



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Liliana Sofia Oliveira Silva

2013

Laboratório de Citogenética e Genómica
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Orientador

Professora Doutora Isabel Marques Carreira

Laboratório de Análises Clínicas
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas. O trabalho foi desenvolvido sob orientação científica da Professora Doutora Isabel Carreira (diretora do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra)

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração e auxílio de várias pessoas às quais gostaria de transmitir algumas palavras de agradecimento:

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira gostaria de agradecer pela orientação científica, esclarecimentos e análise crítica deste trabalho, assim como pela disponibilização de materiais e equipamentos necessários para o estudo dos casos clínicos apresentados.

A toda a equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica, agradeço pelo acolhimento, disponibilidade e simpatia demonstrada ao longo da minha passagem por este local. E em particular ao Dr. Luís Miguel Pires, Dra. Susana Ferreira e Dr. José Ferrão gostaria de agradecer a orientação científica, apoio e prestabilidade.

À Dra. Ana Donato e à Professora Doutora Ana Miguel Matos por permitirem a minha passagem no Laboratório de Análises Clínicas assim como por toda a orientação, ajuda e disponibilidade.

À Professora Doutora Leonor Almeida pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo apoio e preocupação ao longo deste ano letivo.

Aos meus colegas de estágio, por todo o apoio, espírito de interajuda, amizade e convívio.

Aos meus pais, familiares e amigos por todo o apoio, carinho e amizade ao longo de todos estes anos.

A todos, mais uma vez, muito obrigada.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Índice Geral	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Abstract	xi
I - Introdução	I
A. Objetivo do estágio	I
B. Caracterização dos Laboratórios de Estágio	I
II - Atividades desenvolvidas/ Experiência laboratorial	3
A. Genética	3
B. Hematologia	3
C. Imunologia/ Endocrinologia.....	4
D. Bioquímica.....	4
E. Microbiologia.....	6
III - Do genótipo ao fenótipo: contributo das tecnologias de genética para o diagnóstico	7
A. Introdução e Objetivos.....	7
A.1. Tecnologias num laboratório de diagnóstico, citogenética e genómica	9
1. Citogenética convencional.....	9
2. <i>Fluorescent in situ hybridization</i> (FISH).....	11
3. Análise de fragmentos	13
3.1. Tripletos CGG.....	13
3.1.1. Síndrome de X-Frágil	13
3.1.2. <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	14
3.2. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA)	17
4. <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i> (aCGH)	20
B. Análise e Interpretação de Casos Clínicos	23
1. Caso Clínico I	23
2. Caso Clínico 2.....	27
3. Caso Clínico 3.....	33

4. Caso Clínico 4.....	37
5. Caso Clínico 5.....	41
C. Discussão geral e Conclusões.....	47
IV - Hematologia e Hemostase.....	53
A. Generalidades	53
B. Testes Laboratoriais utilizados em Hematologia	56
1. Hemograma.....	56
2. Esfregaço sanguíneo.....	57
3. Velocidade de Sedimentação	58
4. Provas de Coagulação	59
4.1. Tempo de Protrombina.....	59
4.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	59
V - Conclusão	61
VI - Referências	63

Índice de Figuras

Figura 1: Cariograma normal de um individuo do sexo masculino (46,XY).....	9
Figura 2: Representação esquemática da técnica de FISH.....	11
Figura 3: Representação esquemática das formas alélicas normal, pré-mutada e com mutação completa do gene <i>FMR1</i> de acordo com o número de repetições CGG e nível de tradução proteica.....	14
Figura 4: Representação esquemática da síntese de novas cadeias de DNA através da técnica de PCR.....	15
Figura 5: Amplificação e detecção do gene <i>FMR1</i> usando TP-PCR.....	17
Figura 6: Representação esquemática da técnica de MLPA.....	18
Figura 7: Vários formatos para <i>array</i>	20
Figura 8: Esquema representativo do processo do aCGH.....	21
Figura 9: Observação ao microscópio de fluorescência de células em metáfase com uso da técnica de FISH (<i>SHANK3</i>).....	24
Figura 10: Cariograma de um individuo do sexo masculino com cromossoma 22 em anel 46,XY,r(22).....	24
Figura 11: Observação ao microscópio de fluorescência de células em metáfase com uso da técnica de FISH. (A –Mãe; B - Pai).....	25
Figura 12: Electroforegrama obtido após PCR convencional revelando um alelo normal (30 CGG).....	27
Figura 13: Electroforegrama obtido após TP-PCR revelando um alelo normal (30 CGG) uma mutação completa (287 CGG).	28
Figura 14: Electroforegrama obtido após PCR convencional revelando um alelo normal (30 CGG) e um alelo pré-mutado (75 CGG).....	28
Figura 15: Electroforegrama obtido após TP-PCR revelando um alelo normal (30 CGG) e um alelo pré-mutado (79 CGG).....	29
Figura 16: Heredograma familiar do caso em estudo para a Síndrome de X-Frágil.	29
Figura 17: Electroforegrama obtido após PCR convencional revelando a presença de um alelo normal (21 CGG).....	30
Figura 18: Electroforegrama obtido após PCR convencional revelando a presença de um alelo normal (30 CGG).....	30
Figura 19: Ideograma do cromossoma 4 representado a região em deleção.....	34

Figura 20: Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metáfase com uso da técnica de FISH (<i>WHSC1</i>)	35
Figura 21: Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metáfase com uso da técnica de FISH (<i>locus D4S3359</i>)	35
Figura 22: Cariograma de um indivíduo do sexo masculino mostrando um cromossoma 15 com duplicação da região proximal.....	37
Figura 23: Ideograma do cromossoma 15 representando a região em duplicação	39
Figura 24: Observação ao microscópio de fluorescência de células em metáfase com uso da técnica de FISH (<i>UBE3A</i>)	39
Figura 25: Cariograma de um indivíduo do sexo feminino mostrando uma deleção no braço longo do cromossoma 2	41
Figura 26: Perfil do cromossoma 2 obtido por aCGH	42
Figura 27: Perfil do cromossoma 20 obtido por aCGH	42
Figura 28: Esquema representativo da cascata da coagulação	56
Figura 29: Representação de um esfregaço sanguíneo.....	58

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resultados obtidos utilizando o painel de sondas P-036 após análise por <i>software</i> adequado.....	33
Tabela 2: Resultados obtidos utilizando o painel de sondas P-343 após análise por <i>software</i> adequado	38
Tabela 3: Genes patogénicos (OMIM) com o respetivo fenótipo nos cromossomas 2 e 20, que se encontram em deleção no caso clínico apresentado.	43
Tabela 4: Resultados obtidos utilizando o painel de sondas P-297 após análise por <i>software</i> adequado.....	44
Tabela 5: Comparação entre as vantagens/desvantagens das técnicas utilizadas	47

Lista de Abreviaturas

A – adenina

aCGH – *array comparative genomic hybridization*

AGG – adenina – guanina – guanina

ALT – alanina aminotransferase

aPTT – activated partial thromboplastin time

AST – aspartato aminotransferase

ATP – *adenosine triphosphate*

BAC – *bacterial artificial chromosomes*

C – citosina

CBG – banda C (hidróxido de bário e Giemsa)

CGG – citosina - guanina – guanina

CHGM – concentração de hemoglobina globular média

CNV – *copy number variation*

COL3A1 – *collagen type III alfa 1*

COL5A2 – *collagen type V alfa 2*

Cy3 – cianina 3

Cy5 – cianina 5

dATP – *deoxynucleotide adenosine triphosphate*

dCTP – *deoxynucleotide cytidine triphosphate*

dGTP – *deoxynucleotide guanine triphosphate*

DGV – *database of genomic variants*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

DPN – Diagnóstico pré-natal

dTTP – *deoxynucleotide thymidine triphosphate*

EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FISH – *fluorescent in situ hybridization*

FITC – fluoresceína-5-tiocianato

FMRI – *fragile X mental retardation-I*

FMRP – *fragile X mental retardation protein*

FSH – *follicle-stimulating hormone*

INR – *International Normalized Ratio*

ISI – *International Sensivity Index*

G – guanina

GDF8 – *grow/differentiation factor 8*

GGT – gama glutamil transpeptidase

GTG – banda G (tripsina e Giemsa)

hCG – *human chorionic gonadotropin*

HDL – *high density lipoprotein*

HGM – hemoglobina globular média

HIBCH - *3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase*.

HIV – *human immunodeficiency virus*

JAG1 – *jagged 1*

kb – kilobase

LAC – Laboratório de Análises Clínicas

LCG – Laboratório de Citogenética e Genómica

LCR – <i>low copy repeat</i>	T – timina
LH – <i>luteinizing hormone</i>	T3 – triiodotironina
Mb – mega base	T4 – tiroxina
M-FISH – <i>multicolour fluorescent in situ hybridization</i>	Tm – <i>melting temperature</i>
MKKS – <i>McKusick-Kaufman syndrome</i>	TP-PCR – <i>triplet repeat primed polimerase chain reaction</i>
MLPA – <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>	TRITC – tetrametil rodamina isotiocianato
MTX – metotrexato	TSH – <i>thyroid-stimulating hormone</i>
NADH – <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>	UBE3A – <i>ubiquitin protein ligase E3A</i>
NADPH – <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	UTR – <i>untranslated region</i>
NOR – <i>nucleolus organizer regions</i>	VCS – volume, condutividade e laser
OMIM – <i>online mendelian inheritance in man</i>	VDRL – <i>venereal disease research laboratory</i>
PCR – <i>polimerase chain reaction</i>	VGM – volume globular médio
PLCBI – <i>phospholipase C beta 1</i>	VOUS – <i>variants of uncertain significance</i>
PLCB4 – <i>phospholipase C beta 4</i>	VS – velocidade de sedimentação
PSA – <i>prostate-specific antigen</i>	WCP – <i>whole chromosome painting</i>
PT – <i>prothrombine time</i>	WHSCI – <i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1</i>
RDW – <i>red cell distribution width</i>	
SHANK3 – <i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3</i>	
SKY – <i>spectral karyotyping</i>	
SNP – <i>single nucleotide polymorphism</i>	
SLC40A1 – <i>solute carrier family 40 (iron-regulated transporter) member 1</i>	
STAT1 – <i>signal transducer and activator of transcription 1</i>	
STAT4 – <i>signal transducer and activator of transcription 4</i>	

Resumo

A citogenética emerge como uma área essencial para o estudo de anomalias cromossômicas em diagnóstico pré-natal, pós-natal e cancro. Dado o desenvolvimento tecnológico dos últimos anos, surgiram novas técnicas para o estudo do genoma, tornando mais abrangentes e sensíveis os estudos efetuados nos laboratórios de citogenética. Deste modo, além de um diagnóstico mais preciso, existe também a possibilidade de detetar novas alterações cromossômicas e estabelecer novas relações genótipo-fenótipo.

Estas relações são cruciais, tanto no campo da investigação científica, permitindo a descoberta de novas síndromes, como para o doente e para os seus familiares de modo a estabelecer riscos de recorrência e determinar as suas opções reprodutivas.

O principal objetivo deste trabalho é analisar alguns casos clínicos, através de diferentes tecnologias, de forma a estabelecer a relação genótipo-fenótipo e compreender as dificuldades inerentes a esse processo.

Palavras-chave: citogenética convencional, FISH, PCR, MLPA, aCGH, relação genótipo-fenótipo.

Abstract

Cytogenetic emerges as essential for the study of chromosomal abnormalities in prenatal diagnosis, postnatal diagnosis and cancer. The technological development achieved in the last years, leads to a development of more embracing and sensitive technologies for the study of the genome. In addition to a more accurate diagnosis, there is also the possibility of detect new chromosomal abnormalities.

The establishment of genotype-phenotype correlation is crucial in the field of scientific research, enabling the discovery of new syndromes, and for the patient and his family allowing the establishment of recurrence risks and make reproductive options.

The main goal of this work is analyze some clinical cases through different technologies, in order to establish a genotype-phenotype correlation and understand the difficulties inherent in this process.

Key-words: cytogenetic, FISH, MLPA, aCGH, genotype-phenotype correlation

I – Introdução

A. Objetivo do Estágio

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, dado o seu carácter profissionalizante, visa a introdução do aluno na realidade de trabalho/investigação na área das Análises Clínicas, sendo uma importante ferramenta para a consolidação de conhecimentos e percepção das adversidades inerentes ao contexto atual.

