. (Savage *et al.*, 2011; Wiszniewska *et al.*, 2014).

1.3.2 – *Comparative Genome Hybridization Array* como teste de primeira linha no diagnóstico pós-natal

Atualmente o aCGH é considerado como tecnologia de primeira linha na análise de doenças genéticas no diagnóstico pós-natal, nomeadamente em casos de atraso mental, dismorfismo, anomalias congénitas múltiplas e perturbação do espetro autista (Ahn *et al.*, 2010).

A utilização do *array* no pós-natal tem a finalidade de identificação de alterações no número de cópias da qual o doente é portador fazendo ao mesmo tempo uma associação entre elas, os genes e possíveis síndromes associadas através da recorrência a diferentes bases de dados informáticas como a OMIM (do inglês: *Online*

Mendelian Inheritance in Man) e DECIPHER (do inglês: *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*) (Ahn *et al.*, 2013).

Num estudo realizado por Miller e colaboradores, no ano de 2010, foi feita a revisão bibliográfica de 33 estudos contendo um total de 21,698 pacientes, avaliando a importância e vantagem que o array possuía no diagnóstico pós-natal em relação à citogenética convencional, onde concluíram que o array era responsável por um aumento da capacidade de diagnóstico estimado entre 15 e 20%. Estes valores foram considerados relevantes e significativos e levaram o Consórcio do ISCA (do inglês: *International Standard Cytogenomic Array*) a propor uma nova estratégia de diagnóstico clínico (Figura 11), onde o array figura como tecnologia de primeira linha na análise de doentes com atraso mental/deficiência intelectual, perturbações do espectro do autismo e malformações congénitas (Miller *et al.*, 2010).

Clinical Genetic Testing: Patients with unexplained DD, MCA, ASD*

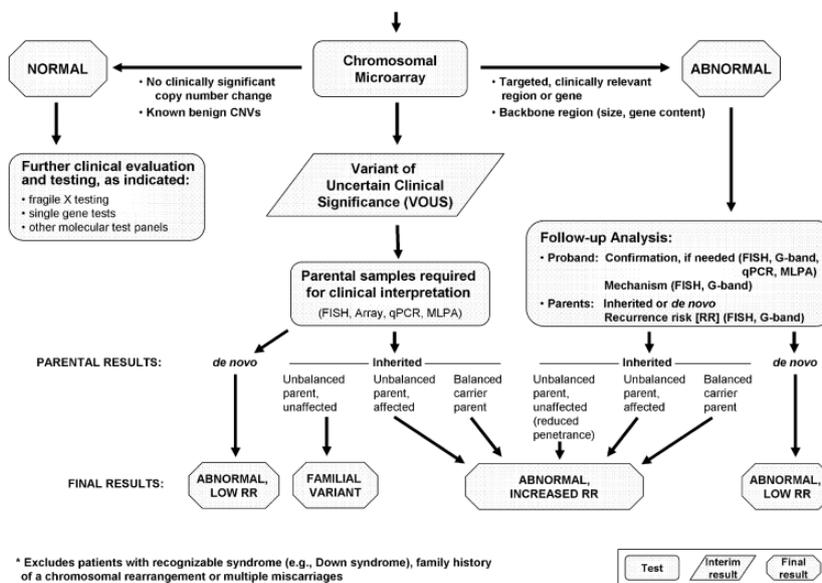


Figura 11- Nova estratégia de decisão de diagnóstico pós-natal de indivíduos com atraso no desenvolvimento (DD: do inglês *developmental delay*), perturbações do espectro do autismo (ASD: do inglês *autism spectrum disorders*) e malformações congénitas múltiplas (MCA: do inglês *multiple congenital anomalies*) após introdução do aCGH como tecnologia de primeira linha no diagnóstico pós-natal (Miller *et al.*, 2010).

1.4 - Implementação do *Comparative Genome Hybridization Array* no Diagnóstico pré-natal

Nos últimos tempos tem-se verificado uma enorme divergência de opiniões por parte dos laboratórios de diagnóstico, face à introdução do aCGH como tecnologia de DPN. Apesar de um elevado número de estudos revelar uma enorme vantagem de resolução do aCGH face à análise por citogenética convencional, não existem atualmente *guidelines* consensuais que possam apoiar a ideia de que o aCGH deva ser aplicado no DPN em casos de gestações pertencentes ao grupo de risco elevado (De Jong *et al.*, 2013). Outras problemáticas que são apontadas em vários artigos colocando em dúvida a utilidade do array em DPN, são as limitações de interpretação desta técnica em relação às VOUS e incapacidade de identificação de alterações equilibradas, que correspondem a cerca de 6% das anomalias genéticas (Warburton, 1991). Porém, existe atualmente uma tentativa de ultrapassar a limitação relacionada com as VOUS, através da utilização de uma estratégia de aCGH de forma mais direcionada a regiões de maior importância clínica, em substituição da estratégia de análise total do genoma. Esta estratégia baseia-se na redução da resolução através do uso de menos sondas de array que faz com que a análise seja limitada a zonas cuja importância clínica já se encontra estabelecida (De Jong *et al.*, 2013).

Um exemplo de um estudo que revela a utilidade da técnica de aCGH em caso de ser introduzida no DPN, foi publicado no ano de 2012 por Wapner e colaboradores. Utilizando um total de 4000 casos com cariótipo normal, verificou-se que o aCGH detetou CNVs clinicamente significantes em 6% dos casos com indicações de anomalias ecográficas e em 1,7% dos casos com indicações de idade materna avançada (Wapner *et al.*, 2012). A utilidade do aCGH em DPN também é demonstrada num estudo publicado em 2013 por Manolakos e colaboradores, na análise de casos com Síndrome de deleção do braço longo do cromossoma 4. Nestes casos verifica-se que o uso de aCGH além de revelar mais informações acerca do fragmento perdido, como tamanho e genes envolvidos (informações não reveladas pela citogenética convencional), pode ainda ser útil em caso de discordância entre citogenética convencional e dados provenientes do exame ecográfico (Manolakos *et al.*, 2013).

Por outro lado, a integração da tecnologia de aCGH como parte do DPN, irá provocar alterações na estratégia de decisão de DPN. Como tal é necessário reformular esta estratégia determinando quais as tecnologias de Citogenética e Biologia Molecular a utilizar em DPN e qual delas deve ser usada em primeira linha.

Em 2009, num artigo de opinião publicado pelo ACOG (do inglês: American Congress of Obstetricians and Gynecologists) é defendido que a citogenética convencional é a técnica que revela maior capacidade para ser usada em primeira linha em DPN, devido ao aCGH em certos casos fornecer resultados de impossível interpretação que poderá contribuir para uma diminuição da confiança do DPN. Porém é de destacar que este mesmo Comité neste artigo de opinião refere que o aCGH pode ser utilizado como complemento útil na interpretação de casos que revelam discordância entre os resultados provenientes da citogenética convencional e ecografia. (ACOG, 2009). Esta mesma opinião também é defendida pela Sociedade Italiana de Genética Humana que salienta que o aCGH poderá ser um bom complemento do DPN em caso de utilização como tecnologia de segunda linha e como tal não deve ser utilizado em substituição da citogenética convencional (Novelli *et al.*, 2012).

Em oposição às conclusões destes estudos encontra-se um estudo realizado no ano de 2011 por Armengol e colaboradores, onde fazem uma análise em paralelo de 906 amostras utilizando as técnicas de citogenética convencional, QF-PCR, MLPA e *microarray*. Estas amostras apresentavam as indicações de anomalias detetadas por exame ecográfico, exame bioquímico positivo, histórico familiar com casos de patologias genéticas, idade materna avançada (neste caso superior a 37 anos de idade) e ainda outro tipo de indicações como suspeita de infeções virais e ansiedade materna. Como conclusão, estes autores afirmam que apesar das limitações associadas à problemática das VOUS e apesar do aumento dos custos económicos associados ao DPN a técnica de array apresenta uma capacidade de deteção de alterações com consequências fenotípicas superior a qualquer uma das outras técnicas utilizadas em DPN (Tabela 6) e como tal deverá ser integrada como tecnologia de primeira linha de DPN em substituição da atual combinação entre a citogenética convencional e QF-PCR ou FISH (Armengol *et al.*, 2012).

Em 2013 em novo artigo de opinião ao contrário daquilo que defendia em 2008, a ACOG recomenda agora o uso de aCGH em substituição da citogenética convencional em casos onde tenham sido identificadas uma ou mais anomalias durante a realização do exame ecográfico, restringindo a utilização deste teste de elevada resolução apenas em casos de indicações de idade materna avançada (ACOG, 2013).

Tabela 6- Resultados de um estudo de comparação da capacidade de detecção de alterações com consequências fenotípicas utilizando as técnicas de citogenética convencional, QF-PCR, MLPA e *microarrays* (CMA do inglês: Chromosome MicroArray) (Armengol *et al.* 2011).

Indication	Number of indications	Alterations with phenotypic consequences*	Detection method			
			QF-PCR	CMA	Karyotype	MLPA
Abnormal ultrasound	173	23 (13.3)	14 (61)	22 (96)	16 (69)	12 (52)
Biochemical screening	235	12 (5.5)	11 (92)	12 (100)	11 (92)	12 (100)
Family history	145	8 (5.5)	1 (12)	8 (100)	5 (62)	5 (62)
Advanced maternal age	273	11 (4.0)	6 (55)	11 (100)	8 (73)	7 (64)
Other	20	2 (10.0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
Maternal anxiety	60	1 (1.7)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
Total number	906	57 6.3%	34 (60) 3.6%	56 (98) 6.2%	42 (74) 4.6%	39 (68) 4.3%

* Alterações identificadas no genoma que revelam por análise bibliográfica terem consequências fenotípicas

1.4.1 – Problemática da implementação do *Comparative Genome Hybridization Array* no diagnóstico pré-natal

1.4.1.1 – Problemas éticos e económicos

A introdução do aCGH como parte de DPN suscita o levantamento de alguns problemas de ética que poderão ser considerados como limitações desta tecnologia neste contexto. De entre estes problemas destaca-se a dúvida acerca de quais das informações obtidas pelo resultado do aCGH devem ser transmitidas à família e ainda a relação custo benefício.

A elevada resolução desta técnica como já foi referido anteriormente pode ser benéfica para o DPN identificando certo tipo de síndromes impossíveis de identificar por outras técnicas também utilizadas em DPN. Porém, esta resolução pode fazer com que em certos casos sejam emitidos resultados que não estejam diretamente relacionados com o DPN. Como exemplo temos a identificação de marcadores

genéticos que revelem uma maior suscetibilidade para o feto em questão vir a desenvolver uma determinada doença numa fase mais adiantada da sua vida, como por exemplo o cancro. Neste caso o resultado de DPN poderá estar na base da interrupção de uma gravidez de um indivíduo que poderia ser saudável (ACOG, 2008).

Outra problemática é o custo económico que está associado à realização desta técnica. Analisando os preços da tabela do Instituto de Gestão Informática e Financeira da Saúde, a realização da cultura e posterior análise por citogenética convencional de qualquer amostra fetal quer ela seja de líquido amniótico ou vilosidades coriônicas, tem um custo económico cerca de 5 vezes menor do que o custo que implica a realização do protocolo de extração de DNA seguido da análise por aCGH (Diário da República, 2014).

Esta elevação dos custos económicos apresenta-se como mais um dos fatores que dificulta a introdução do array no DPN de tal forma que torna necessário o aparecimento de um maior número de estudos que explorem a relação custo/benefício.

1.5 – Perspetivas futuras em diagnóstico pré-natal

Recentemente surgiu uma nova estratégia em DPN - os Testes de Pré-Natal Não Invasivos (Figura 12), que se baseiam num isolamento e recolha de DNA fetal livre contido no sangue materno, de modo a proceder a uma posterior análise genómica recorrendo a uma sequenciação em paralelo do genoma fetal (Binns e Hsu, 2002; Benn e Cuckle *et al.*, 2013).

Os Testes Não Invasivos no DPN têm sido alvo de um elevado número de estudos, com vista à validação da sua capacidade em detetar as aneuploidias mais comuns (Benn e Cuckle *et al.*, 2013; Fairbrother *et al.*, 2013). Como principal vantagem desta estratégia destaca-se a capacidade de ultrapassar as desvantagens do risco que a execução dos testes invasivos provocam no feto, sobretudo a perda fetal relacionada com o seu procedimento (Swanson *et al.*, 2013).

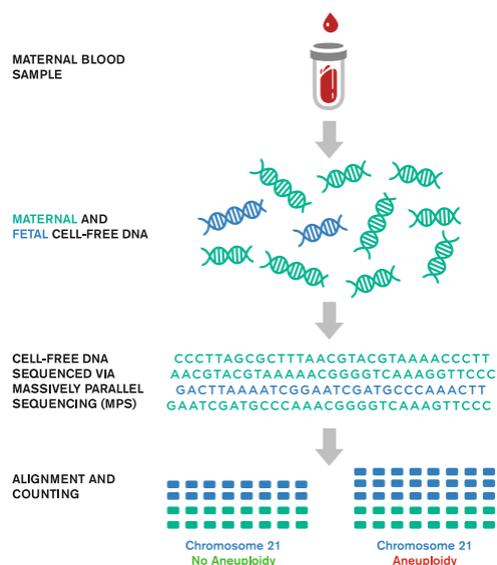


Figura 12- Exemplo de uma das metodologias utilizadas em testes de Pré-Natal Não Invasivo para identificação de trissomia 21. A análise parte de uma amostra de sangue materno de onde se isola o DNA fetal que por sua vez é sequenciado e alinhado de modo a identificar a presença ou não de aneuploidia (Swanson *et al.*, 2013).

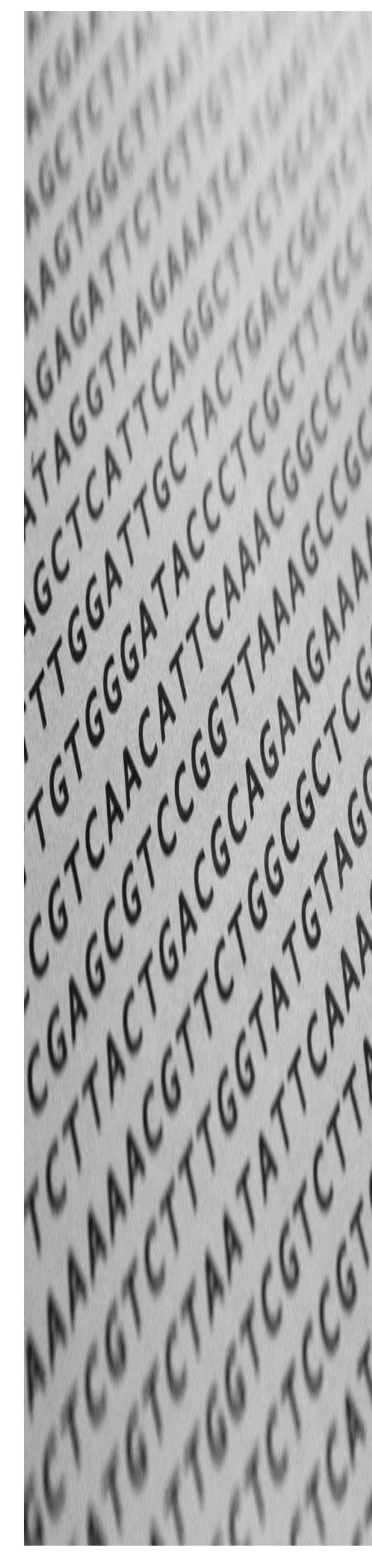
Diferentes sociedades científicas de onde se destacam a Sociedade Internacional de Diagnóstico Pré-Natal, a Sociedade Nacional de Conselheiros Genéticos, Comité Americano de Obstetrícia e Ginecologia e a Sociedade de Obstetras e Ginecologistas do Canadá, apresentam opiniões semelhantes acerca do impacto que esta nova técnica possa vir a ter assim que introduzida no DPN. Todas sugerem que este novo teste poderá adquirir uma importância relevante no contexto do DPN, em casos no qual o feto apresenta um elevado risco de vir a ser portador de aneuploidias devido aos excelentes índices de sensibilidade e especificidade que apresenta. Reportando a estudos de eficácia desta técnica, salienta-se que a mesma tem apresentado uma capacidade de deteção das trissomias mais comuns, em grupos de alto risco de serem portadores desta patologia, com uma eficácia bastante elevada (ACOG, 2012).

Quando comparado com a amniocentese, este novo teste demonstra a vantagem de poder emitir resultados numa fase mais precoce da gravidez, derivado da maior parte do DNA fetal ter origem na placenta e como tal pode ser detetado na corrente sanguínea materna a partir das 7 semanas de gestação (Bianchi, 2004; Edlow e Bianchi, 2012). Por outro lado apresenta as desvantagens de ter uma precisão ligeiramente inferior quando comparado com os testes de carácter invasivo, emite

resultados pouco claros devido a problemas de mosaicismo e ainda falsos positivos. Embora muito promissores, estes testes encontram-se ainda em fase de validação e definição quanto às indicações na qual deverá ser realizado (Swanson *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

- Selecionar e otimizar uma estratégia que permita a obtenção da máxima quantidade de DNA de qualidade, a partir de líquido amniótico direto, para aplicação em aCGH.
- Determinar as variantes experimentais que dificultam a análise de resultados em alguns ensaios de aCGH.
- Determinar o volume mínimo de líquido amniótico necessário para a realização de um ensaio de aCGH, tendo em conta o período de realização da amniocentese.
- Validação das otimizações realizadas em casos de aCGH no DPN.



MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Material Biológico

As 16 amostras de líquido amniótico e uma vilosidade coriônica utilizadas no decorrer deste estudo foram recebidas no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra entre Setembro de 2013 e Maio de 2014, com as indicações/motivos para estudos citogenéticos de acordo com a Tabela 7. Além destas amostras foram ainda utilizadas 6 amostras de sangues periféricos, uma biópsia de pele e ainda 11 culturas celulares de líquido amniótico, de forma a validar várias etapas do procedimento.

Tabela 7- Amostras utilizadas na realização deste estudo e indicações clínicas para a realização de estudos citogenéticos.

Líquidos amnióticos				Fibroblastos	I	Vilosidades coriônicas	I	Sangues
Diretos	I	Cultura	I					
LA524/12	D	LA774/12	B	Fb33/13	B	CV5/14	C	S687/13
LA530/13	B	LA30/13	B					S941/13
LA531/13	B	LA759/13	B					S996/13
LA551/13	B	LA94/14	A					S291/14
LA647/13	B	LA114/14	D					S293/14
LA648/13	B	LA115/14	A					S314/14
LA729/13	F	LA123/14	D					
LA759/13	B	LA125/14	D					
LA21/14	A	LA138/14	A					
LA70/14	B	LA146/14	A					
LA87/14	B	LA147/14	G					
LA136/14	B							
LA141/14	A							
LA252/14	E							
LA272/14	C							
LA340/14	B							

Legenda: I-Indicações clínicas para a realização estudos citogenéticos; A-Idade materna avançada; B-Malformações ecográficas; C-Sinais ecográficos de alerta; D-Rastreo bioquímico positivo; E-Progenitor portador de cromossomopatia; F-Indicação para realização de estudos moleculares; G- Outros (infecção materna por microorganismo. Ex: toxoplasmose, rubéola...)