Sendo uma área muito vasta, com abrangência em diversas áreas como Hematologia, Imunologia, Bioquímica, Microbiologia, Endocrinologia e Genética, é necessária uma boa base teórica, tanto da fisiologia humana como das diversas metodologias/ tecnologias disponíveis para análise, sem descurar o controlo de qualidade e apostando no melhor procedimento possível desde a receção da amostra até à saída do resultado.

Cada vez mais se torna fundamental o controlo clínico dos indivíduos, quer no contexto de doença, quer na prevenção da mesma, sendo que as Análises Clínicas são uma mais-valia para o clínico no diagnóstico e esclarecimento de situações relacionadas com o estado de saúde do doente.

B. Caracterização dos Laboratórios de Estágio

As entidades que permitiram a realização do estágio curricular foram o Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG) efetua diagnóstico genético pré-natal e pós-natal desde 1992, sendo o Laboratório Público com mais casos estudados e desde a sua origem, é dirigido pela Professora Doutora Isabel Marques Carreira e tem oito técnicos especialistas em Genética Médica laboratorial.

Os testes genéticos disponibilizados incluem a Citogenética Convencional, Citogenética Molecular, Biologia Molecular e Citogenómica e ajudam a esclarecer diferentes situações clínicas em diagnóstico pré-natal, diagnóstico pós-natal, infertilidade, atraso de desenvolvimento psicomotor, autismo, estudos familiares, entre outros.

As amostras recebidas para realização dos diferentes testes são essencialmente líquido amniótico, vilosidades coriônicas, e sangue (sangue periférico e sangue fetal). O Laboratório está dividido em diferentes secções de trabalho (salas de cultura de células, laboratório de manipulação e laboratório de microscopia) e está provido diversos equipamentos como câmaras de fluxo laminar, estufas, câmara de espalhamento, microscópios acoplados a sistemas de captura de imagem (*Cytovisions*), termocicladores, sequenciador e *scanner* para *array*.

O LCG integra um sistema de gestão de qualidade (UKNEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*) que combina o controlo de qualidade interno diário com o controlo de qualidade externo. Devido ao facto de se encontrar inserido numa Universidade, o LCG encontra-se também envolvido em diversos projetos de investigação em diferentes áreas desde a patologia do desenvolvimento ao cancro.

O Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (LAC) presta serviços à comunidade desde 1983 através da disponibilização de uma série de ensaios. As valências disponíveis no LAC são a Hematologia, a Bioquímica, a Imunologia/ Endocrinologia e Microbiologia. As responsáveis pelo laboratório são a Dra. Ana Donato e a Professora Doutora Ana Matos Silva.

As amostras recebidas neste laboratório são essencialmente sangue, urina, fezes e exsudados (nasofaríngeos, vaginais, uretrais). O LAC dispõe de vários equipamentos como um autoanalisador de bioquímica, um contador de células sanguíneas, microscópio, um sistema de imunoensaio automatizado, entre outros.

No LAC são seguidas regras de boa conduta de modo a atingir elevados níveis de qualidade e assim garantir não só satisfação dos seus clientes como também a credibilidade junto de outros laboratórios de ensaio. Assim, além dos controlos de qualidade internos, foi implementada a Avaliação Externa da Qualidade através da participação em ensaios interlaboratoriais. Os controlos internos são feitos diariamente, e os resultados são analisados estatisticamente. Por se encontrar inserido na Faculdade de Farmácia, o LAC auxilia nas aulas práticas e laboratoriais de algumas unidades curriculares, bem como nos estágios curriculares e extracurriculares.

II - Atividades desenvolvidas/ Experiência laboratorial

Seguidamente serão apresentadas de forma resumida as áreas de trabalho abordadas durante o estágio curricular no LCG e no LAC.

As áreas escolhidas para aprofundamento no relatório de estágio serão a Genética e a Hematologia, sendo que será dado maior enfoque à Genética abordando as tecnologias utilizadas nesta área de diagnóstico e analisando e interpretando resultados referentes a alguns casos clínicos.

A. Genética

Nesta área, desenvolvida através do estágio no Laboratório de Citogenética e Genómica, foi possível a observação do estabelecimento de culturas celulares de linfócitos obtidos a partir do sangue periférico no diagnóstico pós-natal, líquido amniótico e vilosidades coriônicas no diagnóstico pré-natal (DPN). Observação dos procedimentos de manipulação das culturas celulares, espalhamento de metafases e bandagem (GTG, CBG e NOR). Foi possível também o estudo do cariótipo ao microscópio, e percepção das suas dificuldades. Foram observados os procedimentos de MLPA em DPN para estudos das aneuploidias mais comuns (13, 18, 21, X e Y) e despiste de contaminação materna. Foi possível contactar com várias técnicas de biologia molecular (MLPA e aCGH) para estudos de diagnóstico pós-natal que permitem a deteção de duplicações e deleções e ainda a FISH que além destas alterações permite detetar rearranjos equilibrados. Foi possível a aplicação de PCR para pesquisa de Síndrome de X-Frágil, e foi também observado o procedimento de PCR e electroforese para pesquisa de microdeleções do cromossoma Y em estudos de infertilidade masculina.

B. Hematologia

Nesta secção foi possível efetuar diversas técnicas nomeadamente hemograma, esfregaço sanguíneo, provas de coagulação, velocidade de sedimentação e determinação do grupo sanguíneo.

O hemograma consiste na contagem das diversas células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) através do método de impedância. É também possível determinar a concentração de hemoglobina e o hematócrito. Sempre que necessário, (quando há valores

alterados ou não foi feita a forma leucocitária) é feito um esfregaço sanguíneo que é corado segundo a técnica de May-Grünwald-Giemsa para observação das células ao microscópio.

A velocidade de sedimentação é um teste bastante utilizado na rotina, mas é pouco específico, estando aumentada durante processos inflamatórios.

A determinação do grupo sanguíneo ABO é baseada na reação antígeno-anticorpo, e são utilizados anticorpos anti-A, anti-B e anti-AB. Consoante ocorra aglutinação dos eritrócitos ou não, pode-se depreender qual o grupo sanguíneo em questão. As provas de coagulação realizadas são o tempo de protrombina para a via extrínseca e final da coagulação e o tempo de tromboplastina parcial ativada para avaliar a via intrínseca e final da coagulação.

C. Imunologia/ Endocrinologia

Nesta área foi possível pesquisar diversos tipos de anticorpos ou antígenos utilizados no diagnóstico e monitorização de algumas doenças infecciosas como por exemplo a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), da hepatite B, C, entre outros. Pode ser feito também o doseamento de hormonas tiroideias (frações livres da T3 e T4, TSH), hormonas da reprodução (progesterona, estradiol, testosterona, LH e FSH) e marcadores tumorais como por exemplo o PSA. Ambos os testes se baseiam em técnicas imunoenzimáticas nomeadamente no método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com uma leitura final de fluorescência.

Foi possível também observar testes de aglutinação, nomeadamente o Teste VDRL (*venereal disease research laboratory*), que permite o diagnóstico da Sífilis através da pesquisa de anticorpos no soro. A prova de Coombs indireta também se baseia na reação antígeno-anticorpo, e permite detetar no soro anticorpos contra antígenos presentes na membrana dos eritrócitos e é utilizado na avaliação da incompatibilidade feto-maternal em grávidas Rh⁻ (grupo sanguíneo *Rhesus*).

D. Bioquímica

Nesta secção foi possível analisar diversos parâmetros bioquímicos utilizados para monitorizar o funcionamento de diversos sistemas e órgãos, nomeadamente o metabolismo glucídico e lipídico, a função hepática, a função renal, desequilíbrios ácido-base, doenças do tecido conjuntivo, a diabetes, entre outras.

Para dosar os diferentes parâmetros bioquímicos é usado um autoanalisador que utiliza quatro técnicas diferentes: técnicas colorimétricas diretas, técnicas de cinética enzimática com leitura final colorimétrica ou no UV, técnicas cinéticas de ponto final e técnicas turbidimétricas.

Nas técnicas colorimétricas diretas adiciona-se um reagente à amostra com vista a obter um produto corado, cuja intensidade avaliada por espectrofotometria é diretamente proporcional à concentração do analito presente na amostra. Com este método podem dosar-se por exemplo o cálcio, magnésio e proteínas séricas.

Na técnica de cinética enzimática é obtido um produto corado resultante da adição de uma enzima à amostra, sendo que o analito é o substrato da enzima. O produto obtido é lido por espectrofotometria UV-VIS e é diretamente proporcional à quantidade de analito. Com este método podem dosar-se por exemplo a glicose, colesterol total e colesterol HDL.

As técnicas cinéticas de ponto final são utilizadas quando o analito é uma enzima. É avaliada a atividade da enzima por meio da adição de um substrato da mesma, obtendo-se um produto corado que pode ser medido através de espectrofotometria, sendo feitas leituras sucessivas em intervalos de tempo definidos. Com esta técnica podem dosar-se por exemplo a AST, ALT, GGT, amilase e fosfatase alcalina.

Por último, as técnicas turbidimétricas baseiam-se na reação antígeno-anticorpo. A formação de complexos antígeno-anticorpo origina turvação e a luz ao incidir nas partículas é dispersa. A absorvância é diretamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra exceto para a determinação da fração A₁C da hemoglobina glicada. Com esta técnica podem dosar-se ainda a proteína C reativa e a albumina de baixa concentração.

O ionograma (sódio, potássio, cloreto) é útil para avaliar o equilíbrio ácido-base do paciente. Baseia-se na deteção dos iões através da diferença de potencial desenvolvida em cada eletrodo seletivo em comparação com um eletrodo de referência (prata), uma vez que a diferença de potencial gerada é proporcional à quantidade de cada ião presente na amostra.

O proteinograma consiste na separação das proteínas séricas através de eletroforese e permite detetar alterações nas cinco bandas obtidas, (albumina, α_1 , α_2 , β e γ) auxiliando no diagnóstico clínico de algumas patologias.

Para pesquisar elementos anormais na urina é feita uma análise sumária ou urina tipo II. A urina tipo II consiste na análise da urina com uma tira reativa com vista a perceber se há presença de sangue, proteínas, glucose, nitritos, urobilinogénio, bilirrubina, corpos cetónicos, o pH e a densidade. É feita também uma observação do sedimento urinário, para observar a

presença de leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cilindros, cristais, bactérias e outros elementos anormais.

Foi ainda possível a realização de testes imunocromatográficos, nomeadamente a pesquisa de sangue oculto nas fezes, através do uso de um anticorpo anti-hemoglobina humana; ou o teste de gravidez, em que é detetada a presença de gonadotrofina coriónica humana (hCG) na urina da mulher.

E. Microbiologia

A microbiologia é a área das análises clínicas que se encontra menos desenvolvida nos laboratórios de pequena dimensão. As análises realizadas são essencialmente uroculturas, identificação bacteriana e antibiograma. A urocultura consiste na análise sumária da urina (urina tipo II), e na sementeira de urina num meio de cultura adequado, permitindo assim a análise quantitativa e qualitativa das bactérias eventualmente presentes na urina.

Após crescimento bacteriano significativo ($>10^5$ bactérias/mL) com resultado válido, e identificação bacteriana pode deduzir-se qual o agente responsável pela infeção urinária. Deste modo, consoante a coloração das colónias pode-se inferir acerca da espécie bacteriana presente uma vez que o meio de cultura utilizado é cromogénio modificando o aspeto das colónias consoante a espécie. Contudo, em alguns casos o resultado é dúbio e procede-se à identificação bacteriana efetuando uma coloração de Gram e utilizando sistemas *Api*. Efetua-se também o antibiograma adequado com vista a perceber a sensibilidade aos diferentes antibióticos, sendo que o resultado é dado tendo em conta o uso em ambulatório e a preferência pelos antibióticos de espectro mais restrito.

Outro tipo de análises pedidas são a análise bacteriológica de exsudados nasofaríngeos e exame bacteriológico, parasitológico e micológico de exsudados vaginais. É também possível fazer exame bacteriológico, parasitológico e micológico de fezes.