3.2 – Metodologias para a extração de DNA

A qualidade da amostra de DNA é um fator de extrema importância na realização de qualquer estudo molecular. No caso particular do aCGH, e tendo em conta a elevada sensibilidade desta técnica, a baixa qualidade da amostra de DNA irá ter como resultado a impossibilidade de análise do resultado final, impedindo desta forma a identificação das alterações presentes ao longo do genoma em análise. Além disso a realização da técnica de aCGH implica ainda uma razoável quantidade de DNA na amostra, que deverá ter uma concentração superior a cerca de 30-40 ng/ μ L.

A obtenção de DNA em quantidades suficientes para uso em investigação genética, partindo de amostras de líquido amniótico foi protocolizado por Bianchi e colaboradores no ano de 2001 (Bianchi *et al.*, 2001).

A metodologia seguida na extração de DNA partindo de líquidos amnióticos, biópsias do trofoblasto e biópsias de pele no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra é o '*High Pure PCR Template Preparation Kit*' (Version 20, Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, Germany) (Protocolo da Roche®). Após uma consulta bibliográfica em artigos onde se procedia à extração de DNA partindo de amostras de líquido amniótico (Tabela 8), efetuou-se a seleção de outro protocolo de extração de DNA, para através de uma comparação com o Protocolo da Roche®, poder averiguar qual dos mesmos garantiriam melhores valores da quantidade e qualidade de DNA para posterior aplicação em aCGH. O protocolo selecionado foi o QIAamp DNA *Blood Midi Kit* (Qiagen) (Protocolo da Qiagen®).

Tabela 8- Avaliação bibliográfica dos métodos de extração de DNA utilizados em estudos reportados de aCGH em DPN.

Estudo	Protocolo de extração de DNA
Bi <i>et al.</i> , 2008	<i>QIAamp DNA Blood Midi Kit</i> (Qiagen)
Van den Veyver <i>et al.</i> , 2009	<i>QIAamp DNA Blood Midi Kit</i> (com alterações) (Qiagen)
Park <i>et al.</i> , 2010	<i>Gentra Puregen Cell kit</i> (Qiagen)
Fiorentino <i>et al.</i> , 2011	<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i> (Qiagen)
Breman <i>et al.</i> , 2012	<i>QIAamp DNA Blood Midi Kit</i> (com alterações) (Qiagen)
Rooryck <i>et al.</i> , 2013	<i>Wizard manual kit</i> (Promega)
Mosca-Boidron <i>et al.</i> , 2013	<i>QIAamp DNA Mini kit</i> (com alterações) (Qiagen)
Vestergaard <i>et al.</i> , 2013	<i>QIAamp DNA Mini kit</i> (Qiagen)

A fase inicial deste estudo envolveu a otimização de algumas etapas de ambos os protocolos comerciais de extração, validando as alterações no protocolo original, fornecido pelo fabricante, através da avaliação da quantidade/qualidade do DNA final por espectrofotometria através de um NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Após otimização dos protocolos procedeu-se à comparação das amostras de DNA obtidas por ambos os protocolos através de espectrofotometria e aCGH.

3.3- Quantificação da amostra por espectrofotometria

A amostra de DNA foi quantificada recorrendo ao NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) utilizando somente 1,5 μ L de amostra total.

Este aparelho permite fazer a medição da absorvância a 230 nm, 260 nm e 280 nm que correspondem, respetivamente, ao pico de absorção de radiações ultravioleta de contaminantes orgânicos, de DNA e de proteínas. A medição destes permite através estimar o valor da concentração de DNA através de uma aplicação da lei de Lambert-Beer:

$$[DNA]_{ng/\mu L} = \frac{\text{Abs 260} \times \text{Coeficiente de extinção}}{\text{Altura da coluna criada no espectrofotômetro}}$$

Segundo esta lei a concentração do DNA (ng/μL) é dada pela razão da absorvância a 260 nm (pico de absorção da radiação ultravioleta do DNA de cadeia dupla) e coeficiente de extinção (que para o DNA de cadeia dupla é igual a 50 ng.cm/μL), dividida pela altura da coluna criada no espectrofotômetro, que neste caso é de 1 cm.

Além disto os valores da absorvância a 230 nm e 280 nm, também medidos pelo espectrofotometro permitem através do cálculo da razão da absorvância 260/280 nm estimar a contaminação da amostra com contaminantes proteicos ou fenólicos e ainda com RNA (valores da razão da absorvância 260/280 nm abaixo de 1,8 indicam contaminação proteica ou fenólica e valores acima de 2,0 indicam contaminação com RNA). Por outro lado a razão da absorvância 260/230 nm permite detetar se a amostra contém contaminantes orgânicos, visível caso o valor desta razão seja inferior a 2,0 (Clark *et al.*, 2001).

3.4 – Protocolo da Roche®

Faz-se uma centrifugação inicial da amostra de líquido amniótico a 2000x g, durante 5 minutos, de modo a que haja uma concentração do DNA fetal no *pellet*. Após a remoção do sobrenadante, segue-se uma homogeneização do *pellet* em 200 μL de tampão de lise (constituído por: 4M de ureia, 200 mM de tris, 20 mM NaCl, 200mM EDTA, pH 7,4) e transferência desta mistura para um tubo. De seguida procede-se a uma adição de 40 μL de *proteinase K* [20 mg/mL] e 200 μL de *binding buffer* (constituído por: 6M guanidina – HCl, 10mM de ureia, 10mM de tris-HCl, 20% de triton X-100 (v/v), pH 4,4) e a amostra é colocada no banho, a 70°C durante 10 minutos. A precipitação do DNA é realizada com 100 μL de isopropanol absoluto, a -

20°C, e de seguida é feita uma lavagem da amostra com 500 µL de solução removedora de inibidores (constituído por: 5 M de guanidina-HCl, 20 mM de tris-HCl, pH 6,6 à solução inicial de 33 mL à qual é adicionado 20 mL de etanol absoluto) e duas lavagens com 500 µL de tampão de lavagem (constituído por: 20 mM de NaCl, 2mM de tris-HCl, pH 7,5 à solução inicial de 20 mL à qual é adicionado 80 mL de etanol absoluto). Finalmente a amostra final de DNA é eluída para o interior de um novo *ependorf* com 100 µL de tampão (constituído por: 10 mM de tris-HCl, pH 8,5) a uma temperatura de 70°C (Manual de instrução *High Pure PCR Template Preparation Kit*, Versão 20, Outubro de 2012)

3.4.1 – Otimização do Protocolo da Roche®

O processo de otimização deste protocolo envolveu apenas a introdução de uma etapa adicional, que consistiu na realização de uma pré-digestão a 55°C durante 30 minutos, logo após a adição de *proteinase K* (Figura 13).

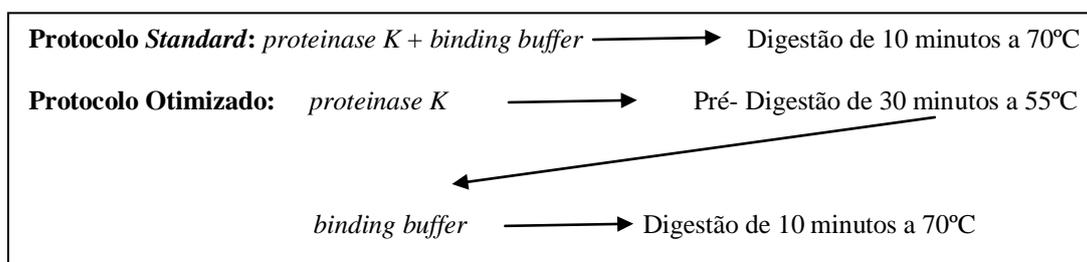


Figura 13- Esquema ilustrativo da alteração testada em relação ao protocolo *standard*.

3.5 – Protocolo da Qiagen®

Segundo instruções fornecidas pelo fabricante, em caso da amostra inicial ser sangue, o Qiamp DNA *Blood Midi kit*, deve ser aplicado partindo de um volume entre 0,3 mL e 2 mL. Em caso do volume da amostra ser inferior a 0,3 mL ou superior a 2

mL deve ser utilizado o Qiamp DNA *Blood Mini kit* ou o Qiamp DNA *Blood Maxi kit*, respetivamente.

Se a amostra for de líquido amniótico, deve-se proceder a uma centrifugação inicial seguido de uma lavagem com 2 mL de *PBS*. A amostra foi transferida para um novo tubo de 15 mL onde é adicionado 200 µL de *proteinase K* [20 mg/mL] e 2,4 mL de tampão de lise (tampão AL). Após esta adição o tubo é invertido dez vezes e agitado vigorosamente durante cerca de um minuto de modo a que o preparado seja homogeneizado. De seguida o tubo é colocado no banho a 70°C durante 10 minutos. Ao fim deste intervalo de tempo é adicionado 2 mL de etanol (96-100%) à temperatura ambiente e o tubo é novamente homogeneizado. A solução é transferida em duas etapas realizadas separadamente para uma coluna de lavagem, de modo a que o DNA contido na solução fique retido na coluna de lavagem. Após centrifugação de metade do preparado anterior a outra metade de amostra é colocada na coluna e centrifugada novamente. Segue-se uma lavagem do DNA com 2 mL de tampão de lavagem AW1 e com a mesma quantidade de tampão de lavagem AW2 procedendo-se após adição de cada tampão de lavagem a uma centrifugação de 4500 x g durante 1 minuto após o AW1 e 15 minutos após adição do tampão AW2. No final a amostra é eluída em 300 µL de tampão à temperatura ambiente (Manual de instrução *QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi Handbook*, 3ª edição, Junho 2012).

3.5.1 – Otimização do Protocolo da Qiagen®

Após a aplicação do protocolo *standard* verificámos que os parâmetros de quantidade/qualidade do DNA extraído a partir de líquido amniótico direto ficavam aquém do desejado, pelo que foi necessário otimizar algumas etapas:

(1) Diminuição no volume de eluição final (300 µL para 100 µL) e (2) introdução de uma etapa de pré-digestão a 55°C, durante 30 minutos, logo após a adição de *proteinase K*, tal como fora testado no Protocolo da Roche® (Ver 3.4.1).

3.6 – Protocolo de concentração e purificação DNA - *Clean Concentrator kit (Zymo Research, CA)*

Aplicando o DNA extraído, pelos protocolos comerciais otimizados numa plataforma de aCGH verificou-se, em certos casos a impossibilidade de obtenção de resultados conclusivos devido à quantidade do DNA, mesmo em casos em que a amostra indicava índices de quantidade/qualidade aceitáveis no NanoDrop. Noutros casos, o protocolo de extração não permitia, por si só, obter concentrações de DNA suficientes para aplicação em *array*.

Na tentativa de contornar estes problemas foi testada a utilização de um protocolo de concentração e purificação de DNA que, além de concentrar a amostra, permitia recuperar amostras que inicialmente não tinham apresentado valores de pureza que permitissem a realização de *array*. A metodologia adotada foi o DNA *Clean Concentrator kit (Zymo Research, CA)* (Protocolo da Zymo®) (Bi *et al.*, 2008).

De acordo com o fabricante, a primeira fase deste protocolo corresponde à adição de *binding buffer* (constituído por: hidrocloreto de guanidina, pH 4,5 – 6) à amostra numa proporção de 2:1 tendo em conta a quantidade de amostra que irá ser concentrada. Seguiu-se uma lavagem da amostra, por duas vezes, com 200 µL de tampão de lavagem (constituído por: tris (C₄H₁₁NO₃), ácido clorídrico (HCl), EDTA, pH 8) e eluição final com um volume de tampão (constituído por: tris (C₄H₁₁NO₃), ácido clorídrico (HCl), EDTA, pH 8) de 6 a 10 µL à temperatura ambiente. Entre cada um destes passos procede-se ainda a uma centrifugação a uma velocidade superior a 10,000 x g, durante 30 segundos (Manual de instrução *Genomic DNA Clean & Concentrator™ Catalog Nos. D4010 & D4011*).

3.6.1 – Otimização do Protocolo da Zymo®

Tal como os protocolos anteriormente descritos também o Protocolo da Zymo® foi sujeito a um processo de otimização com objetivo de calcular o

rendimento do procedimento de extração, e minimizar a perda de DNA que a aplicação deste *kit* implica.

A primeira fase do processo de otimização do Protocolo da Zymo® foi o ajustamento do volume de eluição, que originalmente e segundo o protocolo da marca deveria ser superior a 10 µL, tendo-se testado os volumes de 25, 30 e 40 µL. Após esta alteração foram, numa outra fase, testadas variações na temperatura do tampão de eluição, a 70 e 80°C.

3.7 – Eletroforese em Gel de Agarose

A avaliação da fragmentação das amostra de DNA e da ação purificadora do Protocolo da Zymo®, foi efetuada recorrendo a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando as amostras CV5/14, Fb33/13, LA774/12, LA30/13 e LA759/13. Estas amostras foram escolhidas por cada uma delas, ter sido aplicada na plataforma de aCGH antes e após a concentração pelo Protocolo da Zymo®. Desta forma avaliou-se se os problemas encontrados em alguns casos de aCGH poderiam estar associados à fragmentação do DNA das amostras.

De modo a uniformizar a quantidade de DNA em cada poço foi estipulado que o volume de amostra a utilizar neste ensaio seria de aproximadamente 600 ng de DNA por poço. Porém devido à limitação do *stock* de amostra, não foi possível utilizar esta quantidade de DNA no caso das amostras CV5/14 após a aplicação do Protocolo da Zymo® (pós-Zymo), Fb33/13 pós-Zymo e LA774/12 pós-Zymo (Tabela 9).

Tabela 9- Valores da concentração e volume das 5 amostras corridas em gel de agarose a 1,5% e volumes de corante e água colocados em cada poço do gel.

	CV5	CV5 pós- Zymo	Fb33	Fb33 pós- Zymo	LA774	LA774 pós- Zymo	LA30	LA30 pós- Zymo	LA759	LA759 pós- Zymo
[DNA] (ng/ μ L)	138,5	57,4	26,6	61,4	105,2	60,6	90,8	31,6	138	125,2
V. de Amostra (μ L)	4	5	22,6	5	5,6	5	6,6	19	4,4	4,8
V. de Corante (μ L)	5	5	8	5	5	5	5	8	5	5
V. Total (μ L)	15	10	38,6	10	15	10	15	30	15	15

3.8 – Comparative Genome Hybridization Array

A plataforma de *array* utilizada neste estudo foi um *Agilent human genome microarray* 4x180K (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA), representativo do genoma em toda a sua extensão e composto por sondas de oligonucleótidos com 60 mer.

A realização de um ensaio de *array* utilizando esta plataforma implica uma concentração mínima de DNA por amostra de cerca de 30-40 ng/ μ L, de modo a garantir que haja pelo menos 700 ng de DNA num volume que não pode ser superior a 26 μ L.

O protocolo de aCGH, de uma forma resumida encontra-se dividido em 3 etapas: a marcação do DNA genómico com fluorescência ou *labeling*, a hibridização e o processo de leitura ou *scanning*.

Na primeira fase do protocolo, as amostras de DNA são centrifugadas durante 1 minuto a 6,000 g (todo o procedimento da primeira etapa é realizado em separado para a amostra controlo e a amostra em estudo). Segue-se uma adição de 5 μ L de uma mistura de *random primers*, aos 26 μ L de amostra de DNA. Esta mistura de 31 μ L é

colocada a 98°C durante 3 minutos e depois transferida para gelo durante 5 minutos. Após esta etapa é feita uma nova centrifugação a 6,000 g durante 1 minuto.

Para completar a mistura de marcação final, é adicionada a amostra 2,0 µL de nuclease – *free water*, 10 µL de tampão de reação, 5,0 µL de dNTPs, 3,0 µL de fluorocromos (no caso da amostra a analisar o fluorocromo usado foi o Cy5 – dUTP e no caso da amostra controlo, o Cy3 – dUTP) e por fim 1 µL de polimerase *Exo - Klenow* (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA). A mistura é incubada a uma temperatura de 37°C durante 2 horas e depois a 65°C durante 10 minutos antes de ser transferida para o gelo. Segue-se uma purificação do DNA marcado utilizando colunas de purificação.

As amostras de DNA genómico marcadas são quantificadas no Nanodrop 1000, onde é avaliada a sua concentração, incorporação de fluorocromos e grau de marcação de atividade específica. Finalizada esta fase procede-se à mistura de ambas as amostras marcadas em separado (caso em estudo e caso controlo).

Na hibridização é adicionado à mistura final de DNA marcados uma mistura de hibridização, constituída por Cot-1 DNA (1mg/ml) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Califonia) e *Agilent 10x Blocking Agent e Agilent 2x Hi-RPM buffer* (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA). A mistura final é colocada na placa de array e levada ao forno de hibridização (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA), onde permanece durante 24 horas a 65°C e a uma rotação de 20 rpm. Após a hibridização segue-se um passo de lavagem das lâminas com *Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip wash buffer 1*, durante 5 minutos à temperatura ambiente e com *Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip wash buffer 2* durante 5 minutos a 37°C.

A última etapa do protocolo de array corresponde ao processo de leitura ou *scanning*, sendo realizado por um *scanner* de *microarrays* de DNA G2565ca (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA). As imagens obtidas são processadas por *software feature extraction* v10.7 (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA), antes de prosseguirem para análise dos dados.

RESULTADOS

4.1- Otimização do Protocolo da Roche®

4.1.1-Avaliação da pré-digestão a 55°C durante 30 minutos após adição de *proteinase K*

Foi feita uma otimização do protocolo ‘*High Pure PCR Template Preparation Kit*’ (Version 20, Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, Germany) através de alterações propostas ao protocolo original e avaliação das mesmas. Esta avaliação foi feita através de espectrofotometria utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA), tendo como comparação a realização do protocolo original, sem qualquer alteração.

A alteração proposta a este protocolo foi a inclusão de uma pré-digestão, com a duração de 30 minutos a 55°C, logo após a adição de *proteinase K* [20 ng/μL] de modo a aumentar a ação desta enzima, na tentativa de diminuir o grau de contaminação proteica e obter DNA mais puro na amostra final. Para a realização deste ensaio foram utilizadas as amostras de cultura de líquidos amnióticos LA94/14, LA127/14 e LA128/14, divididas em duas alíquotas em que numa foi realizado o protocolo *standard* sem alterações e na outra a realização da pré-digestão.

A introdução da pré-digestão ao protocolo *standard* teve como resultado a obtenção de uma concentração superior de DNA e não se notou uma melhoria significativa da qualidade conforme os valores indicados pelas razões da absorvância a 260/280 nm e 260/230 nm (Tabela 10).