III - Do genótipo ao fenótipo: contributo das tecnologias de genética para o diagnóstico

A. Introdução e Objetivos

A análise cromossômica é um dos estudos genéticos mais utilizados em diagnóstico sendo oferecida numa grande variedade de situações como em diagnóstico pré-natal, pediatria e oncologia. Em 1959, Lejeune *et al.* [1] reportou a primeira anomalia cromossômica, a trissomia do cromossoma 21 associada à síndrome de Down. Desde aí, as alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais têm sido apontadas como causa de défice cognitivo, malformações congénitas e infertilidade.

Cerca de 1% dos recém-nascidos têm uma cromossomopatia, e a prevalência de anomalias cromossômicas com fenótipo associado é cerca de 43,6/10000 nascimentos [2]. Algumas síndromes são facilmente reconhecidas pelo fenótipo manifestado e características faciais como a síndrome de Down, contudo outras anomalias são dificilmente diagnosticadas. Assim, dada a prevalência das anomalias cromossômicas, e as suas dificuldades de reconhecimento, torna-se necessário o estudo dos cromossomas e das suas alterações, com vista a estabelecer um diagnóstico consistente e possibilitar aos indivíduos afetados e às suas famílias cuidados de saúde específicos e aconselhamento genético.

Foram estabelecidas várias indicações para o estudo pós-natal e elaboração do cariótipo constitucional [3], nomeadamente em:

- i) História familiar significativa de rearranjo cromossômico ou atraso mental de possível origem cromossômica em que não é possível estudar o indivíduo afetado.
- ii) Paciente com: fenótipo clínico anormal ou dismorfismos; anomalias congénitas múltiplas; atraso mental ou atraso de desenvolvimento psicomotor; suspeita de síndrome de deleção/microdeleção/duplicação; amenorreia primária ou secundária ou menopausa precoce; azoospermia ou oligospermia severa; alteração clinicamente significativa do crescimento: baixa estatura, crescimento excessivo, microcefalia, macrocefalia; ambiguidade sexual; doença recessiva ligada ao cromossoma X numa paciente do sexo feminino; quadro clínico de síndrome de instabilidade cromossômica; feto malformado ou nado morto de etiologia desconhecida; produtos de concepção.
- iii) Casais com: deteção pré-natal de anomalia cromossômica ou variante invulgar; anomalia cromossômica desequilibrada detetada nos produtos de concepção; filho

com anomalia cromossômica ou variante invulgar; infertilidade de etiologia desconhecida; três ou mais abortos.

Existem várias tecnologias para aplicação em diagnóstico citogenético e molecular para possibilitar a detecção de anomalias cromossômicas. Nas tecnologias de biologia molecular é necessário efetuar uma extração de DNA que consiste basicamente na lise das membranas celulares, degradação de proteínas e precipitação do DNA. Uma vez que este trabalho se centra essencialmente no diagnóstico pós-natal, a amostra utilizada é o sangue periférico. A extração é feita a partir dos linfócitos do sangue periférico (colhido com EDTA) através de um *kit* comercial, segundo as instruções do fabricante. No final, é avaliada a concentração e grau de pureza do DNA por espectrofotometria, através da razão entre as absorvâncias do DNA e das proteínas.

Cabe ao técnico a opção por uma ou outra técnica tendo em conta a história clínica do paciente e as diferentes sensibilidades, especificidades e complementaridades das técnicas. Além disso, é crucial uma boa análise e interpretação dos resultados obtidos, de forma a estabelecer a relação genótipo-fenótipo.

Assim, os principais objetivos deste trabalho são:

- i) Conhecer as diferentes tecnologias utilizadas num Laboratório de Citogenética, nomeadamente, citogenética convencional, FISH, PCR, MLPA e aCGH, bem como compreender o seu fundamento teórico;
- ii) Analisar casos problema e estabelecer a relação entre o genótipo e o fenótipo através da utilização das diferentes tecnologias;
- iii) Comparar as diferentes tecnologias, compreender a sua aplicação em diferentes contextos e demonstrar a sua complementaridade para a obtenção de um diagnóstico correto.

A.1. Tecnologias num laboratório de diagnóstico, citogenética e genómica

I. CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

A análise do número de cromossomas e da sua morfologia constitui o objetivo da citogenética. O ser humano possui um número de cromossomas diploide constituído por 46 cromossomas agrupados em 23 pares, sendo que 22 desses pares são autossomas e um par de cromossomas sexuais (XX ou XY). Os cromossomas podem ser classificados segundo o tamanho, posição do centrómero (metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos) e padrão de bandas. A indicação do número de cromossomas e dos cromossomas sexuais é designado Cariograma (Figura 1) e permite também registar as alterações cromossómicas eventualmente encontradas [3].



Figura 1: Cariograma normal de um indivíduo do sexo masculino (46,XY).

O estudo dos cromossomas recorrendo à citogenética convencional exige células em divisão celular ativa, pois os cromossomas são distinguíveis individualmente ao microscópio apenas durante a mitose, e são estudados em pró-metáfase ou metáfase.

Podem ser utilizadas células de diversos tecidos como linfócitos do sangue periférico ou sangue do cordão umbilical (colhidos com heparina) ou fibroblastos de biopsias de pele, células do líquido amniótico, ou vilosidades coriônicas. Para garantir o controlo de qualidade, as amostras são processadas em duplicado, por dois técnicos, e com reagentes e equipamentos distintos. As células são colocadas em meios de cultura adequados, à temperatura de 37 °C, numa atmosfera controlada de O₂ e CO₂ em condições rigorosas de assepsia. Após 72 horas (no caso de linfócitos do sangue periférico), adiciona-se

metotrexato (MTX) que funciona como bloqueio bioquímico e para a divisão celular. Após 17 horas é removido o MTX e adiciona-se novo meio e timidina para promover o recomeço simultâneo e sincronizado da divisão celular. Posteriormente, para-se a mitose por adição de colcemida que vai impedir a polimerização da α e β -tubulina que constitui os microtúbulos do fuso acromático, permitindo que as células permaneçam em pró-metáfase (maior resolução de bandas). Seguidamente, faz-se um tratamento hipotónico para aumentar o volume celular e facilitar a dispersão dos cromossomas e adiciona-se um fixador (mistura de ácido acético e metanol) para remover a água e endurecer os cromossomas de modo a prepara-los para a bandagem. O espalhamento das lâminas é um passo crítico e exige condições específicas de temperatura e humidade, seguindo-se o envelhecimento das lâminas em estufa [4].

Antes dos anos 70, os cromossomas eram corados integralmente, obtendo-se informação limitada, as aneuploidias eram reconhecidas mas as alterações estruturais eram muito dificilmente detetadas. Desde então foram desenvolvidos diversos métodos de bandagem e coloração. Alguns métodos produzem bandas alternadas específicas ao longo de todo o cromossoma criando um padrão único para cada par de cromossomas [5]. Esta propriedade permite a sua identificação e a caracterização de anomalias estruturais, pelo que é importante uma boa resolução de bandas. Uma resolução moderada compreende 500 a 550 bandas, uma alta resolução atinge as 800 bandas. Podem utilizar-se outros métodos para corar especificamente algumas regiões, como por exemplo as regiões centroméricas através da bandagem CBG (bandas C com hidróxido de bário e Giemsa) ou dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos NOR (*nucleolus organizer regions*). Estas técnicas de bandagem auxiliam a esclarecer certas dúvidas decorrentes do uso de um método de bandagem de rotineiro, a GTG (bandas G produzidas com tripsina e Giemsa) [6].

A técnica mais utilizada na rotina é a banda GTG na qual as lâminas são tratadas com tripsina e depois coradas com Giemsa o que produz um padrão de bandas claras e escuras que permitem a identificação de cada cromossoma. As bandas escuras (heterocromatina) são regiões não codificantes enquanto que as bandas claras (eucromatina) representam as regiões ativas.

Outra técnica de coloração utilizada é a banda CBG em que o DNA é desnaturado pelo hidróxido de bário e o único material que cora com o Giemsa é a heterocromatina constitutiva na região centromérica, zonas polimórficas (cromossomas 1, 9 e 16), e a parte distal do braço longo do cromossoma Y. O resultado são cromossomas claros com áreas coradas a escuro. A banda C é importante para marcar os centrómeros, detetar a presença de cromossomas dicêntricos e estudar cromossomas marcadores.

Uma outra técnica e coloração por vezes utilizada é a banda NOR que cora seletivamente as regiões organizadoras do nucléolo localizadas nas zonas satélite dos cromossomas acrocêntricos. Estas regiões contêm genes para RNA ribossómico e podem ser coradas com nitrato de prata. A bandagem NOR é útil para a identificação de rearranjos ou polimorfismos envolvendo cromossomas acrocêntricos [4,6].

A citogenética convencional apresenta a vantagem de detetar alterações numéricas e rearranjos estruturais equilibrados e desequilibrados. No entanto, a análise citogenética convencional depende em grande medida da experiência do técnico, além disso a resolução da técnica a partir de 3-5 Mb [7] pode não permitir detetar alterações de tamanho inferior.

2. FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

A técnica de FISH é uma técnica de citogenética molecular baseada na hibridização *in situ* entre uma sonda de DNA marcada com fluorocromo e uma sequência de DNA específica no cromossoma alvo, permitindo a visualização de um sinal através de um microscópio de fluorescência. Esta técnica pode ser realizada em cromossomas em metafase ou células em interfase [8].

A sonda de DNA e o DNA em estudo são desnaturados utilizando soluções salinas ou de formalina ou elevadas temperaturas e a sonda é aplicada em excesso para garantir que ocorra hibridização com o DNA alvo [9, 10] (Figura 2).

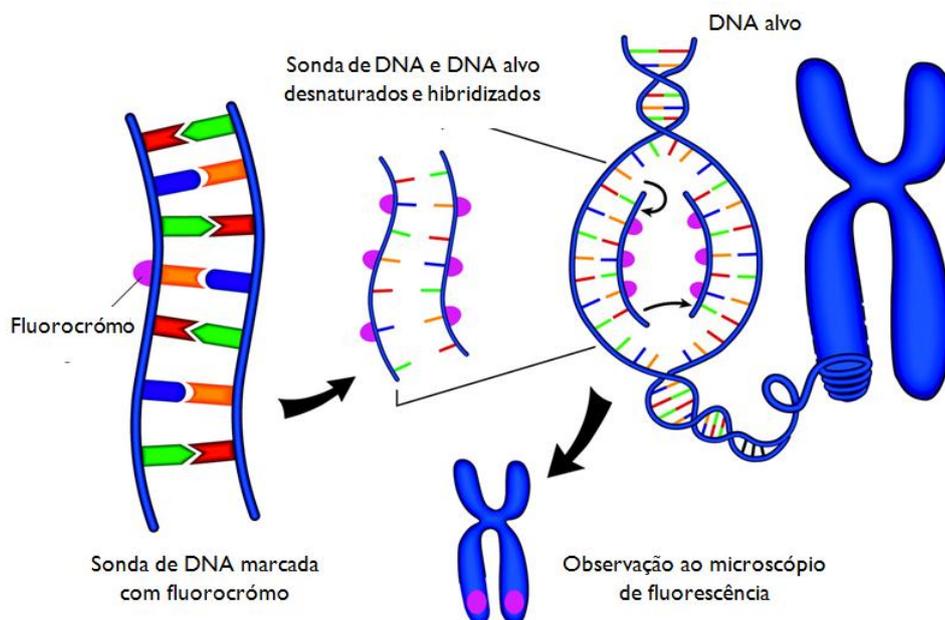


Figura 2: Representação esquemática da técnica de FISH. Uma sonda de DNA é marcada com um fluorocromo. A sonda e o alvo são desnaturados permitindo que a sonda hibridize com o alvo. O alvo é depois detetado ao microscópio de fluorescência. Adaptado de Wippold, F. et al. [10].

A detecção da fluorescência é feita através da excitação do fluorocromo com luz ultravioleta, sendo que existem vários fluorocromos disponíveis como por exemplo fluoresceína-5-tiocianato (FITC) e tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC) que estão diretamente ligados à sonda de DNA [9].

Mais recentemente, novas tecnologias, como *multicolour FISH* (M-FISH) [11] e *spectral karyotyping* (SKY) [12], permitiram a identificação dos diferentes 24 cromossomas com cores distintas. Desta forma, estendeu-se o alcance do FISH tradicional a todo o genoma, tanto para alterações numéricas como estruturais com uma única hibridização [13]. Estas tecnologias têm também sido aplicadas na área do cancro.