Tabela 10- Comparação dos valores da concentração e pureza da amostra de DNA final após pré-digestão em relação ao protocolo *standard*.

Amostra	Protocolo <i>Standard</i>			Protocolo com realização de pré-digestão		
	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm
LA94/14	16,9	1,97	1,38	20,4	2,21	1,39
LA127/14	30,3	1,85	1,13	33,0	1,89	1,14
LA128/14	18,2	1,97	1,40	26,5	1,87	1,05

4.2-Otimização do Protocolo da Zymo®

4.2.1-Ajustamento do volume de eluição

O protocolo de concentração e purificação DNA *Clean Concentrator kit* (Zymo Research, CA) foi sujeito a modificações, avaliando-se a influência das mesmas. O objetivo foi tentar minimizar as perdas de DNA e contribuir para a obtenção de DNA mais concentrado e com uma maior purificação.

Tendo em conta as limitações de *stock* de DNA de líquido amniótico e de forma a validar o processo, optámos nesta fase do estudo por utilizar DNA disponível em maiores quantidades proveniente de sangues: S291/14, S293/14 e S314/14.

A primeira otimização realizada neste protocolo foi o ajustamento do volume de tampão de eluição final, testando os volumes de 25, 30 e 40 μL por cada amostra. O objetivo foi averiguar qual dos volumes permitiria obter um maior rendimento de recuperação de DNA, diminuindo as perdas, e ainda definir qual dos volumes garantiria melhores índices de concentração/pureza final.

A realização do protocolo de concentração com os 3 diferentes volumes de eluição final (25, 30 e 40 μL) não revelou diferenças significativas entre a quantidade de DNA para os volumes testados. Porém os valores das razões da absorvância a 260/280 nm e 260/230 nm demonstram que a amostra de DNA final tem melhor qualidade em caso de concentrada e purificada utilizando um volume de eluição de 25 ou 40 μL (Tabela 11).

Tabela 11- Valores da concentração, pureza e rendimento antes e após a realização do Protocolo da Zymo®, utilizando diferentes volumes de eluição.

Amostra	Volume de eluição (μL)	Antes de Zymo			Após Zymo			Rendimento %
		[DNA] ng/ μL	260/280 nm	260/230 nm	[DNA] ng/ μL	260/280 nm	260/230 nm	
S291/14	25	36,1	1,88	1,46	53,4	1,91	2,30	74%
S291/14	30				34,1	1,90	1,03	57%
S291/14	40				35,1	1,81	2,13	78%

S293/14	25	206,6	1,88	2,26	154,3	1,88	1,52	37%
S293/14	30				135,7	1,82	1,63	39%
S293/14	40				119,7	1,85	2,39	46%
S314/14	25	90,8	1,82	2,15	133,3	1,88	2,29	46%
S314/14	30				85,0	1,94	0,87	35%
S314/14	40				67,8	1,88	1,06	37%

4.2.2-Ajustamento da temperatura de eluição

Foram testadas para cada amostra em separado, tampão de eluição aquecido à temperatura de 70°C e 80°C respetivamente, avaliando de seguida o rendimento. Neste teste foram utilizadas amostras de DNA de líquido amniótico LA647/13 e LA648/13 e DNA dos sangues S687/13, S996/13 e S941/13.

A utilização de uma temperatura de eluição superior à utilizada no protocolo *standard* teve como resultado uma redução da perda de DNA provocada pela aplicação do protocolo de concentração e purificação (Tabela 12).

Tabela 12- Valores da concentração antes e depois da aplicação do Protocolo da Zymo® e rendimento da reação, resultantes da realização deste protocolo com temperatura de eluição de 70 e 80°C.

Amostra	Eluição com tampão a 70°C			Eluição com tampão a 80°C		
	[DNA] ng/μL antes de Zymo®	[DNA] ng/μL depois de Zymo®	Rendimento	[DNA] ng/μL antes de Zymo®	[DNA] ng/μL depois de Zymo®	Rendimento
LA647/13	67	119,9	51%	62,4	168,2	71%
LA648/13	61,5	36,9	33%	61,5	78,9	71%
S687/13	36,6	45,5	52%	36,6	47,1	54%
S996/13	22,3	43,6	49%	22,3	63,6	71%
S941/13	103,5	150,3	36%	103,5	150,3	36%
Rendimento médio			44% ± 8,9	61% ± 15,6		

4.3-Avaliação espectrofotométrica do DNA extraído pelo Protocolo da Roche® após o Protocolo da Zymo®

Esta avaliação espectrofotométrica foi realizada através de Nanodrop com a utilização das amostras de líquido amniótico representadas na Tabela 13.

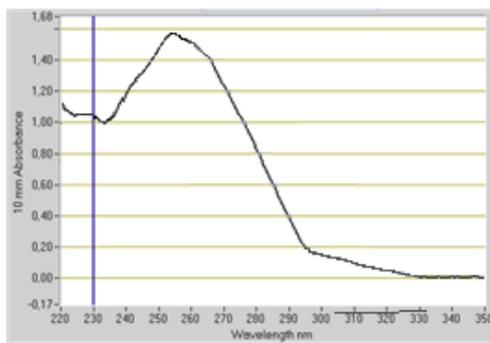
Tabela 13- Amostras de líquido amniótico e respectivas indicações e tempo de gestação utilizadas na avaliação espectrofotométrica do DNA extraído pelo Protocolo da Roche® seguido do Protocolo da Zymo®

Amostra	Tempo de gestação	Indicações clínicas
LA530/13 (direto)	20 semanas e 6 dias	Malformações ecográficas
LA531/13 (direto)	20 semanas e 6 dias	Malformações ecográficas
LA551/13 (direto)	22 semanas e 1 dia	Malformações ecográficas

LA530/13

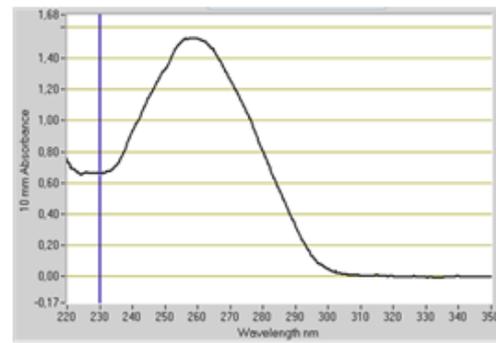
A análise espectrofotométrica da aplicação do protocolo da Zymo® na amostra LA530/13 extraída pelo protocolo da Roche®, demonstrou um aumento da concentração de DNA na amostra final e ainda um aumento da sua pureza, visível através dos valores das razões de absorvância a 260/280 nm e 260/230 nm (Figura 14).

(A) Antes da aplicação do protocolo da Zymo®



[DNA]	260/280	260/230
ng/μL	nm	nm
44,9	1,81	1,46

(B) Após aplicação do protocolo da Zymo®



[DNA]	260/280	260/230
ng/μL	nm	nm
76,1	1,91	2,31

Figura 14- Gráficos de absorvância e respectivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA530/13 (A) antes e (B) após aplicação do Protocolo da Zymo®.

LA531/13

A análise espectrofotométrica da aplicação do Protocolo da Zymo® na amostra LA531/13 extraída pelo protocolo da Roche®, demonstrou um aumento da concentração de DNA na amostra final, recuperando esta amostra para valores de concentração que permitem a realização de aCGH (valores superiores a 30-40 ng/μL). Além disso, os valores das razões de absorvância a 260/280 nm e 260/230 nm revelam o aumento da qualidade desta amostra de DNA resultante da aplicação deste protocolo de concentração e purificação (Figura 15).

(A) Antes da aplicação do protocolo da Zymo® (B) Após aplicação do protocolo da Zymo®

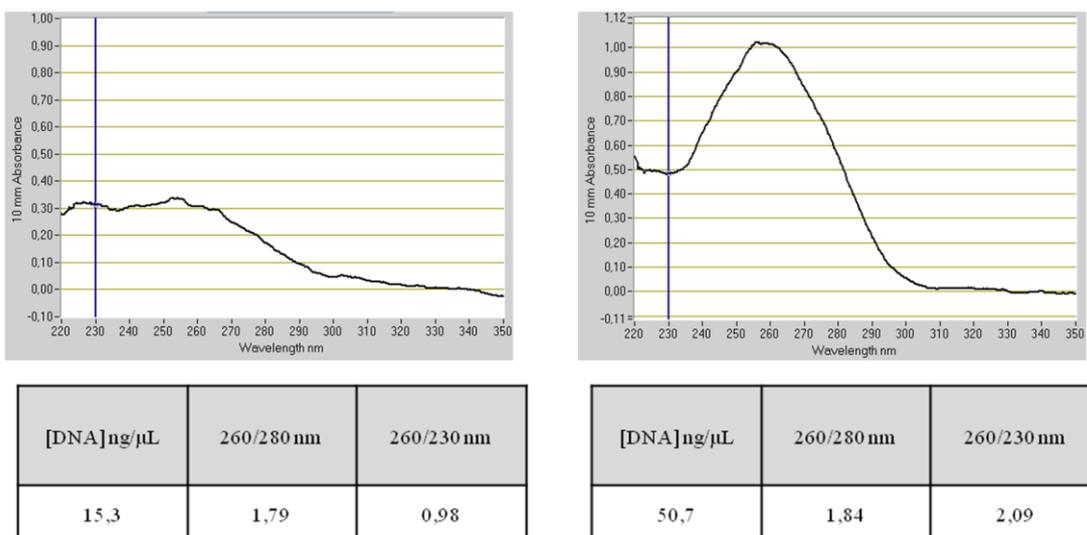


Figura 15- Gráficos de absorvância e respetivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA531/13 (A) antes e (B) após aplicação do Protocolo da Zymo®.

LA551/13

A análise espectrofotométrica da aplicação do protocolo da Zymo® na amostra LA551/13 extraída pelo protocolo da Roche®, demonstrou um aumento da concentração de DNA na amostra final e ainda um melhoramento da sua qualidade, visível através dos valores das razões de absorvância a 260/280 nm e 260/230 nm (Figura 16).

(A) Antes da aplicação do protocolo da Zymo® (B) Após aplicação do protocolo da Zymo®

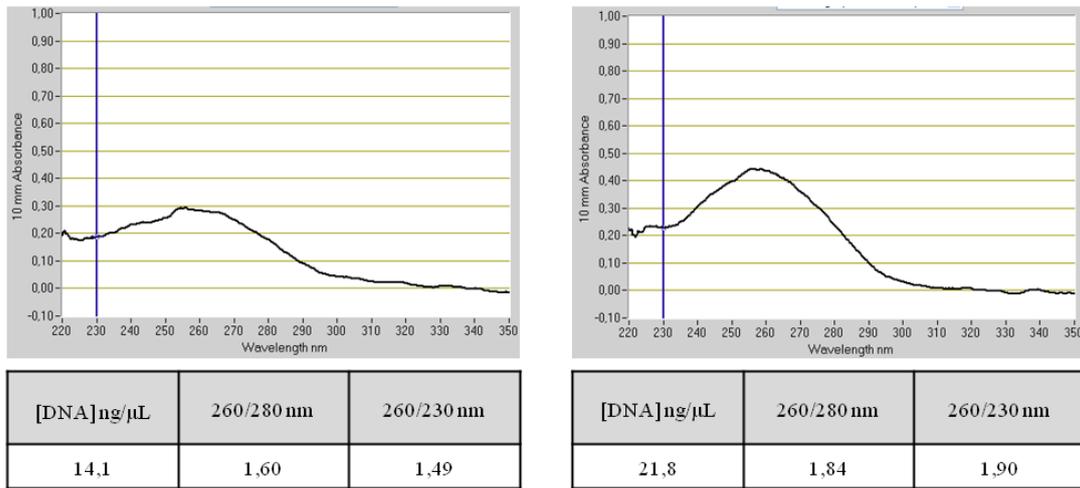


Figura 16- Gráficos de absorvância e respetivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA551/13 (A) antes e (B) após aplicação do Protocolo da Zymo®.

4.4- Avaliação por espectrofotometria da qualidade do DNA extraído pelo Protocolo da Qiagen® após o Protocolo da Zymo®

Esta avaliação espectrofotométrica da qualidade do DNA extraído pelo Protocolo da Qiagen® seguido de aplicação do Protocolo da Zymo® foi realizada utilizando as amostras de líquido amniótico representadas na Tabela 14.

Tabela 14- Amostras de líquido amniótico e respetivo tempo de gestação e indicações, utilizadas na avaliação espectrofotométrica do DNA extraído pelo Protocolo da Qiagen® seguido do Protocolo da Zymo®

Amostra	Tempo de gestação	Indicações clínicas
LA21/14 (direto)	21 semanas e 6 dias	Idade materna avançada
LA759/13 (direto)	18 semanas e 6 dias	Malformações ecográficas

LA21/14

A análise espectrofotométrica da aplicação do Protocolo da Zymo® na amostra LA21/14 extraída pelo protocolo da Qiagen®, demonstrou um aumento da concentração de DNA na amostra final, recuperando esta amostra para valores de concentração que permitem a realização de aCGH. A análise dos valores das razões de absorvância a 260/280 nm e 260/230 nm revelam o aumento da qualidade desta amostra de DNA resultante da aplicação deste protocolo de concentração e purificação (Figura 17).

(A) Antes da aplicação do protocolo da Zymo® (B) Após aplicação do protocolo da Zymo®

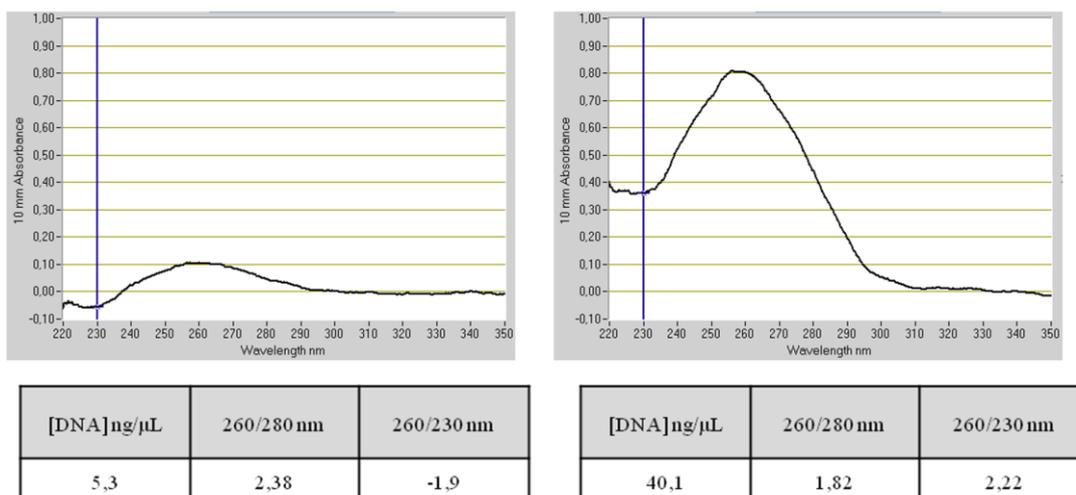


Figura 17- Gráficos de absorvância e respetivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA21/14 (A) antes e (B) após aplicação do Protocolo da Zymo®.

LA759/13

A análise espectrofotométrica da aplicação do protocolo da Zymo® na amostra LA759/13 extraída pelo protocolo da Qiagen®, demonstrou uma diminuição da concentração de DNA na amostra final e um aumento da sua qualidade, visível através do valor da razão de absorvância a 260/280 nm (Figura 18).

(A) Antes da aplicação do protocolo da Zymo® (B) Após aplicação do protocolo da Zymo®

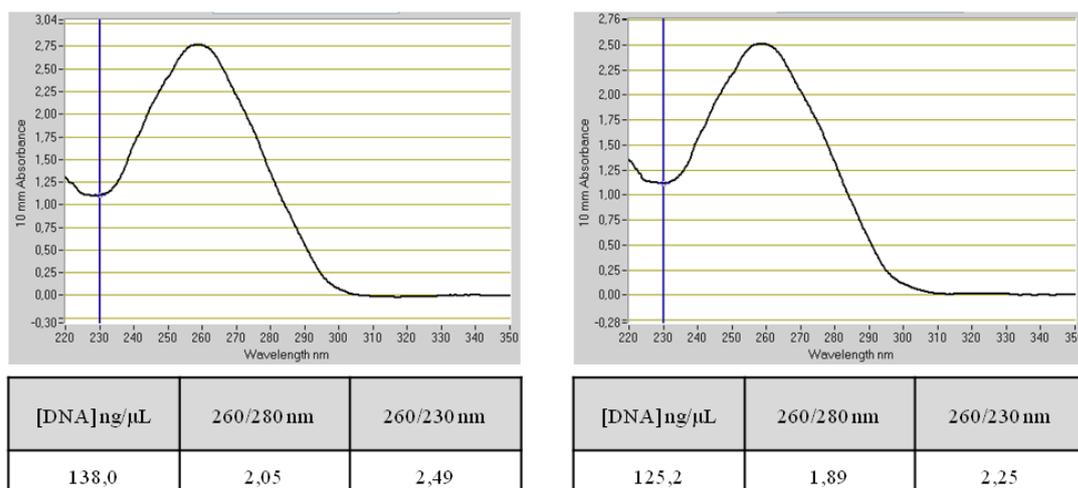


Figura 18- Gráficos de absorvância e respectivos valores de concentração e pureza de DNA por NanoDrop da amostra LA759/13 (A) antes e (B) após aplicação do Protocolo da Zymo®.

4.5-Avaliação da importância do Protocolo da Zymo® por aCGH

A influência da aplicação do Protocolo da Zymo® na análise dos resultados de aCGH englobou as culturas das amostras LA30/13, LA774/12 e LA759/13 e o material biológico das amostras CV5/14 e Fb33/13 (Tabela 15). Para cada uma das amostras, foi efetuado um ensaio comparativo por aCGH utilizando DNA não purificado e DNA sujeito ao protocolo de purificação de modo a avaliar o grau de impacto nos resultados obtidos.

Tabela 15- Amostras utilizadas na avaliação da influência do Protocolo da Zymo® por aCGH.

Amostra	Tempo de gestação	Indicações
L30/13 (Cultura)	21 semanas e 5 dias	Malformações ecográficas
CV5/14 (Cultura)	12 semanas e 6 dias	Sinais ecográficos de alerta
L774/12 (Cultura)	27 semanas e 6 dias	Malformações ecográficas
Fb33/13 (Cultura)	23 semanas	Malformações ecográficas
L759/13 (Cultura)	18 semanas e 5 dias	Malformações ecográficas

LA30/13

A análise comparativa feita a partir das células em cultura do LA30/13 (com e sem aplicação do Protocolo da Zymo®) por aCGH, revelou que a aplicação do protocolo de concentração e purificação teve como consequência: da análise ao longo de todo o genoma a eliminação de 10 alterações que correspondiam a falsos positivos (Figuras 19 (e) e 20 (e) e na Tabela 16), a diminuição da dispersão do gráfico representativo da análise do ganho ou perda de fragmentos genômicos ao longo do genoma (Figuras 19 (a) e 20 (a)), diminuição da dispersão no gráfico representativo de cada cromossoma (Figuras 19 (b) e 20 (b)) e ainda a alteração do valor do parâmetro (DLRS: do inglês *Derivative Log Ratio Spread*) que avalia a qualidade da amostra de DNA utilizada no array para valores mais aceitáveis (Tabela 16) (de acordo com o Laboratório de Citogenética e Genômica da FMUC apenas os valores de DLRS abaixo de 0,20 validam os resultados da realização de um ensaio de aCGH).

Antes da aplicação do Protocolo da Zymo®



Figura 19- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA30/13 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 2. c) Região no cromossoma 2 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Tabela discriminada das 15 alterações encontradas (deleções e duplicações) com indicação do cromossoma, região envolvida, tamanho e genes envolvidos.

Após aplicação do Protocolo da Zymo®

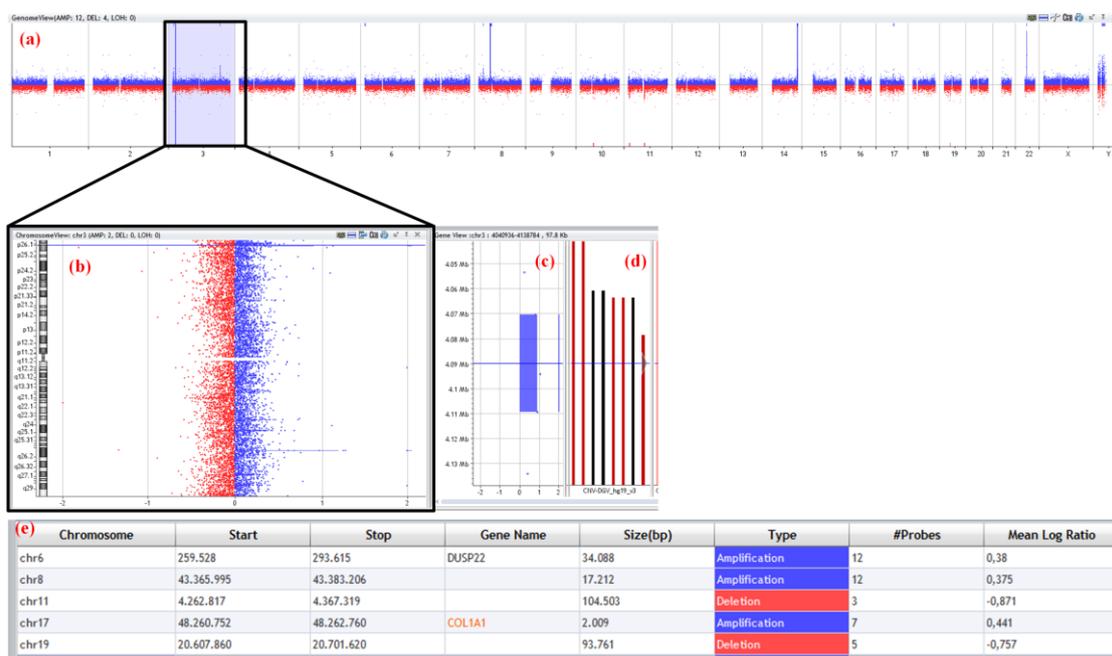


Figura 20- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA30/13 em cultura após realização do Protocolo da Zymo®. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 3. c) Região no cromossoma 3 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Tabela discriminada das 5 alterações encontradas (deleções e duplicações) com indicação do cromossoma, região envolvida, tamanho e genes envolvidos.

Tabela 16- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).

Sem aplicação de protocolo de purificação Zymo							Com aplicação de protocolo de purificação Zymo						
[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas
90,8	1,82	1,68	0,2283	15	10	5	31,6	1,73	2,21	0,1743	5	3	2

CV5/14

A análise comparativa feita a partir das células em cultura da CV5/14 (com e sem aplicação do Protocolo da Zymo®) por aCGH, revelou que a aplicação do protocolo de concentração e purificação teve como consequência: da análise ao longo de todo o genoma a eliminação de uma alteração que correspondia a um falso positivo

(Figuras 21 (e) e na Tabela 17), a diminuição da dispersão do gráfico representativo da análise do ganho ou perda de fragmentos genómicos ao longo do genoma (Figuras 21 (a) e 22 (a)), diminuição da dispersão no gráfico representativo de cada cromossoma (Figuras 21 (b) e 22 (b)) e ainda a alteração do valor do parâmetro DLRS para valores mais aceitáveis (Tabela 17).

Antes da aplicação do Protocolo da Zymo®

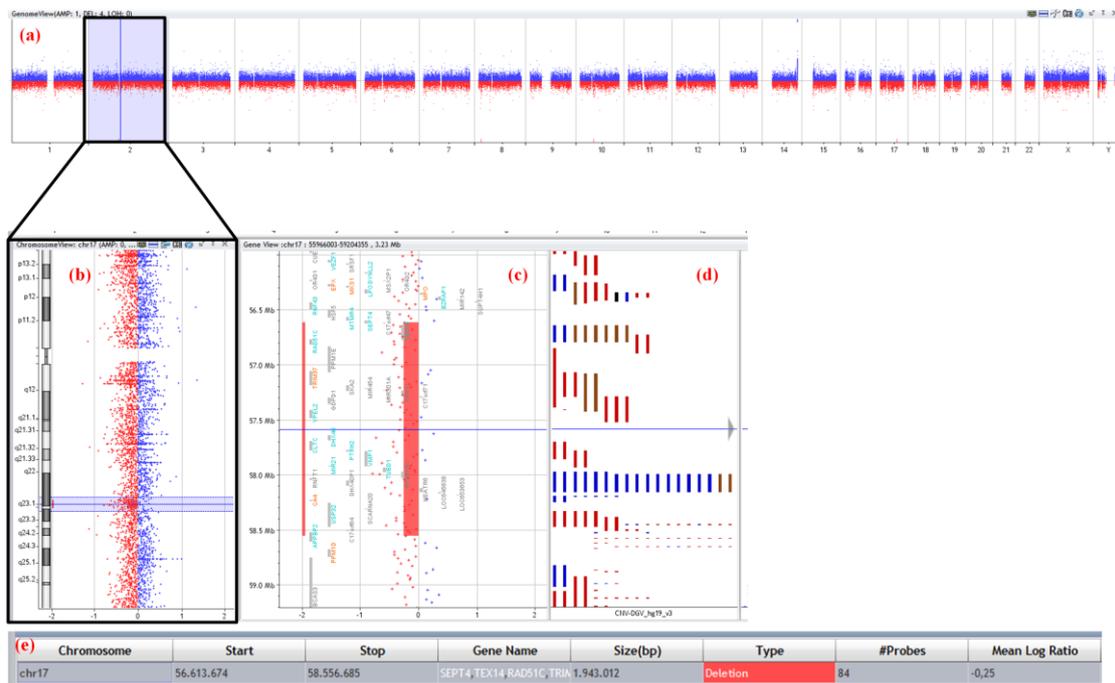


Figura 21- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra CV5/14 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 2. c) Região no cromossoma 2 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Tabela discriminada da alteração (deleção) encontrada com indicação do cromossoma, região envolvida, tamanho e genes envolvidos.

Após aplicação do Protocolo da Zymo®

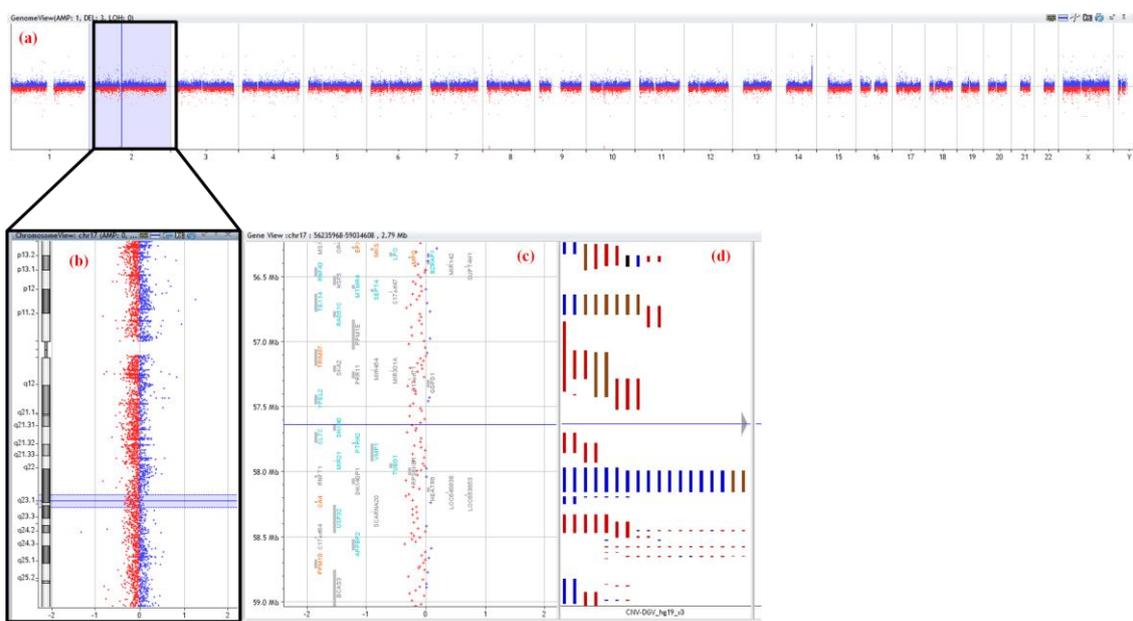


Figura 22- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra CV5/14 em cultura após realização do Protocolo da Zymo®. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 2. c) Região no cromossoma 2 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c).

Tabela 17- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).

Sem aplicação de protocolo de purificação Zymo							Com aplicação de protocolo de purificação Zymo						
[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas
138,5	1,93	2,17	0,2368	1	0	1	57,4	1,83	2,23	0,1276	0	0	0

LA774/12

A análise comparativa feita a partir de células da cultura da amostra LA774/12 (com e sem aplicação do Protocolo da Zymo®) por aCGH, revelou que a aplicação do protocolo de concentração e purificação teve como consequência: da análise ao longo do genoma uma diminuição da dispersão do gráfico representativo da análise do ganho ou perda de fragmentos genómicos (Figuras 23 (a) e 24 (a)), a diminuição da dispersão

do gráfico representativo do ganho ou perda de fragmentos genómicos para cada cromossoma (Figuras 23 (b) e 24 (b)) e ainda a alteração do valor do DLRS para valores mais aceitáveis (Tabela 18).

Antes da aplicação do Protocolo da Zymo®

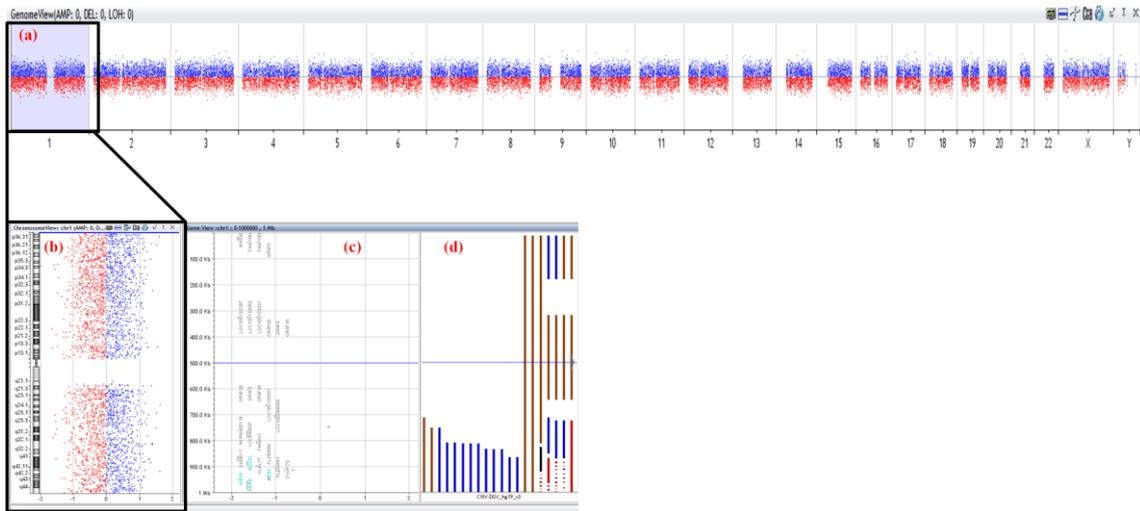


Figura 23- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA774/12 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 1. c) Região no cromossoma 1 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c).

Após aplicação do Protocolo da Zymo®

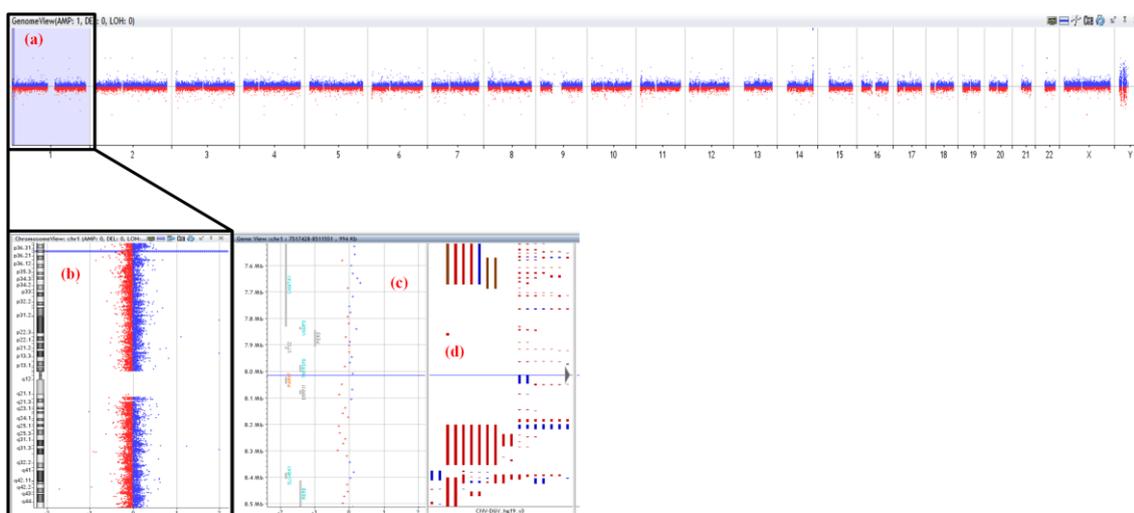


Figura 24- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA774/12 em cultura após realização do Protocolo da Zymo®. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 1. c) Região no cromossoma 1 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c).

Tabela 18- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).

Sem aplicação de protocolo de purificação Zymo							Com aplicação de protocolo de purificação Zymo						
[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas
112,1	1,94	2,14	0,3100	0	0	0	60,6	1,86	2,37	0,1100	0	0	0

Fb33/13

A análise comparativa da amostra do Fb33/13 (com e sem aplicação do Protocolo da Zymo®) por aCGH, revelou que a aplicação do protocolo de concentração e purificação teve como consequência: da análise ao longo de todo o genoma o aparecimento de uma nova alteração (Figuras 25 (e) e 26 (e) e na Tabela 19), a diminuição da dispersão do gráfico representativo da análise do ganho ou perda

de fragmentos genómicos ao longo do genoma (Figuras 25 (a) e 26 (a)), a diminuição da dispersão do gráfico representativo do ganho ou perda de fragmentos genómicos para cada cromossoma (Figuras 25 (b) e 26 (b)) e ainda a alteração do valor do DLRS para valores mais aceitáveis (Tabela 19).

Antes da aplicação do Protocolo da Zymo®

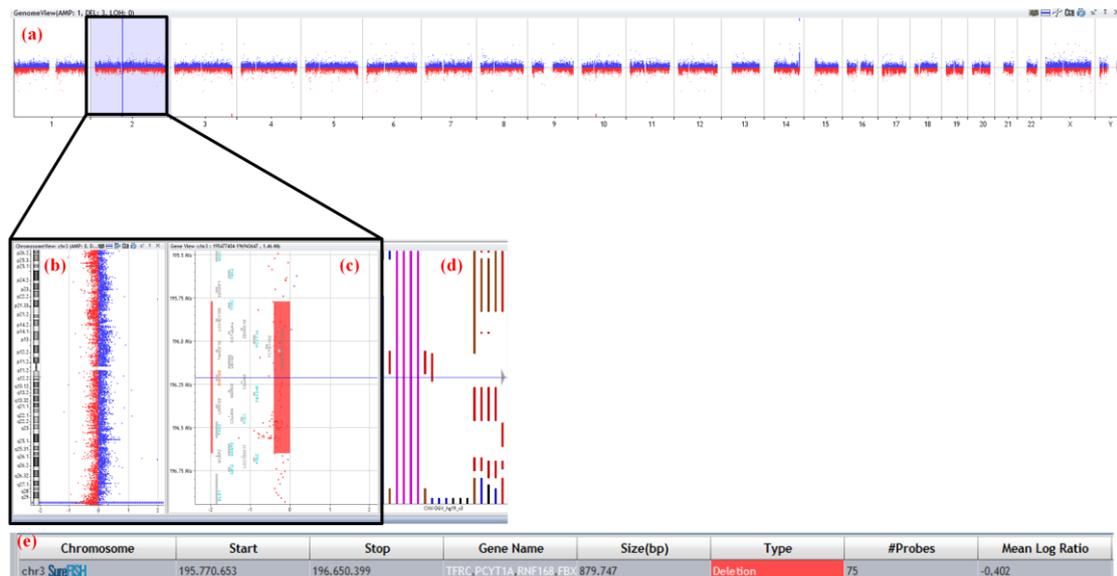


Figura 25- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra Fb33/13 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 2. c) Região no cromossoma 2 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Tabela discriminada da alteração encontrada (deleção) com indicação do cromossoma, região envolvida, tamanho e genes envolvidos.