As sondas de DNA utilizadas na FISH podem ser produzidas para praticamente todas as regiões cromossómicas, sendo que as sondas podem incidir em sequências repetitivas ou sequências únicas. Deste modo, destacam-se diversos tipos de sondas de DNA, nomeadamente: i) sondas centroméricas direcionadas para a região do centrómero dos cromossomas; ii) sondas para *locus* específicos, direcionadas para uma sequência de DNA única e específica; iii) sondas teloméricas e subteloiméricas direcionadas para as extremidades dos cromossomas; iv) sondas de *painting* cromossómico que marcam um cromossoma inteiro.

As sondas centroméricas são dirigidas às regiões repetitivas nos centrómeros dos cromossomas que são constituídas por sequências α -satélite. As sequências α -satélite são suficientemente divergentes para permitir o desenvolvimento de sondas específicas para o centrómero [9], tornando-se assim especialmente úteis para a detecção de aneuploidias tanto em células em metafase como em interfase [14]. Outros tipos de sequências repetitivas são as sequências β -satélite, localizadas nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos e nas regiões repetitivas teloméricas [6]. As sondas de *painting* cromossómico permitem a identificação de todos os cromossomas [15] e são compostas de sequências únicas e moderadamente repetitivas de um cromossoma inteiro (WCP) ou região cromossómica [9].

A técnica de FISH pode ser aplicada numa grande variedade de amostras dependendo do estudo a realizar. O FISH aplicado em células em metafase é considerado o *gold standard*, pois podem ser diretamente visualizados os cromossomas e a posição exata do sinal. Já a aplicação de FISH em interfase permite o despiste rápido no diagnóstico pré-natal, e/ou quando não há células em metafase disponíveis, não permitindo a visualização *in situ* dos cromossomas [6].

A maior vantagem da tecnologia de FISH é o facto de permitir a detecção de anomalias cromossómicas como duplicações e deleções não detetáveis por citogenética convencional, identificação de cromossomas marcadores e caracterização de outros rearranjos

cromossômicos, dado que estas alterações podem ter grande impacto na relação genótipo fenótipo [6].

3. ANÁLISE DE FRAGMENTOS

3.1. TRIPLETOS CGG

3.1.1. SÍNDROME DE X-FRÁGIL

A síndrome de X-frágil é a maior causa de atraso cognitivo hereditário, por vezes apresentada como perturbação do espectro do autismo [16]. Esta síndrome é uma doença ligada ao cromossoma X e tem um padrão de herança pouco habitual, mostrando penetrância aumentada à medida que o gene mutante é passado às gerações seguintes [17]. Na maioria dos doentes, esta patologia está associada a um aumento do número de repetições CGG (> 200) localizadas dentro da região 5'UTR (*untranslated region*) do gene *fragile X mental retardation-1 (FMR1)* localizado na região q27.3 no cromossoma X. Contudo, o fenótipo patológico manifesta-se apenas se a expansão for acompanhada de metilação das repetições CGG e da zona circundante da região promotora do gene *FMR1*. Esta metilação anormal inibe a transcrição do gene *FMR1* e conseqüentemente afeta a síntese da proteína correspondente *fragile X mental retardation protein (FMRP)* [18] (Figura 3). Deste modo, o atraso cognitivo na síndrome do X-frágil é causado pela ausência da proteína (FMRP) nos neurónios [16].

Na maioria da população, a região de repetições CGG é polimórfica, sendo que alelos normais variam entre 5 a 44 repetições CGG, e são normalmente transmitidos sem alterações à geração seguinte [19]. Os alelos mais comuns na população têm 29/30 repetições CGG [20]. Um número de repetições CGG entre 45 e 54 é considerado alelo intermédio e é apontado como precursor dos alelos pré-mutados, dado que há riscos de expansão associados [20]. Os alelos pré-mutados apresentam expansões entre 55 e 200 CGG (mulheres portadoras destes alelos podem transmitir síndrome de X-frágil) [20].

Os alelos pré-mutados não são metilados nos homens e podem ser sujeitos a lionização (inativação de um dos cromossomas X) nas mulheres [18], sendo o fenótipo dependente da percentagem de inativação do cromossoma X mutado. Estes alelos são instáveis na meiose e podem expandir para mutação completa apenas por transmissão materna [16].

A sequenciação das repetições CGG demonstrou que, na população em geral, existem interrupções com 1-3 sequências AGG a cada 9-10 CGG. No entanto, nas famílias com

síndrome de X-frágil, os alelos com pré-mutação normalmente têm uma interrupção AGG na extremidade proximal da repetição, ou podem mesmo não ter nenhuma [6]. O risco de expansão para a mutação completa depende em parte do tamanho das repetições CGG mas também do número de interrupções AGG. Os tripletos AGG parecem exercer um efeito estabilizador e a perda da interrupção AGG mais próxima da extremidade é uma determinante importante da instabilidade das repetições CGG [21].

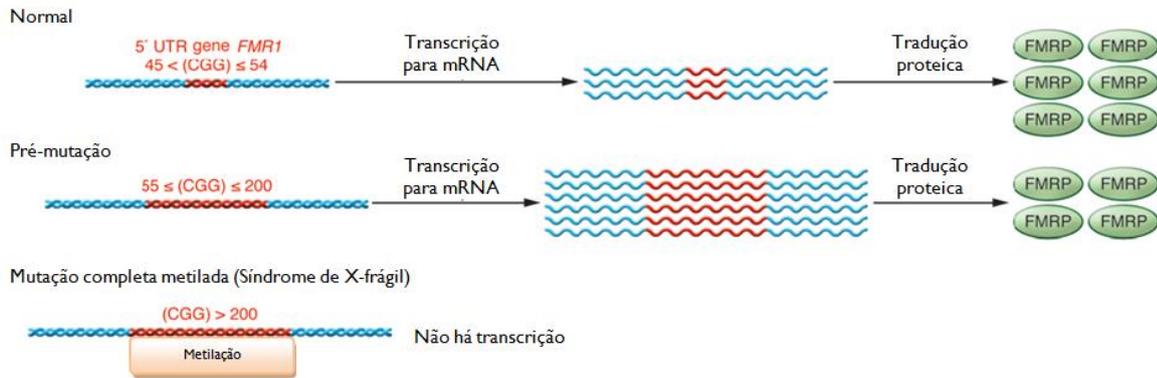


Figura 3: Representação esquemática das formas alélicas normal, pré-mutada e com mutação completa do gene *FMR1* de acordo com o número de repetições CGG e nível de tradução proteica. Adaptado de Bagni, C. et al. [19].

Na síndrome do X-frágil, as citosinas localizadas a montante das repetições CGG, incluindo o promotor do gene *FMR1*, estão metiladas. Os alelos normais também estão metilados na região promotora do gene *FMR1*, mas não na proximidade das repetições CGG, o que previne a metilação de se espalhar. Já nos alelos com mutação completa isto não acontece e as citosinas a montante da repetição CGG tornam-se metiladas pela 13ª semana do desenvolvimento embrionário [22]. Os indivíduos com a pré-mutação não demonstram sintomas de síndrome de X-frágil, mas podem apresentar uma doença neurodegenerativa de manifestação tardia, que dá pelo nome de tremor/ataxia associada à síndrome X-frágil [23], manifestando-se principalmente nos homens. Algumas das mulheres portadoras da pré-mutação são afetadas por insuficiência ovariana prematura, ocorrendo menopausa precoce (antes dos 45 anos) [24].

3.1.2. POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR)

As técnicas moleculares geralmente utilizadas para determinar o número de repetições CGG e a forma alélica correspondente são a PCR e *Southern Blot* [18]. No entanto, comparativamente com a técnica de PCR, a técnica de *Southern Blot* é mais morosa e requer uma maior quantidade de DNA [25].

A técnica de PCR [26] é o método de escolha para amplificar seletivamente pequenas quantidades de DNA, de forma rápida e precisa. Esta técnica é muito sensível, robusta e utiliza uma DNA polimerase para replicar seletivamente sequências de DNA alvo dentro de um conjunto de várias sequências de DNA, permitindo também a análise de várias amostras de uma só vez.

A técnica de PCR depende de sequências de oligonucleótidos sintéticas que agem como iniciadores (*primers*) e ligam-se a locais definidos dentro do DNA para iniciar a síntese de uma nova cadeia de DNA (Figura 4), sendo que o objetivo é replicar seletivamente apenas as sequências alvo. O PCR consiste numa série de ciclos de três reações sucessivas conduzidas a diferentes temperaturas. Primeiro, o DNA inicial é aquecido a uma temperatura suficientemente elevada para quebrar as pontes de hidrogénio que mantêm unidas as duas cadeias de DNA complementares, tornando-as em duas cadeias de DNA simples (desnaturação). Após arrefecimento, os *primers* (oligonucleótidos sintéticos) podem ligar-se por emparelhamento de bases a uma sequência complementar na cadeia simples de DNA (emparelhamento). Seguidamente, na presença de quatro desoxinucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), uma DNA polimerase inicia a síntese de novas cadeias de DNA complementares do segmento de DNA alvo [27, 28].

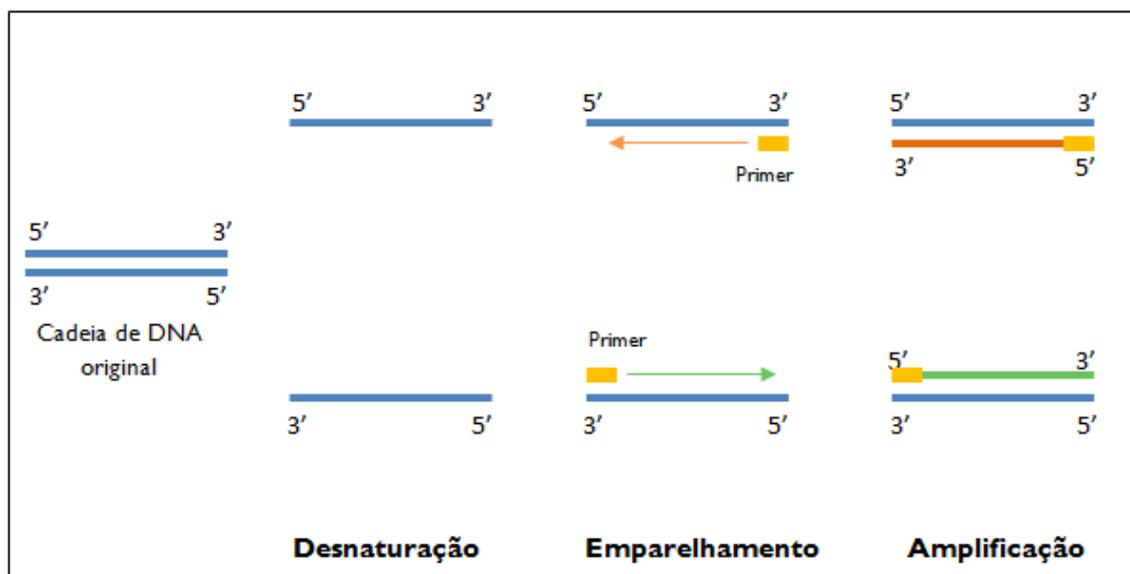


Figura 4: Representação esquemática da síntese de novas cadeias de DNA através da técnica de PCR.

A orientação dos *primers* é deliberadamente escolhida de modo a que a direção da síntese de novas cadeias de DNA progride em direção ao local de ligação do outro *primer*. Deste modo, as cadeias recém sintetizadas podem servir de modelo para nova síntese de DNA, o que gera uma reação em cadeia permitindo o aumento exponencial de produto da reação. As três reações sucessivas de desnaturação, emparelhamento e síntese de DNA são repetidas cerca de 30 a 40 vezes numa reação de PCR típica [28].

Para permitir uma amplificação seletiva é necessária alguma informação sobre a sequência do DNA alvo. Esta informação é usada para desenhar os dois *primers*, que são específicos para duas sequências que flanqueiam a sequência alvo a amplificar. Para se ligarem efetivamente, é necessário que os *primers* tenham um grau elevado de complementaridade de bases para as zonas que vão ligar [28].