Após aplicação do Protocolo da Zymo®

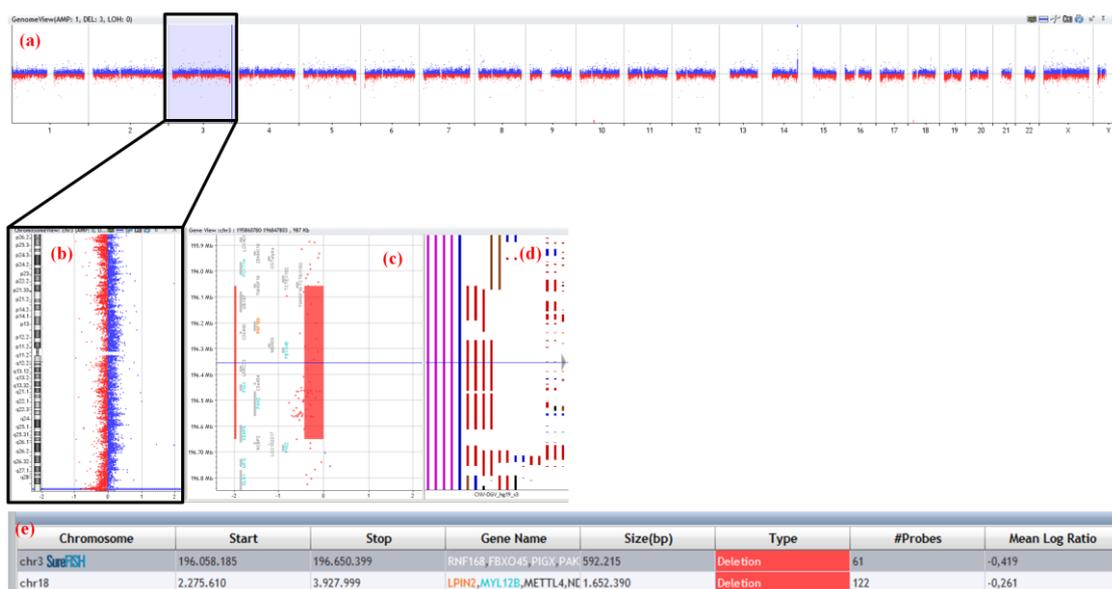


Figura 26- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra Fb33/13 em cultura após realização do Protocolo da Zymo®. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 3. c) Região no cromossoma 3 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Tabela discriminada das 2 alterações encontradas (ambas deleções) com indicação do cromossoma, região envolvida, tamanho e genes envolvidos.

Tabela 19- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).

Sem aplicação de protocolo de purificação Zymo							Com aplicação de protocolo de purificação Zymo						
[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas
26,6	1,86	2,58	0,1700	1	0	1	61,4	1,81	2,29	0,1300	2	0	2

LA759/13

A análise comparativa feita a partir de células da cultura da amostra LA759/13 (com e sem aplicação do Protocolo da Zymo®) por aCGH, revelou que a aplicação do protocolo de concentração e purificação teve como consequência: a eliminação de 3 alterações que correspondiam a falsos positivos (Figuras 27 (e) e Tabela 20), a diminuição da dispersão do gráfico representativo da análise do ganho ou perda de fragmentos genómicos ao longo de todo o genoma (Figuras 27 (a) e 28 (a)), a diminuição do gráfico representativo da análise do ganho ou perda de fragmentos

genómicos para cada cromossoma (Figuras 27 (b) e 28 (b)) e ainda a alteração do valor do DLRS para valores mais aceitáveis (Tabela 20).

Antes da aplicação do Protocolo da Zymo®

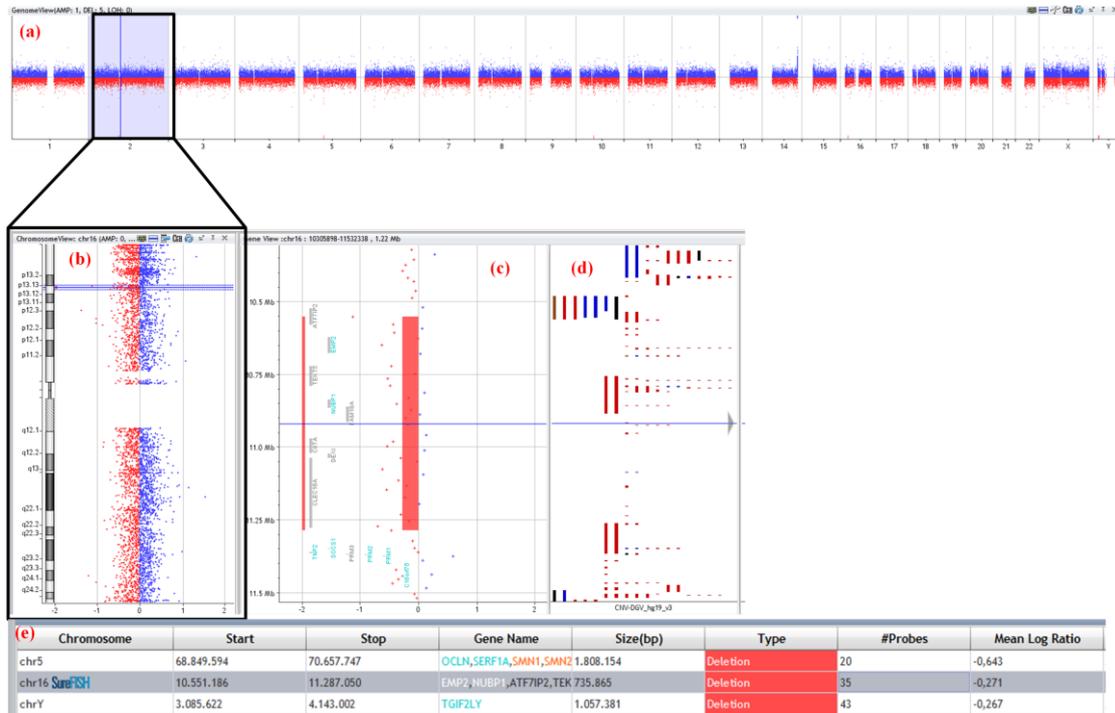


Figura 27- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA759/13 em cultura sem realização do Protocolo da Zymo® em aCGH. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 2. c) Região no cromossoma 2 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Tabela discriminada das 3 alterações encontradas (todas deleções) com indicação do cromossoma, região envolvida, tamanho e genes envolvidos.

Após aplicação do Protocolo da Zymo®

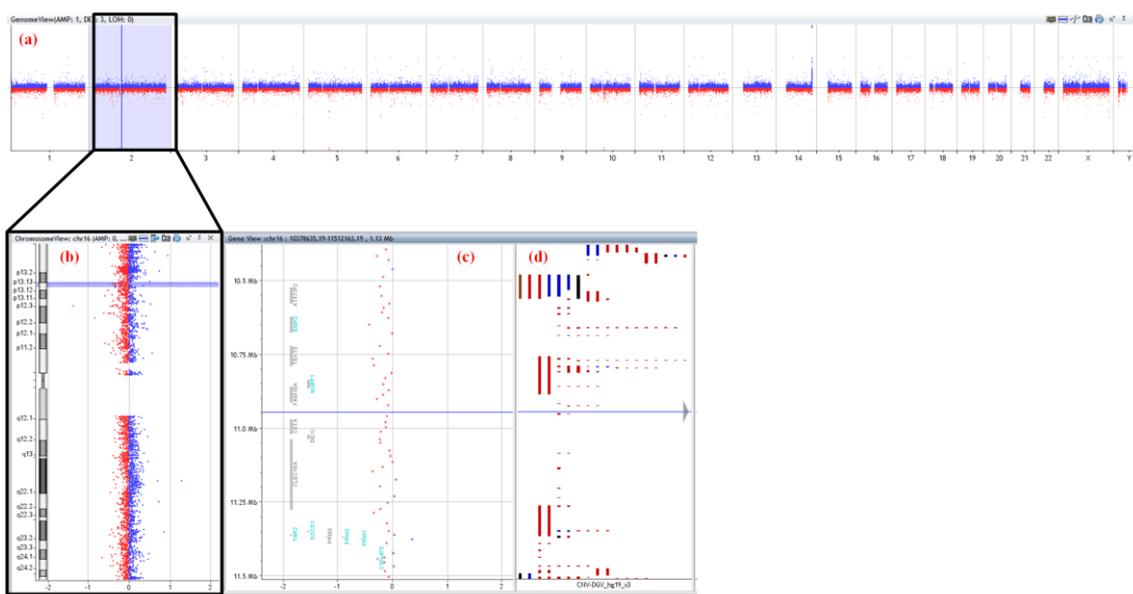


Figura 28- Perfil de resultados em aCGH da aplicação da amostra LA759/13 em cultura após realização do Protocolo da Zymo®. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 2. c) Região no cromossoma 2 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c).

Tabela 20- Valores da concentração de DNA, razão da absorvância 260/280 nm e 260/230 nm das duas amostras (com e sem purificação) aplicadas em aCGH e comparação da influência do Protocolo da Zymo® em relação ao parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas).

Sem aplicação de protocolo de purificação Zymo							Com aplicação de protocolo de purificação Zymo						
[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas
151,8	1,96	1,97	0,2644	3	0	3	125,2	1,89	2,25	0,1115	0	0	0

4.6-Otimização do Protocolo da Qiagen®

Realizou-se a otimização de um método alternativo de extração de DNA implementado recentemente no laboratório, o *Qiamp DNA Blood Midi Kit Qiagen®*. As alterações propostas foram realizadas em relação ao protocolo *standard* fornecido

pelo fabricante. Ao contrário do que foi feito durante a otimização do Protocolo da Roche®, todos os resultados das alterações realizadas em relação a este protocolo foram analisadas após cada amostra ter sido concentrada e purificada pelo Protocolo da Zymo®.

4.6.1-Ajustamento do volume de eluição

A primeira modificação testada foi a alteração do volume de eluição de 300µL para 200µL de acordo com os estudos de Bi e colaboradores em 2008 e Breman e colaboradores em 2012 (Bi *et al.*, 2008; Breman *et al.*, 2009).

A alteração testada revelou de uma forma geral um pequeno aumento da quantidade de DNA extraído e um aumento bastante significativo da concentração e qualidade do DNA na amostra final (Tabela 21).

Tabela 21- Valores da concentração e pureza da amostra de DNA final para os dois volumes de eluição utilizados.

Amostra	Volume de eluição de 300µL			Volume de eluição de 200µL		
	[DNA] ng/µL	260/280 nm	DNA extraído (ng)	[DNA] ng/µL	260/280 nm	DNA extraído (ng)
LA110/14	4,6	1,85	1380	4,9	2,26	980
LA112/14	5,5	2,14	1650	13,4	1,84	2680
LA113/14	6,0	2,49	1800	8,4	1,91	1680

4.6.2-Avaliação da pré-digestão a 55°C durante 30 minutos

Tal como no Protocolo da Roche® foi também testado se a introdução de uma pré-digestão a 55°C durante 30 minutos seria vantajosa para este protocolo de extração. Neste teste foram utilizados os líquidos LA136/14 direto e os líquidos de cultura: LA115/14, LA123/14, LA125/14. É de destacar que no caso do LA136/14, a análise foi feita após a realização do Protocolo da Zymo® para ambos os protocolos (com e sem pré digestão).

A introdução da pré-digestão no protocolo *standard* teve como resultado o aumento da concentração de DNA na amostra final e um leve melhoramento da qualidade do DNA final conforme os valores indicados pelas razões da absorvância a 260/280 nm e 260/230 nm (Tabela 22).

Tabela 22- Valores da concentração e pureza da amostra de DNA final sem e com pré-digestão.

Amostra	Protocolo <i>Standard</i>			Protocolo com realização de pré-digestão		
	[DNA] ng/ μ L	260/280 nm	260/230 nm	[DNA] ng/ μ L	260/280 nm	260/230 nm
LA136/14	27,2	1,70	1,60	29,9	1,73	2,02
LA115/14	7,7	1,82	-2,20	5,0	1,76	-0,92
LA123/14	4,4	1,47	-1,45	5,8	1,53	-2,08
LA125/14	3,4	1,21	-0,60	4,2	1,65	-0,86

4.7-Comparação dos métodos de extração

Após o processo de otimização dos protocolos (Qiagen® e Roche®) procedeu-se a aplicação em paralelo dos dois na mesma amostra de modo a verificar se haveria diferenças de ambos os protocolos em relação à qualidade. A análise dos resultados obtidos foi feita por espectrofotometria para determinação da quantidade e qualidade do DNA extraído (Tabela 23) e por avaliação de resultados de aCGH utilizando um Agilent human genome microarray 4x180K (Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA) (Figuras 29 e 30; Tabela 24). Esta análise comparativa foi realizada recorrendo a DNA extraído de um líquido amniótico não cultivado (direto) (L141/14) e de três líquidos provenientes de cultura (L138/14, L146/14 e L147/14).

4.7.1-Resultados da comparação espectrofotométrica dos dois protocolos otimizados

A comparação dos dois protocolos de extração por espectrofotometria não revelou diferenças de qualidade e quantidade de DNA extraído no caso da extração de DNA do líquido não cultivado (L141/14).

Relativamente aos outros líquidos verificou-se uma maior quantidade de DNA extraída pelo Protocolo da Qiagen®. Em relação à qualidade do DNA os valores da razão da absorvância 260/280 nm demonstraram que à exceção do DNA do LA138/14 extraído pelo Protocolo da Qiagen® todas as amostras de DNA não revelam contaminação com proteínas. Contudo os valores de Abs260/230 nm mostram que apenas o DNA proveniente do líquido LA147/14 extraído pelo Protocolo da Qiagen® se encontra desprovido de contaminantes orgânicos (Tabela 23).

Tabela 23- Comparação dos valores de concentração e pureza de amostras extraídas pelos dois métodos de extração (Roche® e Qiagen®)

Amostra	Protocolo da Roche							Protocolo da Qiagen						
	Antes de Zymo			Depois de Zymo				Antes de Zymo			Depois de Zymo			
	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DNA extraído (ng)	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	[DNA] ng/μL	260/280 nm	260/230 nm	DNA extraído (ng)
L141/14	12,9	1,83	1,05	24,5	1,89	1,62	612,5	4,1	1,73	-2,21	24,8	1,63	1,71	620
L138/14	23,1	1,46	0,78	15,3	1,88	1,84	382,5	9,5	1,74	2,60	22,2	1,78	0,36	555
L146/14	27,5	1,51	0,79	19,6	1,82	0,34	490	12,8	1,81	2,53	33,6	1,86	0,43	840
L147/14	35,4	1,48	0,92	30,8	1,86	0,32	770	15,2	1,77	2,72	43,3	1,85	2,26	1082,5

4.7.2- Resultados da comparação por aCGH dos protocolos otimizados

A análise comparativa das amostras extraídas pelos dois diferentes protocolos por aCGH, não demonstrou diferenças significativas quer em relação a falsos positivos, dispersão do gráfico representativo da análise do ganho ou perda de fragmentos genómicos ao longo do genoma e valor de DLRS (Figura 29, 30 e Tabela 24).

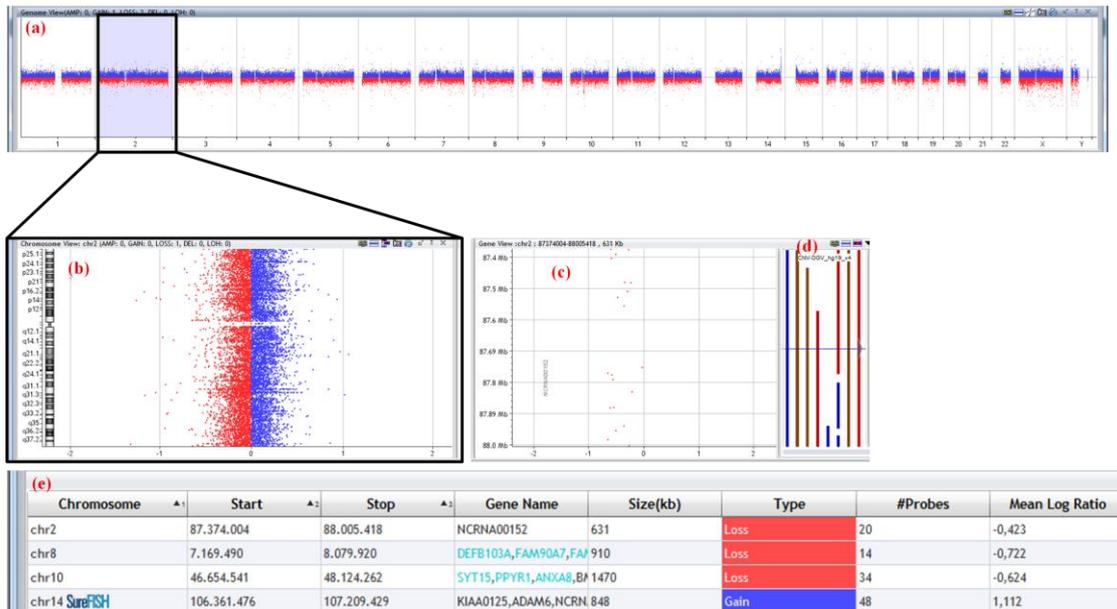


Figura 29- Perfil de resultados em aCGH da amostra LA141/14 extraído pelo Protocolo da Roche®. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 2. c) Região no cromossoma 2 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Tabela discriminada das 4 alterações encontradas (deleções e duplicações) com indicação do cromossoma, região envolvida, tamanho e genes envolvidos.

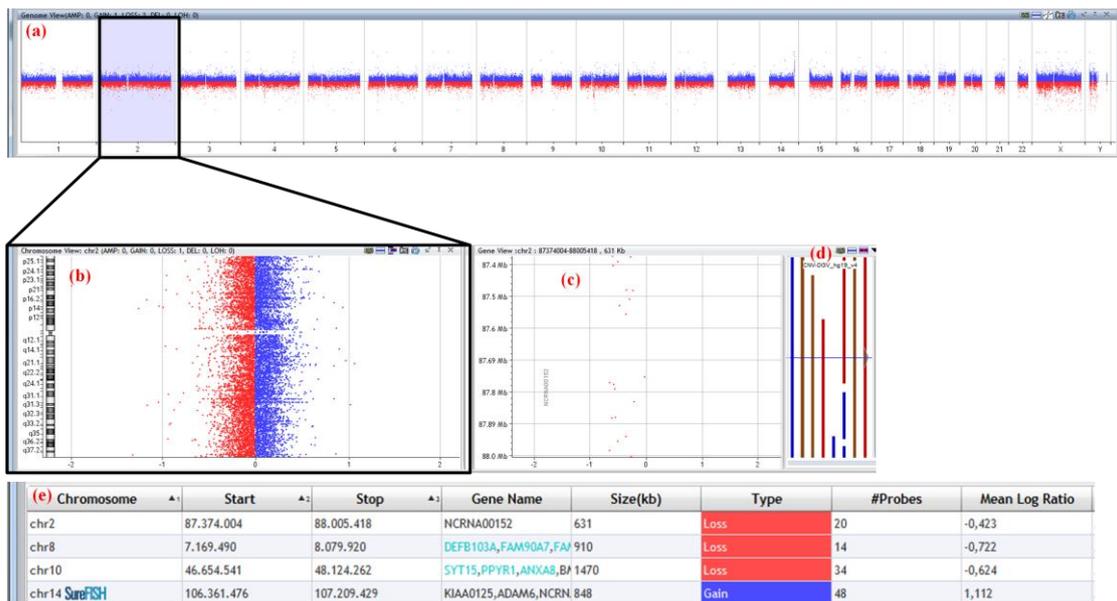


Figura 30- Perfil de resultados de aCGH da amostra LA141/14 extraído pelo Protocolo da Qiagen®. a) *Log ratio spread* ao longo do genoma. b) Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 2. c) Região no cromossoma 2 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Tabela discriminada das 4 alterações encontradas (deleções e duplicações) com indicação do cromossoma, região envolvida, tamanho e genes envolvidos.

Tabela 24- Comparação dos valores do parâmetro DLRS e número de regiões alteradas (amplificadas e deletadas) entre amostras extraídas pelo Protocolo da Roche® e Protocolo da Qiagen®.

DNA extraído pelo Protocolo da Roche®				DNA extraído pelo Protocolo da Qiagen®			
DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas	DLRS	Nº de regiões alteradas	Nº de regiões amplificadas	Nº de regiões deletadas
0,1762	4	1	3	0,1792	4	1	3

A utilidade do aCGH em DPN foi comprovada neste trabalho através da avaliação de uma amostra do Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC recorrendo a duas metodologias: citogenética convencional (atualmente técnica de primeira linha) (Figura 31) e aCGH (Figura 32).

A amostra utilizada correspondeu a uma cultura de um líquido amniótico proveniente de uma gestação de 17 semanas e 2 dias com suspeitas de trissomia 18, com rastreio bioquímico positivo, cujo resultado do cariótipo apontava para uma translocação *de novo* entre os braços longos dos cromossomas 2 e 5 e uma inversão no braço curto do cromossoma 3, também ela *de novo*. A realização do *array* foi feita de modo a avaliar a existência de rearranjos desequilibrados envolvendo possivelmente os pontos de quebra, com possível perda de genes e consequentemente com impacto clínico.

O DNA desta amostra foi extraído utilizando o Protocolo da Roche® e concentrado e purificado utilizando o Protocolo da Zymo®.

Resultado da citogenética

46, XY, t(2;5) (q33;q22) dn, inv(3) (p26.2-p23) dn

Os resultados da realização da técnica de citogenética convencional neste líquido indicaram uma translocação entre os braços longos dos cromossomas 2 e 5 tendo como pontos de quebra q33 e q22, respetivamente, e ainda uma inversão paracêntrica no cromossoma 3 localizada entre p26.2 e p23 (Figura 31).

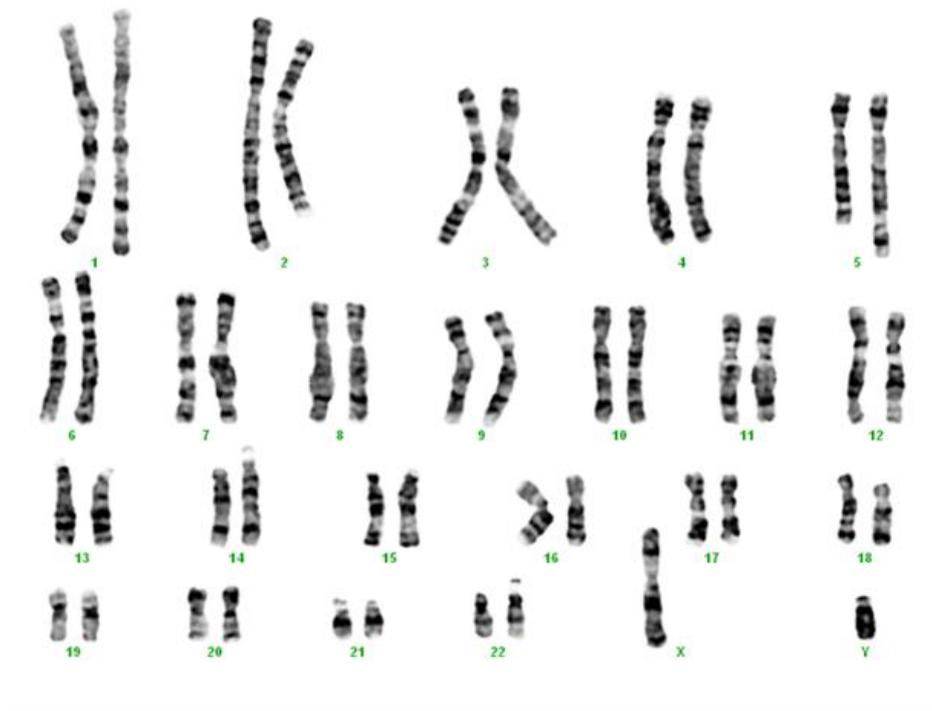


Figura 31- Cariótipo do LA524/12 com t(2;5) e inv(3) (Fonte: Laboratório de Citogenética e Genômica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra)

Resultados do aCGH

A realização da técnica de aCGH neste líquido identificou a existência de 3 deleções localizadas nos cromossomas 3 e 5 mas em localizações diferentes das observadas pela citogenética convencional. A alteração no cromossoma 3 está localizada entre q22.2-q22.3 (135,202,792-136,705,332) e tem um tamanho de 1,5Mb envolvendo um total de 8 genes. A outra alteração encontra-se localizada no braço curto do cromossoma 5 em p13.2 (33,854,643-35,133,927), tendo o tamanho de 1,3Mb e envolvendo um total de 14 genes conhecidos (Figura 32).

O resultado do cariótipo molecular foi:

Arr[hg19] 3q22.2.q22.3(135,202,792;136,705,332)x1,
5p13.2(33,854,643;35,133,927)x1

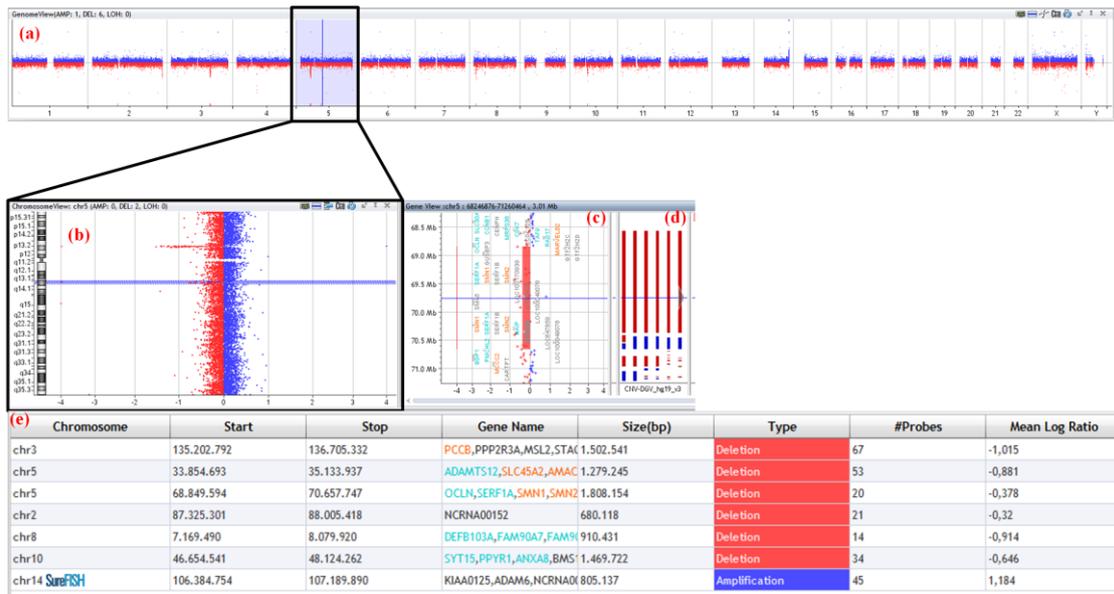


Figura 32- Perfil de resultados de aCGH da amostra LA524/12 em aCGH. a) Comparação da intensidade do sinal entre a amostra e o controlo ao longo de todo o genoma Pormenor de variação do *log ratio spread* para o cromossoma 5. c) Região no cromossoma 5 na qual se verifica uma diferença significativa da hibridização de sondas entre controlo e amostra. d) CNVs reportadas em população normal na região destacada em (c). e) Número total de regiões com suspeita de duplicação ou deleção de regiões do genoma.

4.8-Avaliação da fragmentação do DNA por gel de agarose

A quantidade de DNA necessária para a realização de um ensaio de aCGH não é o único fator a ter em conta para que se possa garantir uma análise adequada. A contaminação do DNA com proteínas ou RNA, e ainda a fragmentação do DNA são fatores que podem condicionar a análise provocando hibridizações heterogéneas do aCGH que pode condicionar uma boa análise ou até mesmo induzir o aparecimento de falsos positivos. Com o objetivo de analisar o grau de fragmentação das amostras que foram submetidas a análise por aCGH, foi realizado um gel de agarose. Além da avaliação do grau de fragmentação do DNA, foi ainda avaliada a possibilidade de remoção de DNA fragmentado através do Protocolo da Zymo®.

Os resultados da análise deste gel demonstram que em geral não parece haver fragmentação do DNA das amostras analisadas. Porém, ressaltam-se algumas suspeitas no DNA das amostras CV5/14 (poço 2 e 3), LA774/12 (poço 6 e 7) e

LA759/13 (poço 11 e 12) devido à existência de um reduzido arrastamento que não se verifica nas outras amostras analisadas (Figura 33).

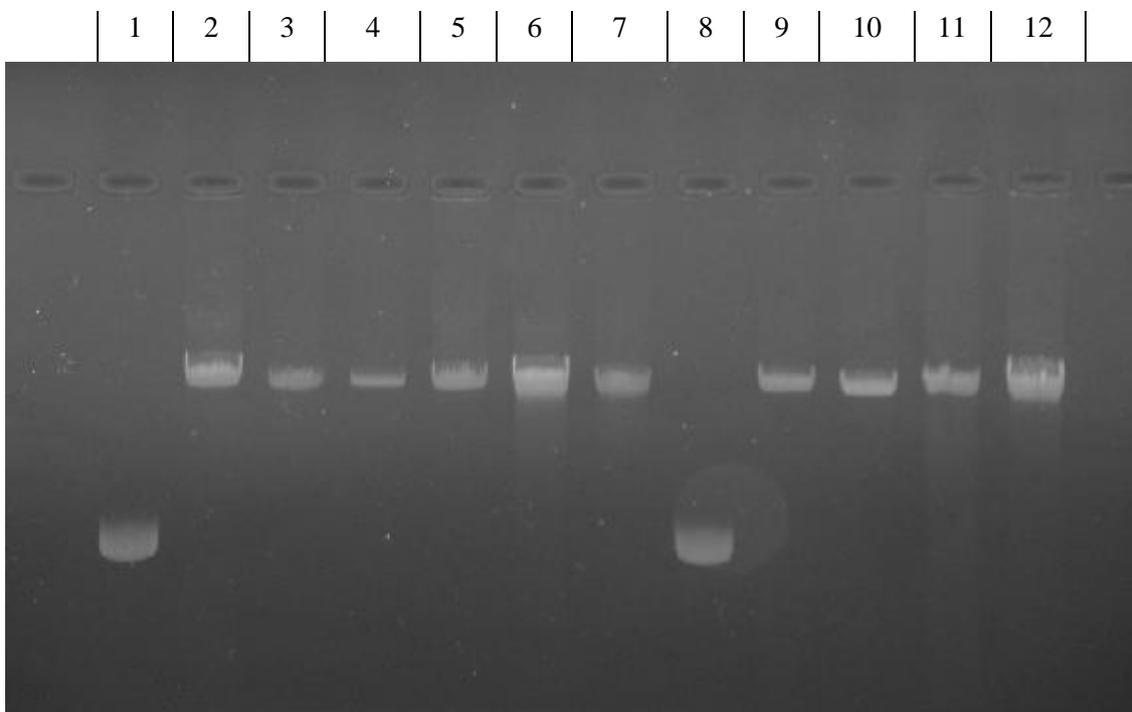


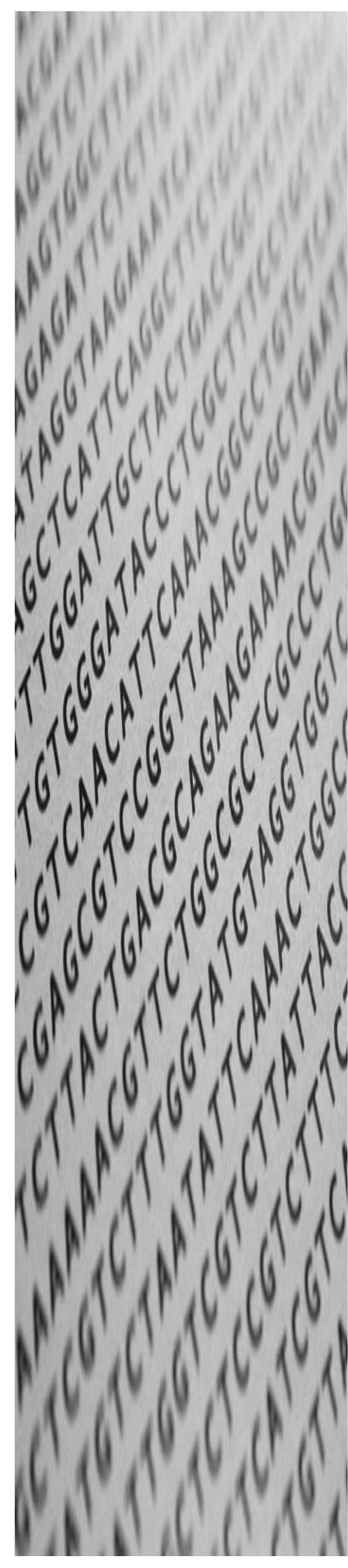
Figura 33- Gel de agarose a 1,5% para avaliação do grau de fragmentação do DNA. 1) Marcador Molecular, 2) CV5 sem purificação, 3) CV5 após purificação, 4) Fb33 purificação, 5) Fb33 após purificação, 6) LA774 sem purificação 7) LA774 purificação 8) Marcador Molecular, 9) LA30 purificação 10) LA30 após purificação 11) LA759 sem purificação 12) LA759 após purificação.

4.9- Aplicação de *Array comparative genomic hybridization* em amostras de líquido amniótico direto do Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC

A última etapa do trabalho correspondeu a uma aplicação da estratégia otimizada ao longo deste estudo (extração do DNA pelo Protocolo da Roche® seguido da aplicação do Protocolo da Zymo®) em amostras de líquido amniótico diretas que eram recebidas pelo LCG da FMUC. À exceção das amostras LA272/14 e LA141/14, todas as amostras na qual foi aplicada a estratégia otimizada ao longo deste estudo demonstraram valores de concentração e pureza dentro dos valores necessários para a realização de aCGH (Tabela 25).

Tabela 25- Valores da avaliação espectrofotométrica da quantidade e pureza do DNA extraído de líquido amniótico direto de acordo com a estratégia otimizada.

Amostra	Semanas/ Dias	Informação clínica	Quantidade de líquido amniótico usado para extração (mL)	Antes da aplicação do protocolo da Zymo			Após aplicação do protocolo da Zymo		
				[DNA] ng/ μ L	260/280 nm	260/230 nm	[DNA] ng/ μ L	260/280 nm	260/230 nm
LA272/14	15s 6d	Malformações ecográficas	13	21,9	1,63	0,79	17,6	1,72	1,47
LA252/14	16s 4d	Grávida com rearranjo cromossômico	13	23,2	1,67	1,07	34,2	1,89	1,97
LA141/14	17s 0d	Idade materna avançada e 2 filhos com autismo	8,5	12,9	1,83	1,05	24,5	1,89	1,62
LA531/13	20s 6d	Malformações ecográficas (Displasia renal bilateral)	10	26,6	1,65	1,03	50,7	1,84	2,09
LA147/14	22s 5d	Malformações ecográficas (Arnold Chiari II)	10	20,8	1,7	1,26	33,9	1,77	1,95
LA70/14	23s 0d	Malformações ecográficas (Cardiopatia)	10	25,6	1,62	1,05	42,9	1,55	1,71
LA729/13	23s 0d	Rastreamento bioquímico 1.º Trimestre elevado para T18	15	79,7	1,93	2,33	45,1	1,89	2,24
LA340/14	23s 6d	Malformações ecográficas (Calcificações hepáticas)	9	39,6	1,70	1,15	28,8	2,03	2,24
LA530/13	24s 0d	Malformações ecográficas	10	44,9	1,81	1,46	76,1	1,91	2,31
LA87/14	28s 7d	Malformações ecográficas (Agenesia renal)	8	38,6	1,75	1,69	55,1	1,90	2,29



DISCUSSÃO

DE

RESULTADOS

5.1 - Utilidade do *Array comparative genomic hybridization* em diagnóstico pré-natal

Desde a década de 70 que o cariótipo é a tecnologia de primeira linha no despiste de alterações cromossômicas em diagnóstico pré-natal (DPN). Recentemente surgiu uma tecnologia de maior resolução e rápida emissão de resultados, o aCGH, que passou a ser considerado a tecnologia de primeira linha no despiste de desequilíbrios genômicos em diagnóstico pós-natal em determinadas situações clínicas. Atualmente tem-se avaliado a utilidade desta técnica como procedimento de rotina em DPN (Vermeesch *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2010; Wapner *et al.*, 2012).

Apesar do seu grande poder de resolução o aCGH tem como limitação a incapacidade para a detecção de rearranjos cromossômicos equilibrados, baixos níveis de mosaïcismo e ainda resultados que apontam para alterações cuja significância ao nível do fenótipo é ainda desconhecida. Esta é talvez a maior debilidade da tecnologia de *array* em DPN pois o estudo do genoma em toda a sua extensão recorrendo a uma tecnologia de tão elevada resolução pode ter como resultado a identificação de CNVs cujo valor fenotípico ainda é desconhecido (Evangelidou *et al.*, 2013).

O processo de introdução do aCGH no DPN tem sido conseqüentemente muito discutido, e apesar de bastante estudado carece ainda de resultados que permitam dar resposta a uma série de questões que se levantam, tais como:

(1) Em que casos deve o array ser aplicado tendo em conta que se trata de uma tecnologia economicamente dispendiosa?

(2) Deve ser aplicado isoladamente ou como complemento de outro teste de diagnóstico que permita ultrapassar as suas limitações?

(3) Em caso de se tornar necessária a realização de outro teste em paralelo, que teste deverá ser utilizado?

(4) Quais as indicações que determinam a necessidade de realização de aCGH no DPN?

(5) Qual a plataforma de array que garante melhores resultados neste contexto?

(6) Quais as quantidades de líquido amniótico necessário para que se possa realizar esta técnica, tendo em conta a variável imposta pelo número de semanas do líquido amniótico?

As limitações do array resultantes da dificuldade de classificação de CNVs como benignas ou patogénicas, tem sido um dos principais argumentos que tem dificultado a introdução do array como teste de DPN. De forma a tentar ultrapassar esta limitação, os laboratórios têm recorrido a vários métodos, do qual se destaca o uso de uma plataforma de array que permita um estudo focado em zonas de importância clínica mais relevante. Em outros casos, como forma de ultrapassar a limitação causada pela baixa informação clínica das CNVs identificadas, a metodologia de array envolve um estudo dos progenitores de modo a determinar a sua origem (herdada, em caso da mesma alteração estar presente num dos progenitores ou *de novo* no caso da mesma não estar presente em nenhum dos progenitores). É ainda importante a consulta de bases de dados de CNVs reportadas em indivíduos saudáveis e análise dos genes envolvidos no desequilíbrio (Miller *et al.*, 2010).