Uma medida útil da estabilidade de qualquer dupla cadeia de DNA é a temperatura correspondente ao ponto médio na transição entre dupla cadeia para cadeia simples - *melting temperature* (T_m). Para garantir um grau elevado de especificidade na ligação dos *primers*, a temperatura de hibridização é ajustada para cerca de 5°C abaixo da T_m , se a temperatura de hibridização fosse muito menor, os *primers* tenderiam a ligar-se a outras regiões do DNA que tenham sequências parcialmente complementares. A T_m e a temperatura de hibridização dependem da composição das bases, pois a ligação GC tem três pontes de hidrogénio e a ligação AT só tem duas, logo cadeias ricas em CG são mais difíceis de separar [28]. Logo, dado o elevado conteúdo GC da região 5'UTR do gene *FMRI*, pode ser difícil determinar o número de repetições CGG [29].

Numa primeira análise, as amostras são estudadas por PCR convencional em que um par de *primers* flanqueia a região alvo. Assim, utilizam-se os *primers* C (*forward*) e F (*reverse*) descritos por Fu *et al.*, e o protocolo descrito por Wilson *et al.* [29]. Pré-mutações de grande dimensão e mutações completas estão além do poder de amplificação desta técnica, pelo que é necessário recorrer ao *Triplet repeat primed PCR* (TP-PCR) que além do par de *primers* específicos, contém um terceiro *primer* que hibridiza repetidamente dentro da sequência repetitiva gerando inúmeros fragmentos de diversos tamanhos (Figura 5) [25,30].

Esta técnica permite não só detetar pré-mutações de grande dimensão e mutações completas como também discriminar mulheres homozigóticas normais de mulheres com mutação [25]. Uma vez que os alelos com 29/30 repetições são os mais comuns da população, é frequente a existência de mulheres homozigóticas normais com alelos normais desta dimensão.

Em ambos os casos os produtos de PCR obtidos permitem determinar a dimensão precisa dos alelos. Os tamanhos dos produtos de PCR são calculados e convertidos em número de repetições de tripletos, determinando assim a forma alélica presente [25].

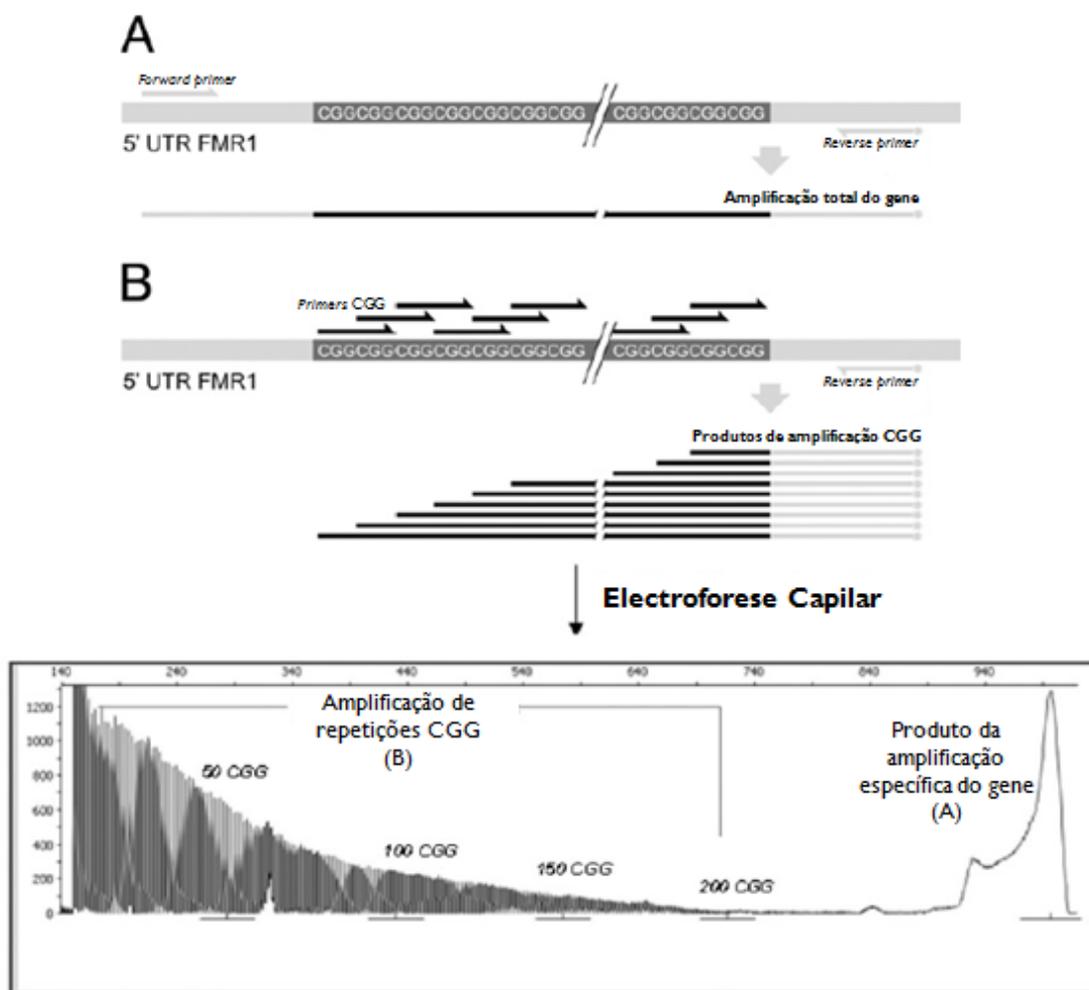


Figura 5: Amplificação e detecção do gene *FMR1* usando TP-PCR. O DNA é amplificado por dois *primers* específicos para o gene *FMR1* (*forward* e *reverse*) representado em A e por um *primer* específico para as repetições CGG representado em B. Após a amplificação, os produtos são separados por electroforese capilar. O electroferograma resultante mostra a quantificação do número de repetições CGG (B), bem como o produto de amplificação específica do gene (A). Adaptado de Seneca, S. et al. [25] e Chen, L. et al. [30].

3.2. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

O MLPA [31] é uma técnica semi-quantitativa para o rastreio dirigido de alterações no número de cópias de DNA [32], utilizada para o diagnóstico de várias doenças genéticas, pois é possível analisar mais de 40 sequências de DNA. Para isso, utiliza várias sondas específicas para determinadas sequências alvo na cadeia de DNA [7] numa única reação de PCR (Multiplex) [33].

Cada uma das sondas consiste em dois fragmentos que se ligam a zonas adjacentes na sequência de DNA alvo (Figura 6). Assim, cada fragmento das sondas tem: i) uma sequência de hibridização diferente e específica para uma sequência alvo no DNA; ii) sequências idênticas de ligação ao *primer* numa das terminações, para que quando ligadas, todas as

sondas tenham seqüências idênticas nas terminações 3' e 5', permitindo a amplificação simultânea de todas as sondas numa única reação de PCR, utilizando apenas um par de *primers* universal; iii) e ainda um dos oligonucleótidos das sondas possui uma seqüência *stuffer* (que não hibridiza) de tamanho variável que permite distinguir as sondas por tamanho [31].

A reação de MLPA pode dividir-se em cinco etapas principais: i) desnaturação do DNA e hibridização das sondas; ii) reação de ligação; iii) PCR (amplificação); iv) separação dos produtos de amplificação por electroforese capilar; v) análise de resultados através de *software* adequado [7].

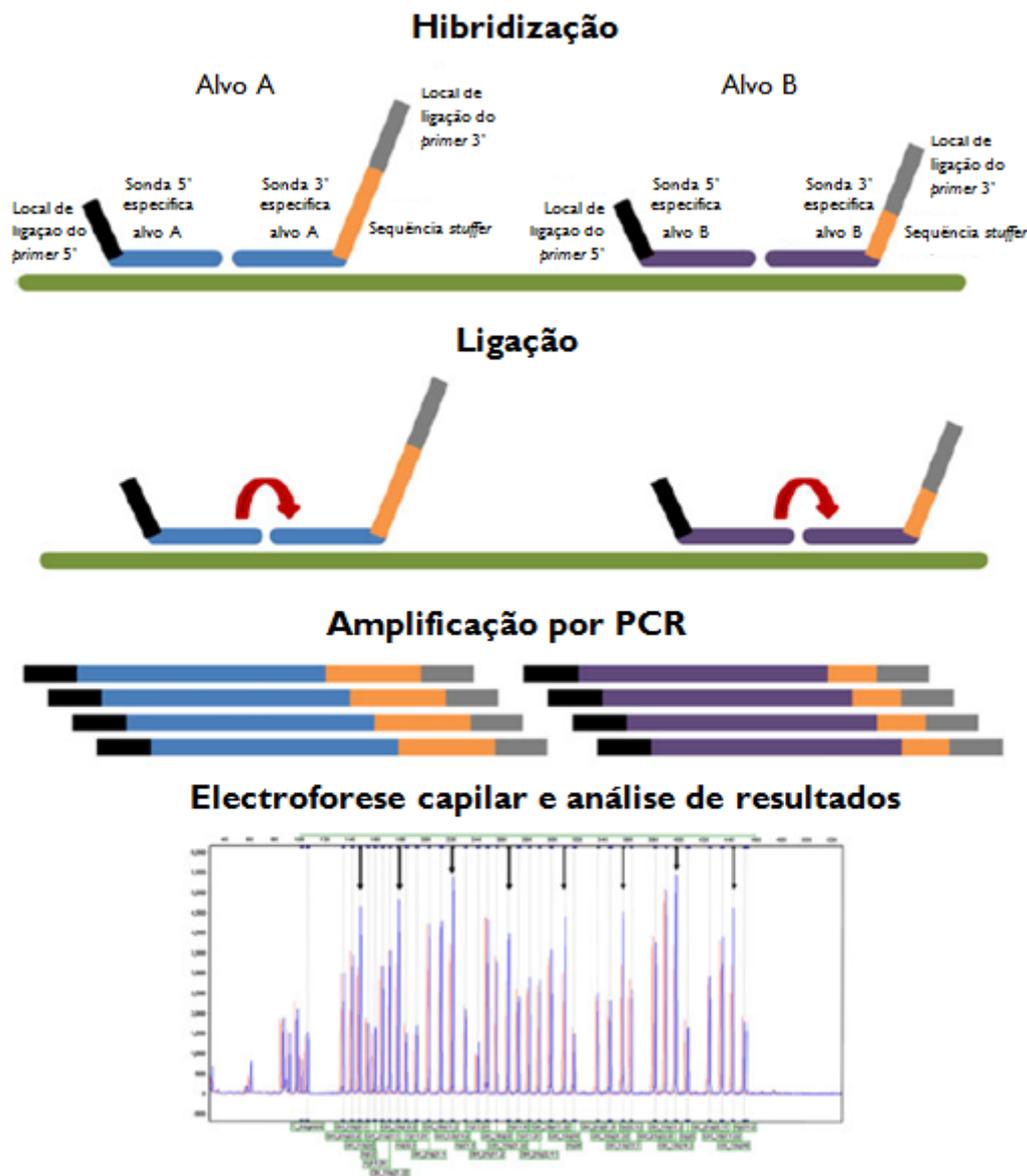


Figura 6: Representação esquemática da técnica de MLPA. Primeiro ocorre a hibridização da sonda com o alvo na seqüência de DNA. Seguidamente ocorre a ligação dos fragmentos de cada sonda. Posteriormente, ocorre a amplificação por PCR das sondas ligadas e por fim electroforese capilar e análise de resultados. As setas indicam picos cujas intensidades são superiores aos picos controle sugerindo um aumento do número de cópias de DNA para aquela região. Adaptado de Willis, A. et al [32].

Primeiro o DNA é desnaturado e hibridizado com a mistura de sondas, em que os dois fragmentos de cada sonda vão reconhecer especificamente as suas sequências alvo adjacentes e hibridizar num processo que ocorre durante cerca de 16 horas. Na etapa de ligação, na presença de uma perfeita correspondência entre as sondas e o alvo, ocorre a ligação dos dois fragmentos de cada sonda pela ação da ligase [31]. Na fase seguinte de PCR, serão amplificados apenas os fragmentos ligados. No MLPA não é o DNA da amostra que é amplificado durante o PCR, mas sim as sondas que hibridizaram com a sequência de DNA da amostra [33]. Assim, a quantidade de produtos do PCR é diretamente proporcional à quantidade das sequências alvo na amostra e cada sonda gera um produto amplificado que pode ser distinguido através do tamanho [7]. Os produtos de PCR são separados e quantificados por electroforese capilar e podem ser então analisados. As divergências entre as diferentes amostras de DNA podem ser detetadas comparando os padrões de picos resultantes do MLPA com o padrão de hibridização de amostras controlo [33].