Em 2011, Fiorentino e colaboradores num estudo que envolveu um total de 1037 amostras com indicações de idade materna avançada, anomalias ecográficas e ansiedade por parte dos pais, analisadas separadamente por citogenética convencional e aCGH, verificaram que o *array* classificou 34 amostras como patogénicas, de entre as quais 9 tinham cariótipo normal. Dessas 1037 amostras, 25 tinham cariótipo anormal e quando analisadas por array, apenas 1 não foi classificada como patogénica (Fiorentino *et al.*, 2011).

No ano seguinte, em 2012, Wapner e colaboradores realizaram o estudo de comparação entre o aCGH e a citogenética convencional, que envolveu um número de amostras significativo (n=4406). Como resultados destaca-se a capacidade que o array tem de identificar alterações em 6% das amostras que tinham um cariótipo normal (Wapner *et al.*, 2012).

Mais tarde, em 2013 com o objetivo de investigar as potencialidades do aCGH em DPN, Evangelidou e colaboradores fizeram um levantamento de vários estudos que tinham como ponto em comum a identificação por aCGH de anomalias impossíveis de detetar por cariótipo. De uma forma geral, determinaram que o aCGH

tem a capacidade de detecção de CNVs patogénicas num valor superior a 5% quando comparada à análise por cariótipo (Evangelidou *et al.*, 2013).

O número de estudos com o objetivo de avaliar a importância do array no DPN tem vindo a crescer de ano para ano. Num artigo de opinião, publicado em Dezembro de 2013 pelo Comité Americano de Obstetrícia e Ginecologia, foi revelado que apesar do crescente aumento de publicações de aplicação do aCGH no DPN, este ainda não é suficiente para que haja uma validação consensual da sua introdução como tecnologia de DPN. Neste estudo é ainda discutido qual o tipo de plataforma de array mais adequado para uso em DPN. Fazendo uma análise mais abrangente, o aCGH poderá por um lado detetar um maior número de alterações, porém leva também a um aumento do número de alterações de relevância clínica desconhecida. Uma análise mais dirigida permite diminuir o número de alterações de relevância clínica desconhecida, mas por outro lado poderá também limitar a capacidade de diagnóstico (ACOG, 2013).

A comparação entre resultados provenientes da citogenética convencional (Figura 31) e aCGH (Figura 32) foi testada neste trabalho utilizando o LA524/12, proveniente de uma gestação que apresentava indicações de rastreio bioquímico positivo. De acordo com os resultados provenientes da citogenética este caso indicava que estávamos perante uma translocação entre o cromossoma 2 e 5 tendo como pontos de quebra q33 e q22, respetivamente, e ainda uma inversão no cromossoma 3 localizada entre p26.2 e p23. O estudo dos progenitores determinou que a origem destas alterações era *de novo*. Assim sendo o risco do feto ter défice cognitivo seria de 6%, tendo sido dado ao casal a opção de uma interrupção médica da gravidez.

De forma a avaliar a existência de desequilíbrios nos pontos de quebra de ambas as alterações (nos cromossomas 2, 3 e 5) ou noutra localização do genoma realizou-se aCGH neste líquido, tendo como resultado a identificação de 3 alterações, com localizações diferentes das observadas nos pontos de quebra dos cromossomas 3 e 5. A análise da base de dados bioinformática revelou que uma das três alterações já tinha sido detetada anteriormente em indivíduos normais e como tal foi classificada como benigna. Por outro lado, as outras alterações detetadas correspondiam a uma deleção de 1,5 Mb no braço longo do cromossoma 3, (q22.2q22.3) (135,202,792-136,705,332), que contém um total de 8 genes. A outra alteração encontra-se

localizada no braço curto do cromossoma 5 (p13.2) (33,854,643-35,133,927), tendo o tamanho de 1,3Mb e envolvendo um total de 14 genes conhecidos. Esta análise por *array* serviu para constatar que para além das alterações cromossómicas equilibradas (translocação 2;5 e inversão 3), houve uma perda de um total de 22 genes noutras localizações nos cromossomas 3 e 5. Antecipou-se portanto que estes desequilíbrios teriam um impacto no fenótipo. A análise desta amostra serviu para reforçar a utilidade do aCGH como tecnologia a utilizar em DPN. Neste caso o cariótipo permitiu a deteção dos rearranjos cromossómicos, não tendo no entanto resolução para detetar as microdeleções identificada por aCGH. O uso do array forneceu dados bastante importantes para o diagnóstico, uma vez que permitiu um cálculo de risco de alterações no feto muito superior ao risco inicial com estudo do cariótipo.

5.2 - Importância da qualidade do DNA a ser utilizado em *Array comparative genomic hybridization*

A qualidade do DNA é um fator de extrema importância na realização de tecnologias de análise do genoma. Um dos principais objetivos deste trabalho foi desenvolver um processo de otimização, no procedimento que decorre desde a chegada da amostra de líquido amniótico ao laboratório, até ao momento em que a amostra de DNA extraído é aplicada no array, sem que haja necessidade de realização de uma cultura prévia. É necessário que a amostra de DNA final, obtida a partir de líquido direto, seja desprovida de qualquer tipo de contaminante ou fragmentação que possam prejudicar a sua análise. Dada a dificuldade de obtenção de amostras de líquido amniótico ao longo da realização do estudo, algumas otimizações tiveram de ser realizadas recorrendo a culturas de líquidos e, no caso especial do Protocolo da Zymo®, utilizou-se DNA extraído de amostras de sangue periférico e fibroblastos.

Todo o processo de otimização realizado neste estudo teve como objetivo definir a melhor estratégia de modo a maximizar a concentração de DNA na amostra final e com um grau reduzido de contaminantes como proteínas, ácidos orgânicos ou sais dos tampões utilizados no protocolo de extração. A primeira alteração proposta ao protocolo de extração de DNA, que era até à data mais usado no LCG da FMUC, para a extração de DNA a partir de líquido amniótico e vilosidades coriônicas o '*High Pure*

PCR Template Preparation Kit (Version 20, Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, Germany), foi a introdução de uma etapa de pré-digestão, de modo a maximizar a eficiência da *proteinase K*, na tentativa de aumentar não só a quantidade de DNA extraído como também de diminuir a contaminação proteica da amostra final (Tabela 10). A avaliação desta alteração em três líquidos (LA94/14, LA127/14 e LA128/14), todos eles provenientes de cultura, revelou-se positiva, uma vez que ocorreu um aumento da quantidade de DNA extraído em todos os líquidos testados, sem comprometer os valores de pureza. Porém, é importante salientar que neste caso foram utilizados como fonte de DNA líquidos provenientes de cultura, o que potencializa a presença de um maior número de contaminantes, quando comparado com uma extração feita a partir de líquido direto.

Relativamente à otimização do protocolo de concentração e purificação, o primeiro ajustamento a ser feito foi no volume de eluição final (Tabela 11), de forma a definir o volume adequado que permitisse um máximo de concentração com perdas mínimas de DNA. De entre os volumes testados verificou-se uma amostra final com melhores valores de pureza nos volumes de 25 e 40 μL . Em relação à perda de DNA, verificou-se que esta não sofre alterações significativas com a variação do volume de eluição. A realização deste teste serviu ainda para verificar uma limitação deste protocolo de concentração. Em casos de amostras muito concentradas (valores superiores a 60 $\text{ng}/\mu\text{L}$) verifica-se que a aplicação deste protocolo tem como consequência a perda de uma grande parte do material genético, obtendo-se rendimentos bastante mais baixos. Nestes casos é então preferível a utilização de um volume de eluição maior, de modo a minorizar a perda de material genético.

Segundo indicações dadas pelo protocolo do fornecedor, a perda de DNA é menor no caso da temperatura do tampão de eluição utilizado, for de aproximadamente 70°C. Porém no tempo decorrido entre a retirada do tampão do banho e a aplicação na coluna existe uma perda de calor que faz com que o tampão seja colocado nas colunas a uma temperatura inferior principalmente quando se processam várias amostras em simultâneo. Deste modo optou-se por testar um aumento da temperatura de incubação do tampão de eluição de 70 para 80°C, que veio a revelar um rendimento de recuperação significativamente superior (aumento de 44% para 61%) (Tabela 12).

Após a otimização do protocolo de concentração e purificação seguiu-se a avaliação da influência que este tem na melhoria dos resultados obtidos no aCGH. A avaliação da qualidade do DNA purificado foi efetuada por espectrofotometria e mais tarde por avaliação dos resultados por aCGH, para 5 amostras (LA30/13, CV5/14, LA774/12, Fb33/13 e LA759/13). A análise por espectrofotômetro sugere à partida que a utilização deste protocolo pode ser duplamente vantajosa. A primeira vantagem está relacionada com a recuperação de algumas amostras que inicialmente não teriam o valor de concentração de DNA necessário para a realização do ensaio de *array*. Apesar de alguns estudos defenderem que apenas é necessária a quantidade de 250 ng de DNA para a realização de um ensaio de aCGH (Hardin *et al.*, 2009), no LCG-FMUC considera-se que uma amostra terá de ter uma quantidade de DNA superior a 700 ng para que seja analisada em aCGH. Em relação a valores de concentrações da amostra a analisar, tendo em conta que apenas pode ser colocado na plataforma de array um volume de 26 μ L de amostra é necessário por isso garantir amostras com uma concentração superior a 30-40 ng/ μ L.

A recuperação de amostras para aplicação em aCGH, resultante da aplicação do Protocolo da Zymo® foi visível nas amostras: LA531/13 (Figura 15) e LA21/14 (Figura 17). Para além da concentração, a melhoria dos índices de pureza, resultante da aplicação do protocolo de concentração e purificação verificou-se através dos valores da razão da absorvância 260/280 e 260/230, nas amostras: LA530/13 (Figura 14), LA531/13 (Figura 15), LA551/13 (Figura 16), LA21/14 (Figura 17) e LA759/13 (Figura 18).

A análise por aCGH revelou que este protocolo pode trazer ainda mais vantagens no processo de análise de resultados. De uma forma geral, comparando a mesma amostra com e sem a aplicação do protocolo de concentração e purificação é de destacar que em todas as amostras analisadas por *array* há uma redução da dispersão do gráfico representativo da perda ou ganho de genes por parte amostra do doente, visível nas Figuras 19 (a) (b), 20 (a) (b), 21 (a) (b), 22 (a) (b), 23 (a) (b), 24 (a) (b), 25 (a) (b), 26 (a) (b), 27 (a) (b) e 28 (a) (b) em caso de aplicação do Protocolo da Zymo®.

Analisando agora a influência deste protocolo de forma particular em cada amostra, verifica-se que no caso do LA30/13 a análise sem aplicação do Protocolo da

Zymo® dava conta da existência de 15 alterações, apesar da suspeita de algumas delas serem não reais, devido ao seu valor de *Log Ratio* (Figura 19). Teoricamente é esperado que este valor seja de aproximadamente -1 ($\text{Log}_2 1/2 = -1$) para casos de deleções e 0,58 ($\text{Log}_2 3/2 = 0,58$) para duplicações. Caso haja um distanciamento do valor de *Log Ratio* face aos valores teóricos há então uma suspeita de podermos estar perante uma alteração não real. A aplicação do Protocolo da Zymo® veio a comprovar o facto de 10 das alterações levantadas anteriormente serem mesmo não reais, considerando a existência de apenas 5 alterações reais que vieram mais tarde a ser classificadas como benignas (Figura 20).

A vantagem da aplicação do protocolo de concentração e purificação foi igualmente demonstrada neste caso pela redução do valor do DLRS (de 0,2283 para 0,1743) para valores aceitáveis, indicando desta forma o aumento do padrão de qualidade (Tabela 16). De acordo com os parâmetros de qualidade da plataforma utilizada, os valores de DLRS deverão ser inferiores a 0,20 para garantir robustez na análise. Quando este valor é ultrapassado os critérios de qualidade não foram atingidos podendo indicar que estamos perante uma amostra de DNA de baixa qualidade, que comprometeram a eficiência do aCGG.

Relativamente às outras amostras verificou-se igualmente uma diminuição dos valores DLRS, indicativos de melhoria dos padrões de qualidade, comum a todos os casos que foram tratados com o Protocolo da Zymo® (Tabelas 17, 18, 19 e 20). Além disso também se verificou a eliminação de mais casos de falsos positivos em mais duas amostras (CV5/14 e LA759/13), porém em número mais reduzido quando comparado com o primeiro líquido analisado (LA30/13) (Tabelas 17 e 20).

O caso do fibroblasto 33 revelou um resultado diferente das outras 4 amostras analisadas por aCGH. Neste caso além da suspeita de uma deleção em mosaico que se manteve com a aplicação do Protocolo da Zymo®, verificou-se que a aplicação deste último protocolo, ao contrário do que aconteceu nos outros 4 casos analisados, revelou o aparecimento de uma nova alteração (Figuras 25 (e) e 26 (e)). Estas alterações foram mais tarde classificadas como não reais através de nova análise recorrendo à tecnologia de FISH.

Após a análise destas 5 amostras diferentes por aCGH concluiu-se que o protocolo de concentração e purificação tem uma ação sobre a amostra, que permite

melhorar quer o processo de análise dos resultados quer o padrão de qualidade do array. De forma a verificar se a impossibilidade de obtenção de resultados, bem como os resultados de aCGH que contêm padrões de qualidade fora daquilo que é pretendido, estão relacionados com uma possível fragmentação do DNA e qual a ação do Protocolo da Zymo® nestes casos, procedeu-se à realização de um gel de agarose cujo resultado está representado na Figura 33. A análise deste gel revela que em geral não parece haver fragmentação do DNA das amostras analisadas. Porém, ressaltam-se algumas suspeitas de fragmentação de DNA no LA774/12 e LA759/13 devido à existência de um reduzido arrastamento que não se verifica nas outras amostras analisadas.

Em relação ao efeito que o Protocolo da Zymo® tem sobre o melhoramento da amostra, concluiu-se com a realização deste ensaio de eletroforese, que não está relacionado com a possibilidade de eliminação das moléculas de DNA que se encontram fragmentadas, dado que comparando as amostras com e sem a aplicação do protocolo de concentração e purificação estas apresentam o mesmo nível de arrastamento sem evidência de fragmentação.

Com estes resultados salienta-se ainda a conclusão de que a impossibilidade de análise de resultados em certas amostras testadas em *array* não se deve à fragmentação de DNA, podendo antes estar associada à presença de qualquer contaminante químico (por exemplo excesso de sais dos tampões utilizados no método de extração) que interfere com o normal procedimento de marcação no aCGH.

Após a validação da importância do uso em DPN de um protocolo de concentração e purificação seguiu-se a avaliação da influência do método de extração na qualidade e concentração da amostra a aplicar na plataforma de *array*. Tendo em conta as razões já referidas numa fase anterior deste trabalho, o protocolo comercial testado além do que já era utilizado como prática comum no laboratório foi o *Qiamp DNA Blood Midi kit Qiagen®*.

Tal como os protocolos anteriores também este foi alvo de alterações em relação ao protocolo que foi fornecido pela marca. A fase inicial envolveu um ajuste do volume de eluição final testando os volumes de 300 µL (sugerido pelo fornecedor) e 200µL (com re-eluição). Apesar de alguma discrepância dos resultados esta alteração foi positiva, não só por melhorar a pureza em 2 das 3 amostras testadas como também

por de uma forma geral aumentar a quantidade de DNA extraído e a sua concentração na amostra final (Tabela 21).

A etapa de pré-digestão com *proteínase K* a 55°C durante 30 minutos também foi testada neste protocolo revelando de uma forma geral um aumento da quantidade e qualidade de DNA extraído (Tabela 22).

Finalizadas as otimizações em ambos os protocolos seguiu-se a uma análise comparativa recorrendo a um líquido da qual se extraiu DNA de forma direta (LA141/14) e a três líquidos provenientes de cultura (LA138/14, LA146/14 e LA147/14). Estas amostras foram extraídas separadamente utilizando o Protocolo da Roche® e da Qiagen®, e analisadas numa primeira fase recorrendo à espectrofotometria (Tabela 23) e numa segunda fase a aCGH, onde apenas foi utilizado o líquido 141/14 (Figuras 29 e 30). O objetivo desta análise seria averiguar se o maior investimento económico resultando do uso do protocolo de extração de DNA da Qiagen® seria compensatório, tendo em conta a concentração final da amostra, a sua pureza e qual a sua influência no padrões de qualidade do aCGH.

Tendo em conta os resultados provenientes da espectrofotometria e do aCGH, ambos os métodos de extração, após a aplicação do Protocolo da Zymo®, apresentaram DNA com valores de concentração e pureza final bastante semelhantes. A exceção ocorreu no caso dos líquidos de cultura em que se obteve uma maior concentração de DNA extraído pelo extraído pelo Protocolo de extração da Qiagen® em relação ao da Roche® partindo do mesmo volume de líquido amniótico inicial. Relativamente à pureza das amostras é de salientar uma baixa contaminação proteica de quase todas as amostras (à exceção do LA138/14 extraído pela Qiagen®, que revela valor de contaminação com proteínas). Contudo os valores de Abs_{260/230} nm apenas apresentam um valor dentro do intervalo pretendido num único líquido (LA147/14 extraído pela Qiagen) (Tabela 23).

De uma forma geral verificou-se que tanto a nível de concentração final da amostra como a nível de qualidade da amostra final não existe uma grande discrepância de valores de concentração e pureza na amostra final entre os dois métodos.

A comparação das 2 amostras resultantes da aplicação dos dois protocolos por aCGH também não revelou diferenças significativas sendo detetadas as mesmas alterações em ambos os ensaios de aCGH que obtiveram um valor de DLRS bastante próximo (Tabela 24). Desta forma e tendo em conta que o método de extração da Qiagen implica um investimento económico cerca de 4 vezes superior em relação ao método da Roche por amostra, o Protocolo da Roche® acaba por ser aquele que reúne as melhores condições custo/benefício para ser utilizado na estratégia de extração de DNA.

5.3- Validação das otimizações em amostras de líquido amniótico direto

Finalizado o processo de otimização dos protocolos de extração seguiu-se uma validação de todo o trabalho desenvolvido em amostras de líquido amniótico que chegavam ao laboratório numa fase posterior à otimização dos protocolos. O objetivo foi verificar qual a concentração final de DNA que se poderia obter através de um determinado volume de líquido, extraído DNA de forma direta e sem a realização de uma cultura.

A realização de uma análise de líquido amniótico de uma forma direta apresenta várias vantagens face à análise por cultura: (1) a realização de cultura implica um maior intervalo de tempo para a obtenção do resultado de diagnóstico, (2) a obtenção de DNA de forma direta provoca uma menor contaminação da amostra final, resultado do maior número de contaminantes existentes na cultura que pode provocar a impossibilidade de interpretação de resultados e (3) a realização de cultura está associada a problemas em casos de mosaicismo, onde a amostra proveniente de cultura pode não ser representativa da amostra fetal. As 2 linhagens de células poderão ter uma diferente taxa de divisão celular em cultura, fazendo com que no final da cultura o índice de mosaicismo seja diferente daquele que seria obtido em caso de análise direta do líquido.

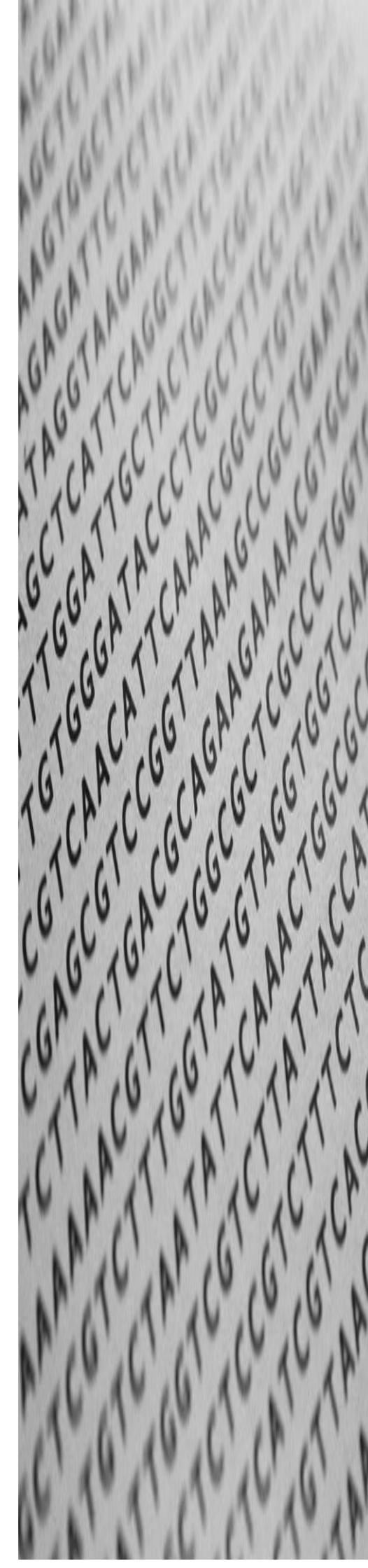
Foram utilizadas 10 amostras distintas todas extraídas pelo Protocolo da Roche® otimizado seguido do Protocolo da Zymo® (Tabela 25). De todas as amostras analisadas apenas o LA272/14 revelou um valor de concentração de DNA insuficiente para a realização de aCGH. Porém esta insuficiência parece estar associada a algum problema existente na aplicação do protocolo de concentração visto que esta passou a ser menor, ao contrário do que normalmente acontecia. Em relação às outras amostras, todas elas apresentavam um valor de concentração a rondar os esperados 30 ng/μL, que garantem à partida a possibilidade de realização do *array*.

De entre as 10 amostras extraídas apenas 2 (LA141/14 e LA729/13) foram até à data analisadas por aCGH, tendo revelado bons padrões de qualidade que possibilitaram a análise de resultados, garantindo deste modo que a quantidade de líquido amniótico fornecido nestas 2 amostras é suficiente para a realização de pelo menos um ensaio de *array*.

Os resultados deste trabalho além de reforçarem a importância da tecnologia de aCGH em DPN, fornecem ainda uma estratégia a desenvolver desde a chegada da amostra de líquido amniótico ao laboratório até à aplicação do DNA extraído em aCGH, comprovando desta forma a possibilidade de realização desta tecnologia de elevada resolução partindo de líquidos amnióticos recolhidos a partir das 15 semanas de gestação.

CONCLUSÕES

- A comparação realizada entre os dois protocolos de extração de DNA otimizados, permitiu concluir que a estratégia que garante a máxima quantidade de DNA de qualidade, para aplicação em aCGH (tendo em conta a relação custo/desempenho), corresponde à extração de DNA recorrendo ao Protocolo da Roche® seguido da aplicação do Protocolo da Zymo®, ambos realizados de acordo com a metodologia otimizada neste trabalho.
- A realização do ensaio de eletroforese em gel de agarose permitiu concluir que o melhoramento dos padrões de qualidade do aCGH, resultado da aplicação do Protocolo da Zymo®, não se encontra associado a qualquer fragmentação existente no DNA da amostra. Esta conclusão sugere que a impossibilidade de análise de resultados em alguns ensaios de aCGH pode estar relacionada com a presença de contaminantes químicos que impedem a correta ligação entre o fluorocromo e DNA da amostra em estudo ou a hibridização entre o DNA fluorescente e a sonda contida na placa de aCGH.
- A implementação da estratégia definida ao longo deste estudo para a extração e purificação de DNA para aCGH partindo de líquido amniótico direto, permitiu confirmar a possibilidade de análise de cromossomopatias por esta tecnologia, partindo de definir parâmetros mínimo de volumes de líquido amniótico (resultantes de amniocenteses realizadas em diferentes períodos gestacionais).



BIBLIOGRAFIA

- Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. 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* 2013; **6**: 16.
- Ahn JW, Mann K, Walsh S, Shehab M, Hoang S, Docherty Z, Mohammed S, Ogilvie CM. Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. *Molecular Cytogenetics* 2010; **3**: 9.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Array Comparative Genomic Hybridization in Prenatal Diagnosis, *ACOG Committee Opinion No. 446* 2009; **114**: 1161-1163.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Ethical Issues in Genetic Testing, *ACOG Committee Opinion No. 410* 2008; **111**: 1495-1502.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Aneuploidy, *ACOG Committee Opinion No. 545* 2012; **120**: 1532-1534.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. The use of Chromosomal Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis. *ACOG Committee Opinion No. 584* 2013; **122**: 1374-1377.
- Antsaklis A, Souka AP, Daskalakis G, Kavalakis Y, Michalas S. Second-trimester amniocentesis vs. chorionic villus sampling for prenatal diagnosis in multiple gestations. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2002; **20**: 476-481.
- Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, García-Aragonés M, Villa O, Mansilla E, Preciado C, Fernández L, Mori MÁ, García-Pérez L, Lapunzina PD, Pérez-Jurado LA. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Human Genetics* 2012; **131**: 513-523.
- Bartholdi D. Prenatal genetic diagnosis. [Consult. 19 de Fevereiro, 2014]. Disponível em WWW: <URL: http://www.neonet.ch/assets/pdf/2013_-_Prenatal_genetic_diagnosis.pdf>.
- Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2013; **42**: 15-33.
- Bi W, Breman AM, Venable SF, Eng PA, Sahoo T, Lu X, Patel A, Beaudet AL, Cheung SW, White LD. Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array CGH. *Prenatal Diagnosis* 2008; **28**: 943-949.

- Bianchi DW, Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential - a review. *Placenta* 2004; **25**: 93-101.
- Bianchi W, LeShane E, Cowan J. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clinical Chemistry* 2001; **47**: 1867-1869.
- Binns V. Prenatal Diagnosis. *Encyclopedia of life sciences* 2002; 1-17.
- Bishop R. Review Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons* 2010; **3**: 85-95.
- Breman A, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, Shaw C, Lupski JR, Beaudet A, Patel A, Cheung SW, Van den Veyver I. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature, *Prenatal Diagnosis* 2012; **32**: 351-361.
- Bui T, Vetro A, Zuffardi O, Shaffer LG. Current controversies in prenatal diagnosis 3 :is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era ? *Prenatal Diagnosis* 2011; **31**: 235-243.
- Callaway JLA, Huang S., Karampetsou E, Crolla, JA. Perspective on the technical challenges involved in the Implementation of Array-CGH in Prenatal Diagnostic Testing. *Molecular Biotechnology* 2013; **56**: 312-318.
- Clark W, Christopher K. - *An Introduction to DNA: Spectrophotometry, Degradation, and the 'Frankengel' Experiment*: S. J. Karcher Editor, 2001
- Collins FS, McKusick VA. Implications of the Human Genome Project for Medical Science. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2001; **285**: 540-544.
- Connor JM, Ferguson-Smith MA. - *Essential medical genetics*, 5^a ed. Oxford: Blackwell Science, 1997.
- Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, McBride E, Connor, JM. Combined ultrasound and biochemical screening for Down's Syndrome in the first trimester : a Scottish multicentre study. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2002; **109**: 667-676.
- De Jong A, Dondorp WJ, de Die-Smulders CEM, Fritz SGM, de Wert GMWR.(2010) Noninvasive prenatal testing: ethical issues explored. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*; **42**: 15-33.

- De Jong A, Dondorp WJ, Macville MVE, de Die-Smulders CEM, van Lith JMM, de Wert GMWR. Microarrays as a diagnostic tool in prenatal screening strategies: ethical reflection. *Human Genetics* 2013; **133**: 163-172.
- Dellaglio C. Prenatal diagnosis of Down's syndrome. [Consult. 3 de Fevereiro, 2014]. Disponível em WWW: <URL: <http://flipper.diff.org/app/items/info/4460>>.
- Diário da República, 1ª série - N.º 20 - 29 de Janeiro de 2014
- Diário da República, 1ª série - N.º 75 - 17 de Abril de 2007
- Diego-Alvarez D, Alba MR, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, Lorda-Sanchez I. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenatal Diagnosis* 2007; **27**: 765-771.
- Edlow AG, Bianchi DW. Tracking fetal development through molecular analysis of maternal biofluids. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; **1822**: 1970-1980.
- Evangelidou P, Alexandrou A, Moutafi M, Ioannides M, Antoniou P, Koumbaris G, Kallikas I, Velissariou V, Sismani C, Patsalis PC. Implementation of High Resolution Whole Genome ArrayCGH in the Prenatal Clinical Setting: Advantages, Challenges, and Review of the Literature. *BioMed Research International* 2013; **2013**: 1-14.
- Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, Christodoulou C, Koumbaris G, Kallikas I, Georgiou I, Velissariou V, Patsalis PC. Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Molecular Cytogenetics* 2010; **3**: 24.
- Fairbrother G, Johnson S, Musci TJ, Song K. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. *Prenatal Diagnosis* 2013; **33**: 580-583.
- Fetal Medicine. [Consult. 3 de Maio, 2014]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.fetalmed.net/item/o-que-e-translucencia-nucal.html>>.
- 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* 2011; **31**: 1270-1282.

- Gardner RJM, Grant RS. - *Chromossome Abnormalities and Genetic Counseling*, 3ª ed Oxford: Oxford Monographs on Medical Genetics, 2004.
- Genome Research Institute. An Overview of the Human Genome Project. [Consult. 3 de Maio, 2014]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.genome.gov/12011238>>.
- Hardin J, Finnell RH, Wong D, Hogan ME, Horovitz J, Shu J, Shaw GM. Whole genome microarray analysis, from neonatal blood cards. *BioMed Central Genetics* 2009; **10**: 38.
- Hillman SC, McMullan DJ, Williams D, Maher ER, Kilby MD. Microarray comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: a review. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2012; **40**: 385-391.
- Horger EO, Finch H, Vincent VA. A single physician's experience with four thousand six hundred genetic amniocenteses. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2001; **185**: 279-288.
- Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I, Wright D, Nicolaides KH. Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2009; **33**: 259-264.
- Langlois S, Duncan A. Use of a DNA Method, QF-PCR, in the Prenatal Diagnosis of Fetal Aneuploidies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 2001; **33**: 955-960.
- Lupski JR, Belmont JW, Boerwinkle E, Gibbs RA. Clan Genomics and the Complex Architecture of Human Disease. *Cell* 2011; **147**: 32-43
- Machado IN, Heinrich-Muçouçah JKR, Barini R. Prenatal genetic testing: where we are at, where we are heading to. *Femina* 2012; **46**: 87-96.
- Maluf SW e Riegel M, *Citogenética Humana*, 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- Manolakos E, Kefalas K, Vetro A, Oikonomidou E, Daskalakis G, Psara N, Siomou E, Papageorgiou E, Sevastopoulou E, Konstantinidou A, Vrachnis N, Thomaidis L, Zuffardi O, Papoulidis I. Prenatal diagnosis of two de novo 4q35-qter deletions characterized by array-CGH. *Molecular Cytogenetics* 2013; **6**: 47.
- Maya I, Davidov B, Gershovitz L, Zalstein Y, Taub E, Coppinger J, Shaffer LG, Shohat M. Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. *Prenatal Diagnosis* 2010; **30**: 1131-1137.

- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American Journal of Human Genetics* 2010; **86**: 749-764.
- Mosca-Boidron A.L, Faivre, L, Aho, S, Marle, N, Truntzer, C, Rousseau, T, Ragon C, Payet M, Thauvin-Robinet C, Thevenon J, Chehadeh SE, Huet F, Sagot P, Mugneret F, Callier P. An improved method to extract DNA from 1 ml of uncultured amniotic fluid from patients at less than 16 weeks' gestation. *PloS One* 2013; **8**: e59956.
- National Human Genome Research Institute. All About The Human Genome Project. [Consult. 3 de Maio, 2014]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.genome.gov/10001772>>.
- Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui T. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Human Reproduction Update* 2004; **10**: 541-548.
- Novelli A, Grati FR, Ballarati L, Bernardini L, Bizzoco D, Camurri L, Casalone R, Cardarelli L, Cavalli P, Ciccone R, Clementi M, Dalprà L, Gentile M, Gelli G, Grammatico P, Malacarne M, Nardone AM, 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 in Obstetrics & Gynecology* 2012; **39**: 384-388.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. - *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 6ª ed. Filadélfia: Saunders, 2004.
- Park JH, Woo JH, Shim SH, Yang S, Choi YM, Yang K, Cha DH. Application of a target array comparative genomic hybridization to prenatal diagnosis. *BioMedical Central Medical Genetics* 2010; **11**: 102.
- Park S, Jung EH, Ryu R, Kang HW, Ko J, Kim HJ, Cheon CK, Hwang A, Kang, H. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Molecular Cytogenetics* 2011; **4**: 12.
- Pennings JLA, Koster MPH, Rodenburg W, Schielen PCJI, de Vries A. Discovery of novel serum biomarkers for prenatal Down syndrome screening by integrative data mining. *PloS One* 2009; **4**: e8010.

- Roberts L, Davenport RJ, Pennisi E, Marshall E. A History of the Human Genome Project. *Science* 2001; **291**: 1195.
- Rooney DE. - *Human Cytogenetics: constitutional analysis*, 3^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- 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* 2013, **56**, 341–345.
- Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genetics in Medicine*. 2009; **11**: 139-146.
- Savage MS, Mirella J, Mourad MJ, Wapner RJ. Evolving applications of microarray analysis in prenatal diagnosis. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 2011; **23**: 103-108.
- Savola S, Nardi F, Scotlandi K, Picci P, Knuutila S. Microdeletions in 9p21.3 induce false negative results in CDKN2A FISH analysis of Ewing sarcoma. *Cytogenetic and Genome Research* 2007; **119**: 21–26.
- 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 in Obstetrics & Gynecology* 2013; **41**: 500-507.
- Shaffer LG, Bui T. Molecular Cytogenetic and Rapid Aneuploidy Detection Methods in Prenatal Diagnosis. *American Journal of Medical Genetics* 2007; **98**: 87-98.
- Sociedade Portuguesa de Obstetrícia e Ginecologia. Rastreio Pré-Natal. [Consult. 17 de Maio, 2014]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.genome.gov/12> <http://www.labmed.pt/NotasTecnicas10.asp011238>>.
- Steele MW, Breg WR. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *The Lancet* 1966; **1**: 383–385
- Swanson A, Sehnert AJ, Bhatt S. Non-invasive Prenatal Testing: Technologies, Clinical Assays and Implementation Strategies for Women’s Healthcare Practitioners. *Current Genetic Medicine Reports* 2013; **1**: 113-121.
- Summers AM, Langlois S, Wyatt P, Wilson RD. Prenatal screening for fetal aneuploidy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 2007; **29**: 146-179.

- Tachdjian, G. Comparative Genomic Hybridization. *John Wiley & Sons Ltd*, L: Chichester 2009.
- Tongsong T, Wanapirak C, Kunavikantikul C, Sirirchotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. Cordocentesis at 16–24 weeks of gestation: experience of 1320 cases. *Prenatal Diagnosis* 2000; **20**: 224-228.
- Valayatham V, Subramaniam R, Juan YM, e Chia P. Indications for invasive prenatal diagnostic procedures at a dedicated fetal medicine centre: an 8 year audit 2003-2010. *The Medical Journal of Malaysia* 2013; **68**: 297–300.
- Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SL, Simovich MJ, Ward PA, Darilek S, Johnson A, Neill SE, Bi W, White LD, Eng CM, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenatal Diagnosis* 2009; **29**: 29–39.
- Vermeesch J, 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, Devriendt K. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005; **53**: 413-422.
- Vestergaard EM, Christensen R, Petersen OB, Vogel I. Prenatal diagnosis: array comparative genomic hybridization in fetuses with abnormal sonographic findings. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 2013; **92**: 762-768.
- Viaux-Savelon S, Dommergues M, Rosenblum O, Bodeau N, Aidane E, Philippon O, Mazet P, Vibert-Guigue C, Vauthier-Brouzes D, Feldman R, Cohen D. Prenatal Ultrasound Screening: False Positive Soft Markers May Alter Maternal Representations and Mother-Infant Interaction. *PloS One* 2012; **7**: e30935.
- Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *The New England Journal of Medicine* 2012; **367**: 2175-2184.
- Wapner R, Thom E, Simpson JL, Pergament E, Silver R, Filkins K, Platt L, Mahoney M, Johnson A, Hogge WA, Wilson RD, Mohide P, Hershey D, Krantz D, Zachary J, Snijders R, Greene N, Sabbagha R, MacGregor S, Hill L, Gagnon A, Hallahan T, Jackson L. First-Trimester Screening for Trisomies 21 and 18. *The New England Journal of Medicine* 2003; **349**: 1405-1413.

- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *American Journal of Human Genetics* 1991; **49**: 995-1013.
- Wieacker P, Steinhard J. The prenatal diagnosis of genetic diseases. *Deutsches Ärzteblatt International* 2010; **107**: 857-862.
- Willis AS, Van den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 2012; **32**: 315-320.
- Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene* 2013; **525**: 162-169.
- Wiszniewska J, Bi W, Shaw C, Stankiewicz P, Kang SL, Pursley AN, Lalani S, Hixson P, Gambin T, Tsai C, Bock H, Descartes M, Probst FJ, Scaglia F, Beaudet AL, Lupski JR, Eng C, Cheung SW, Bacino C, Patel A. Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. *European Journal of Human Genetics* 2014; **22**: 79-87.
- Zuffardi O, Vetro A, Brady P, Vermeesch J. Array technology in prenatal diagnosis. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2011; **16**: 94-98.