Para a análise de resultados é feita uma normalização, quer intra-amostra, quer inter-amostras. Em cada amostra são comparados os picos das sondas específicas de genes de interesse com os picos das sondas referência. As sondas referência são dirigidas a sequências expectáveis de ter um número normal de cópias em todas as amostras testadas. Além disso, os picos padrão da amostra de interesse são comparados com os obtidos nas amostras controlo incluídas na mesma pesquisa. As amostras controlo pertencem a indivíduos saudáveis, que possuem um número normal de cópias para as regiões genéticas estudadas. Deste modo, é possível detetar deleções ou duplicações nas sequências alvo das sondas correspondentes de MLPA [33].

As suas principais vantagens são permitir a aplicação de várias amostras de uma só vez, utilizando um único tubo de reação para cada amostra, os resultados são obtidos em 24-48h, requer pouca quantidade de DNA e com um protocolo relativamente pouco trabalhoso e rápido [32].

4. ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (ACGH)

O Array CGH [34], por vezes chamado cariótipo molecular [35], é uma técnica com grande resolução que deteta alterações no número de cópias do genoma. Em comparação com o cariótipo convencional, o aCGH oferece uma resolução entre 10 kb e 1Mb em vez de cerca de 5 Mb, e deteta pelo menos o dobro das alterações [36].

Um *microarray* utiliza uma superfície de vidro onde são colocadas e fixadas muitos milhares de sondas de DNA ou oligonucleótidos em coordenadas definidas com precisão num formato de alta densidade. Cada um dos milhares de sondas diferentes pode hibridizar com as sequências alvo do DNA em estudo [28]. As sondas para aCGH podem ser baseadas em *bacterial artificial chromosomes* (BAC) ou oligonucleótidos. Dependendo da cobertura genómica, em geral, os *arrays* de oligonucleótidos têm potencial para uma melhor resolução com capacidade para detetar alterações menores que os *arrays* de BAC [37].

Existem vários formatos para o aCGH (Figura 7), com maior ou menor densidade de sondas, que podem ser escolhidos consoante o objetivo do estudo e a resolução pretendida.

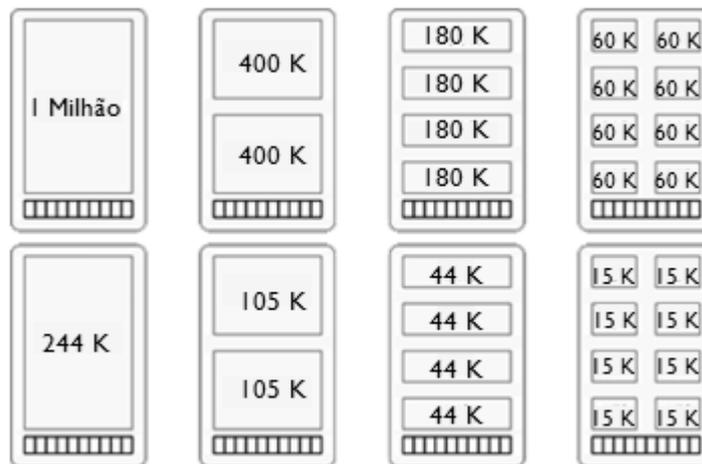


Figura 7: Vários formatos para array. Adaptado de [38].

A resolução é dependente, em primeira instância, da plataforma utilizada. Quanto maior o número de sondas, maior será a resolução e consequentemente maior será a informação obtida. Contudo, quanto mais alta a resolução, mais complexa é a interpretação dos resultados [39].

No aCGH as amostras de DNA em estudo e referência são marcadas com diferentes fluoróforos (por exemplo Cy3 - verde e Cy5 - vermelho) e hibridizadas simultaneamente na presença de Cot-1 DNA¹ para minimizar a hibridização a sequências repetitivas. Após a hibridização, lavagem e *scanning*, as intensidades de fluorescência do Cy3 e Cy5 para cada sonda são medidas, normalizadas e feito o log₂ dos rários do DNA em estudo (por exemplo marcado com o fluoróforo Cy5) dividido pelo DNA referência (por exemplo marcado com o fluoróforo Cy3) e são representadas nos locais do cromossoma correspondente [40] (Figura 8).

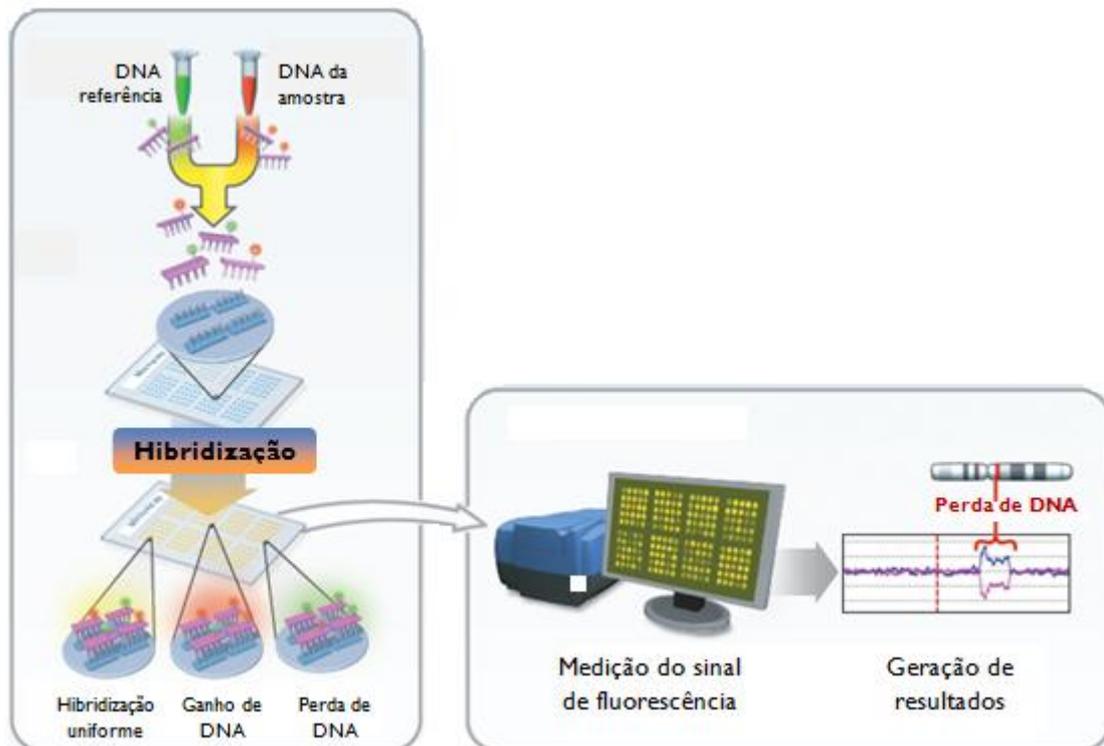


Figura 8: Esquema representativo do processo do aCGH. O DNA em estudo e referência são marcados com diferentes fluorocromo e aplicados no *microarray* competindo pelos locais de ligação. Seguidamente um *scanner* mede as intensidades de fluorescência. Com *software* adequado analisam-se os resultados. Adaptado de [41].

As regiões cromossômicas aneuplóides são detetadas como um desvio do rácio logarítmico das intensidades das sondas da amostra contra a referência [36]. Para cada posição o valor 0 indica um número equilibrado de cópias ($\log_2 (2/2) = 0$), enquanto que o valor 0,58 ($\log_2 (3/2) = 0,58$) indica um ganho em relação à referência e o valor -1 ($\log_2 (1/2) = -1$) indica a perda de uma cópia no DNA da amostra em comparação com a referência [40,36].

Uma variante deste método é o *design em loop*, no qual são realizadas três hibridizações, comparando três pacientes entre si (Paciente 1 vs. Paciente2, Paciente 2 vs. Paciente 3, Paciente 3 vs. Paciente 1) servindo de referência uns para os outros. Nesta alternativa

¹ DNA placentário enriquecido com sequências repetitivas. [42]

medem-se as intensidades de fluorescência das três amostras em estudo, não sendo necessária uma amostra referência. Assim, apenas três *arrays* são utilizados obtendo-se duas medições para cada uma das amostras. No entanto, uma vez que o aCGH só deteta alterações desequilibradas, os pacientes hibridizados em conjunto não podem possuir as mesmas alterações (deleções ou duplicações), pelo que deve ter-se o cuidado de associar pacientes com fenótipo distinto, dado que é menos provável possuírem as mesmas alterações [36].

O aCGH permite o estudo simultâneo de vários *loci* que podem estar associados a doenças bem caracterizadas permitindo o diagnóstico mais rápido e menos honoroso. Podem ser detetadas alterações em mosaico (se não for de baixa expressão), desequilíbrios subteloméricos, microdeleções e microduplicações. Além disso, o aCGH é capaz de revelar numerosas *copy number variations* (CNVs²) de significado clínico ainda não conhecido dispersas ao longo do genoma humano [43].

As CNVs podem ser classificadas como i) patogénicas (síndromes estabelecidas, variantes *de novo*, e grandes alterações), ii) variantes de significado clínico incerto (*variants of uncertain significance* - VOUS), iii) provavelmente benignas (não reportadas nas bases de dados mas herdadas de um parente saudável) [44]. As VOUS são consideradas assim devido à sua baixa frequência nos pacientes e ausência nas populações controlo [37].

Quando uma CNV de significado desconhecido é identificada, os genes localizados dentro dessa zona tornam-se potenciais candidatos, orientando a descoberta de genes associados a doenças [43, 36]. Contudo, os efeitos das CNVs no fenótipo por vezes não são claros e dependem principalmente se os rearranjos afetam genes sensíveis à dosagem ou sequências reguladoras [45].

Algumas CNVs provavelmente representam uma variação normal na população, pois são identificadas tanto em pacientes como em indivíduos fenotipicamente normais aproximadamente na mesma proporção [37]. Deste modo, a principal causa das dificuldades de interpretação é a presença de numerosos polimorfismos no genoma humano [46].

² CNV: segmento de DNA de tamanho variável entre 1 K e vários Mb que representa uma desproporção entre dois genomas. As CNVs perturbam o equilíbrio diploide normal de um determinado *locus* e podem resultar de deleções, duplicações, segregações anómalas de translocações, inserções e inversões [45].

B. Análise e Interpretação de Casos Clínicos

Foram analisados cinco casos clínicos de modo a permitir avaliar a estratégia laboratorial usada e a interpretação dos resultados.

I. CASO CLÍNICO I

Menino de 4 anos com atraso de desenvolvimento psicomotor. A criança foi previamente estudada por *array* CGH noutra laboratório, tendo sido encontrada uma deleção de 1,66 Mb em 22q13.3: 22q13.3(49,513,903-51,178,264)x1.

Segundo as *guidelines*, os resultados anómalos devem ser confirmados por outra tecnologia. Também para salvaguardar a probabilidade de uma alteração estrutural envolvendo a região 22q13.3 deve fazer-se o cariógrama. Estando esta região associada à síndrome de Phelan-McDermid e havendo sondas para o *locus* N85A3, procedeu-se ao estudo do caso pela técnica de FISH.

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS

FISH utilizando sonda para o *locus* N85A3 (*Cytocell-Aquarius*; REF LPU 010) que hibridiza em 22q13.33 nas posições nucleotídicas (51,113,070-51,171,641) aproximadamente.

Análise citogenética convencional com estudo do cariótipo a partir de cultura celular sincronizada de linfócitos, espalhamento de metafases e bandagem GTG.

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO

Após hibridização de uma sonda dirigida para a região 22q13.33 e outra para a região crítica da síndrome DiGeorge (utilizada como controlo) obteve-se o seguinte resultado (Figura 9):

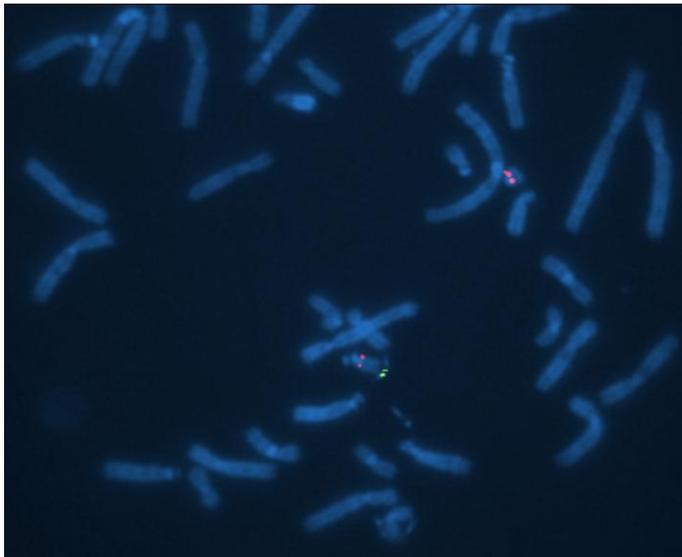


Figura 9: Observação ao microscópio de fluorescência de células em metafase com uso da técnica de FISH. Sonda de sequência única a vermelho para a região crítica da síndrome de DiGeorge (região 22q11.21). Sonda teloméricas a verde para o locus N85A3 que inclui o gene *SHANK3* (22q13.33).

Observam-se os dois sinais da sonda controlo (vermelho) e apenas um para a sonda específica da região 22q13.33 a verde (*locus* N85A3 que inclui o gene *SHANK3*), o que confirma a deleção encontrada por aCGH noutra laboratório e que leva à suspeita de um rearranjo estrutural no cromossoma 22.

A citogenética convencional mostrou que o cromossoma 22 com a deleção na região terminal apresenta uma estrutura em anel (Figura 10).

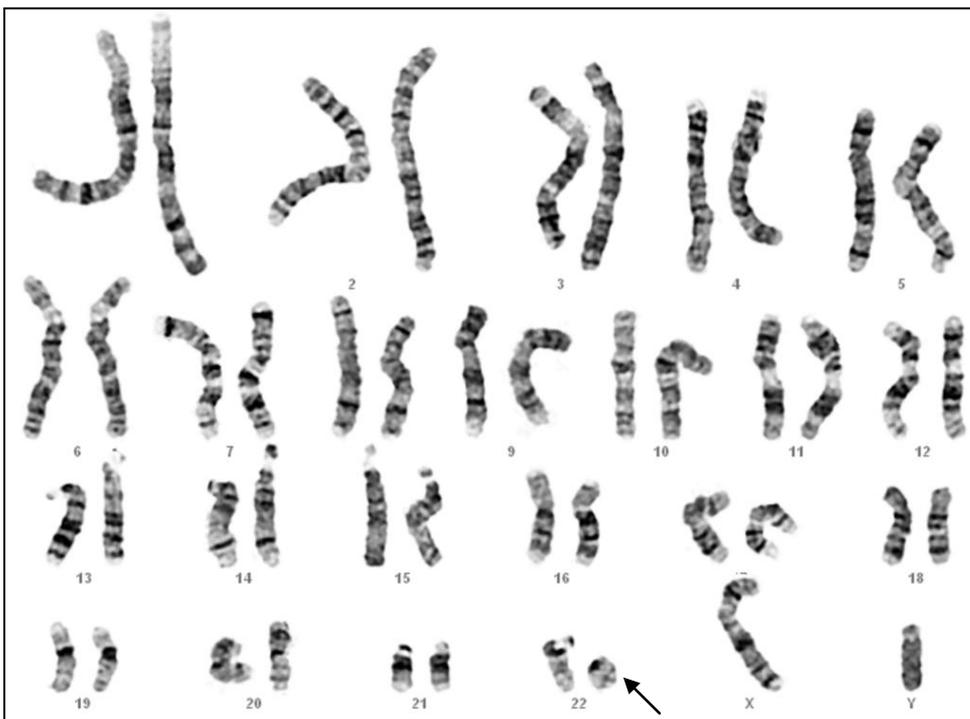


Figura 10: Cariograma de um indivíduo do sexo masculino com um cromossoma 22 em anel. 46,XY,r(22).

Os cromossomas em anel geralmente formam-se a partir de quebras nas extremidades de um ou de ambos os braços do cromossoma, com perda de material genético. Alternativamente, podem formar-se anéis completos pela simples união das zonas teloméricas, sem perda de material genético [47]. No caso estudado neste trabalho, a formação do anel envolve a quebra da extremidade 22q12.33.

A formação de anéis poderá ser um mecanismo para estabilizar cromossomas com deleções terminais nomeadamente durante os primeiros estados embrionários, contudo estes mecanismos ainda não estão completamente compreendidos [48].

A deleção na região 22q13.33 está associada a síndrome de Phelan-McDermid, sendo que o diagnóstico é essencialmente molecular [48]. As deleções nesta região (22q13.33) levam a haploinsuficiência do gene *SHANK3*, e o fenótipo associado a esta síndrome caracteriza-se principalmente por hipotonia neonatal, atraso cognitivo moderado a severo, atraso de desenvolvimento da linguagem, e por vezes está associado a perturbação do espectro do autismo [49]. Dado que a criança apresenta atraso de desenvolvimento psicomotor, pode concluir-se que as características da síndrome de Phelan-McDermid são consistentes com o fenótipo observado na criança. As deleções na porção terminal do cromossoma 22 ou a presença de um cromossoma 22 em anel causam as mesmas manifestações fenotípicas [50].

Para perceber se a alteração é herdada ou *de novo* estudaram-se os pais da criança por citogenética convencional e por FISH sendo que os resultados foram normais (Figura 11).

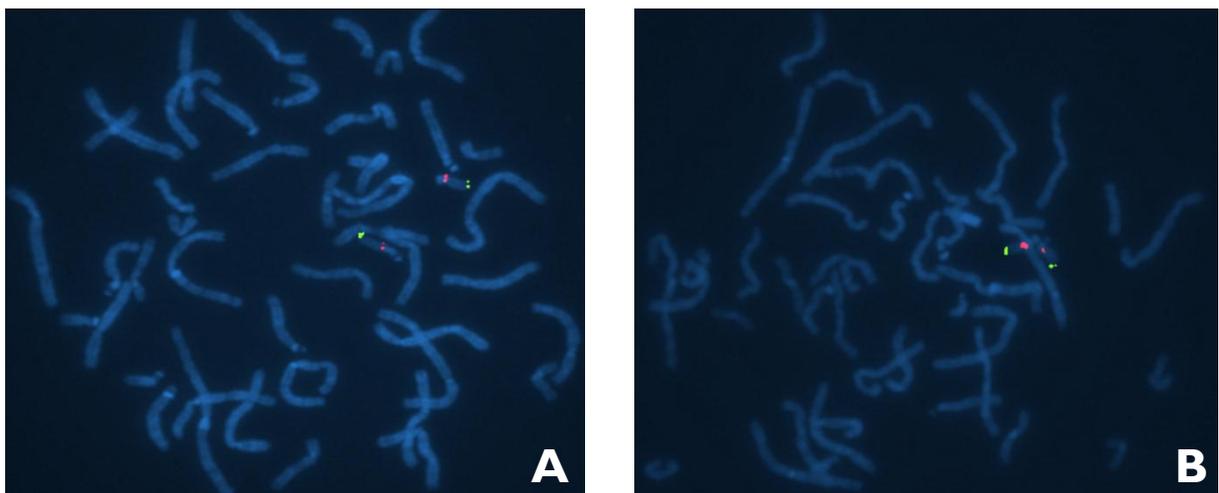


Figura 11: Observação ao microscópio de fluorescência de células em metafase com uso da técnica de FISH dos pais (A – Mãe; B - Pai) de uma criança com síndrome de Phelan-McDermid. Ambas as sondas, controlo (vermelho) e para o locus N85A3 que inclui o gene *SHANK3* (verde) mostram sinais normais de hibridização.

Podem observar-se sinais normais (um verde e um vermelho) para cada cromossoma 22, o que significa que nenhum dos pais tem a deleção no cromossoma 22. A morfologia dos

cromossomas 22 nos pais elimina também a presença de um cromossoma em anel. Assim, podemos concluir que a alteração encontrada na criança é *de novo*. Deste modo, existe um baixo risco de recorrência, contudo pelo facto de estar envolvida uma alteração cromossómica é posto à disposição do casal a possibilidade de DPN em gestações futuras.

2. CASO CLÍNICO 2

Menina de 7 anos com atraso de desenvolvimento psicomotor e autismo, sem dismorfismos. Devido ao facto da mãe da menina se encontrar grávida de gémeos, foi pedido o estudo da criança para a síndrome de X-Frágil uma vez que é uma das causas de atraso de desenvolvimento psicomotor e seria importante este estudo para posteriormente oferecer DPN à progenitora.

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS

Efetuiu-se um PCR convencional para determinação do número de tripletos CGG. Foi também utilizado o *kit* comercial da *Asuragen* (TP-PCR) de acordo com as instruções do fabricante, utilizado para confirmação de resultados uma vez que permite detetar pré-mutações de grande dimensão e mutações completas.

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO

A análise por PCR convencional (*primers C/F*) (Figura 12) revelou a presença de apenas um alelo normal com 30 repetições CGG.

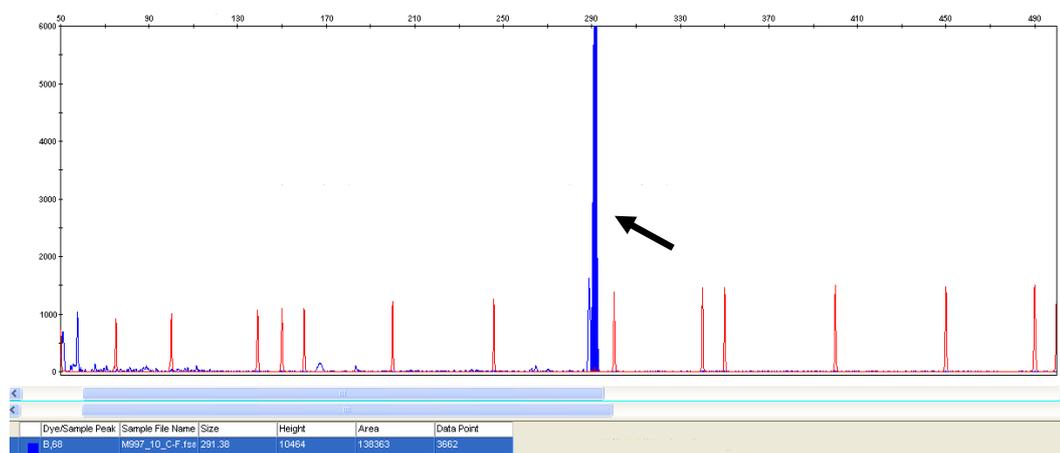


Figura 12: Electroforegrama obtido após PCR convencional revelando um alelo normal (30 CGG) representado pela seta.

O segundo alelo está ausente, o que pode significar que a menina é homocigótica normal ou é portadora de uma mutação completa. Assim, procedeu-se a análise através TP-PCR *Asuragen* (Figura 13):

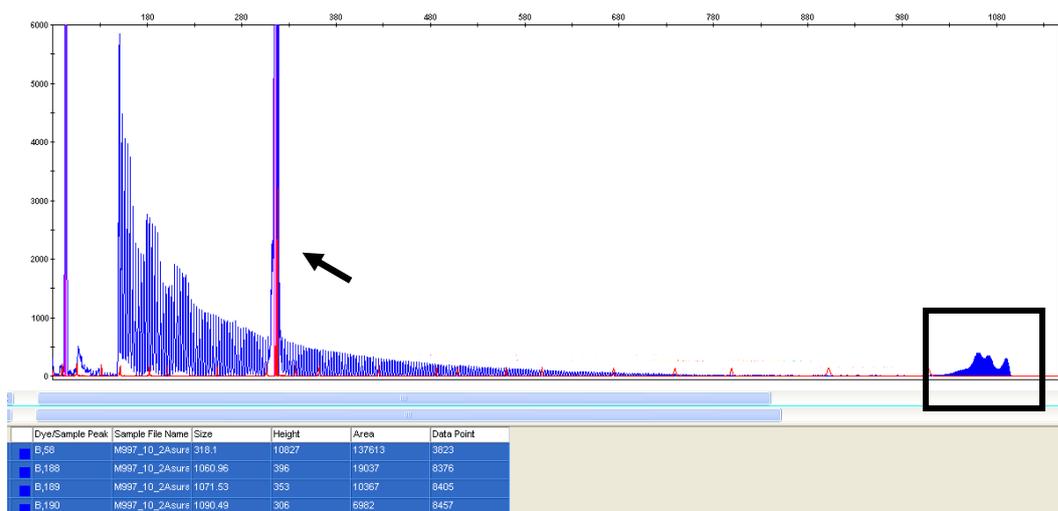


Figura 13: Electroforegrama obtido após TP-PCR revelando um alelo normal (30 CGG) representado pela seta e uma mutação completa (287 CGG) dentro do retângulo.

Observa-se a presença de um alelo normal com 30 repetições CGG e ainda um alelo com 287 repetições CGG, correspondente a uma mutação completa.

Os dados são consistentes com a síndrome do X-frágil, que será a patologia responsável pelo fenótipo apresentado. Estudou-se a progenitora (indivíduo II-2 na Figura 16) para determinar a origem da mutação completa e verificou-se no PCR convencional (Figura 14) a existência de dois fragmentos amplificados, um normal com 30 repetições CGG e outro pré-mutado com 75 repetições CGG.

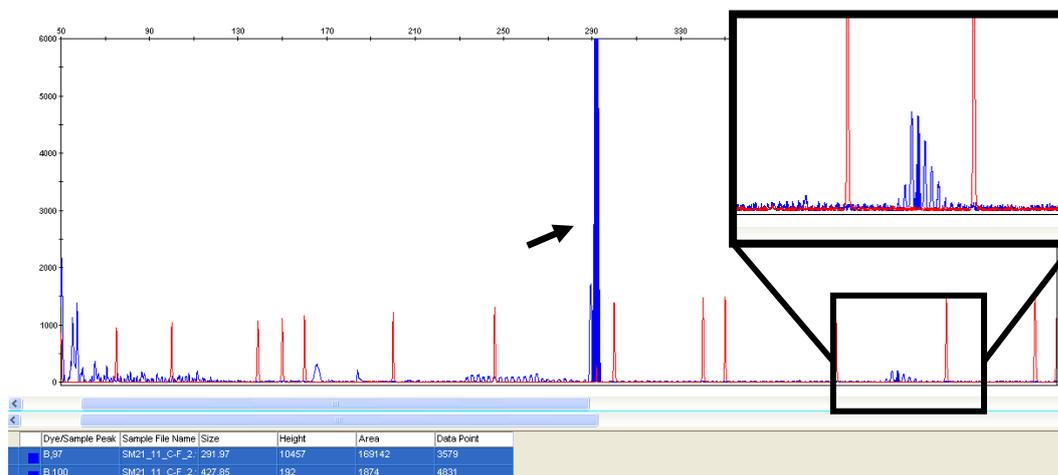


Figura 14: Electroforegrama obtido após PCR convencional revelando um alelo normal (30 CGG) representado pela seta e um alelo pré-mutado (75 CGG) representado pelo retângulo, com ampliação da imagem.

Como forma de confirmação, efetuou-se o TP-PCR *Asuragen* (Figura 15):

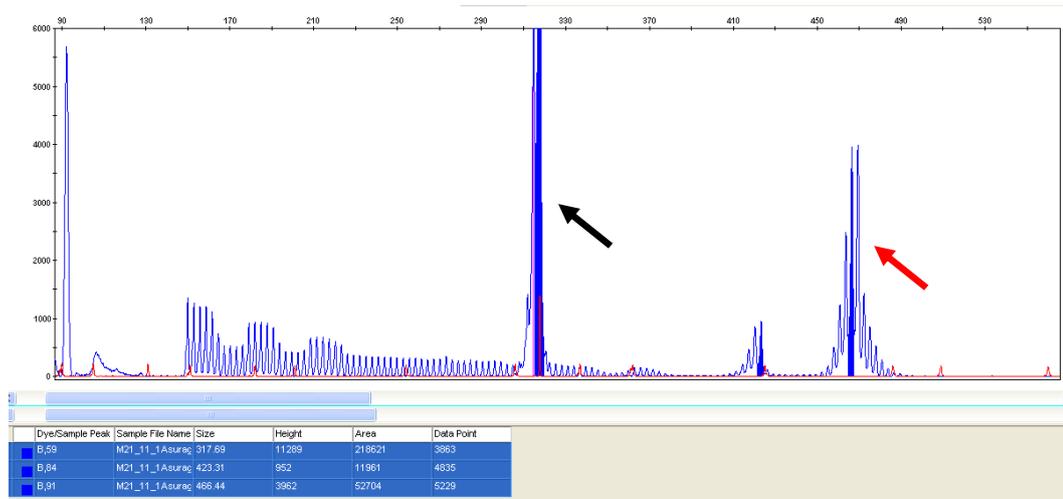


Figura 15: Electroforegrama obtido após TP-PCR revelando um alelo normal (30 CGG) representado pela seta a negro e um alelo pré-mutado (79 CGG) representado pela seta a vermelho.

Verificando-se a presença de um alelo normal com 30 repetições CGG e ainda um alelo pré-mutado com 79 repetições CGG.

Confirma-se assim que a mãe possui um alelo normal e um alelo pré-mutado, o qual terá expandido, sendo que a filha herdou o alelo com a mutação completa responsável pelo fenótipo apresentado. Uma vez que esta síndrome tem um carácter familiar, devem estudar-se outros membros da família (Figura 16). Posto isto, verificou-se que um sobrinho também apresentava atraso de desenvolvimento psicomotor (individuo III-4) e cuja progenitora (II-4) também se encontrava grávida (III-5):

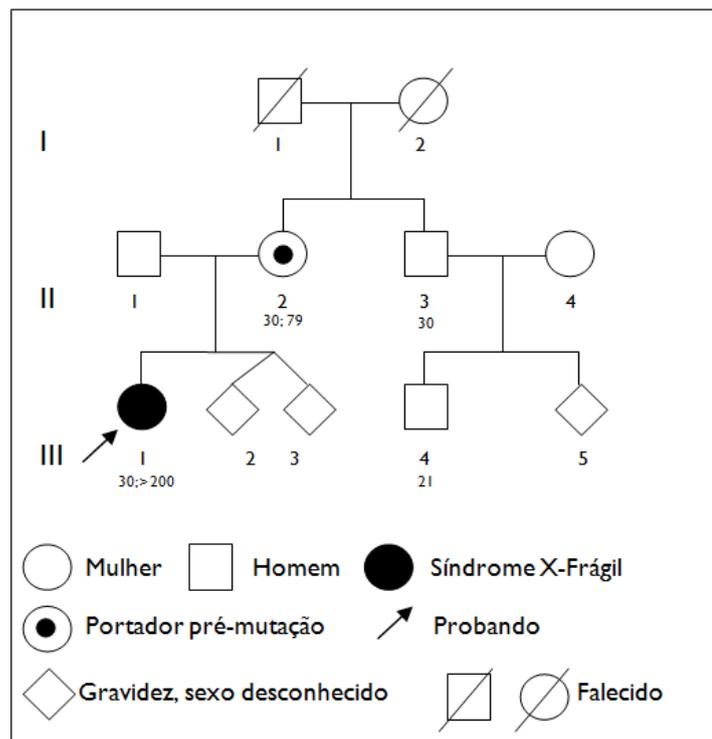


Figura 16: Heredograma familiar do caso em estudo para a Síndrome de X-Frágil.

Deste modo, pediram-se amostras de sangue do indivíduo II-3 (tio materno da menina) e também do indivíduo III-4 (primo). Observou-se o seguinte:

Indivíduo III-4 estudado por PCR convencional (Figura 17) apresentava um alelo normal com 21 repetições CGG.

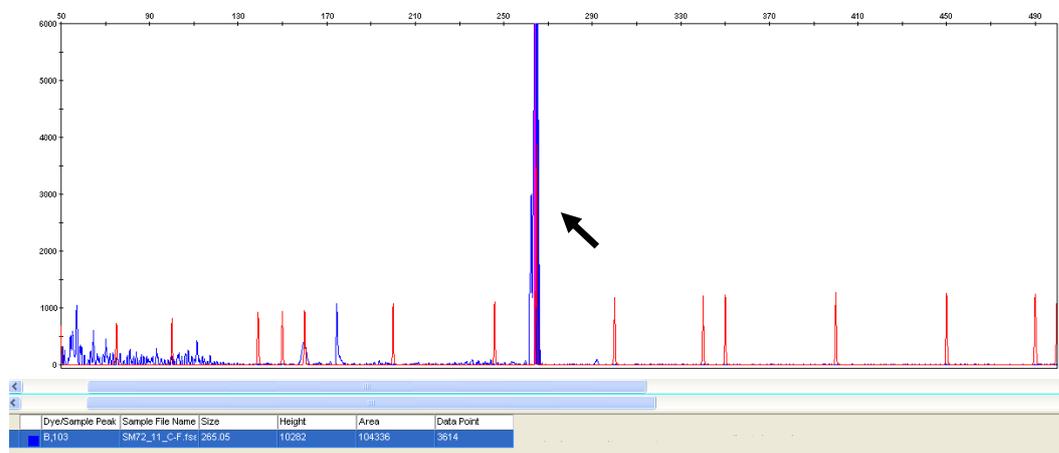


Figura 17: Electroforegrama obtido após PCR convencional revelando a presença de um alelo normal (21 CGG) representado pela seta.

Indivíduo II-3 estudado por PCR convencional (Figura 18) apresentava um alelo normal com 30 repetições CGG.

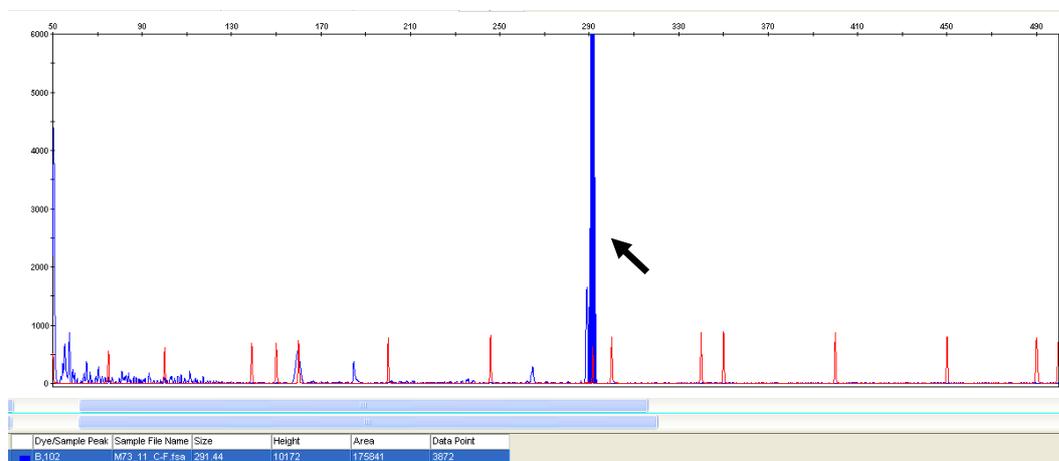


Figura 18: Electroforegrama obtido após PCR convencional revelando a presença de um alelo normal (30 CGG) representado pela seta.

Conclui-se assim que o fenótipo apresentado pelo primo da menina não se deve à síndrome de X-frágil, apresentando um alelo com número de repetições normal. E como o seu pai (II-3) também possui um alelo normal, não há risco de transmitir esta síndrome à descendência.

Procedeu-se ao DPN, dado que a mãe da menina (II-2) estava grávida de gémeos e há 50% de hipóteses de transmitir o alelo pré-mutado à descendência, o qual pode expandir para mutação completa. Após análise aos fetos, verificou-se que um era do sexo masculino e

possuía um alelo normal, e o outro era do sexo feminino e portador de um alelo pré-mutado. Assim, pode concluir-se que os fetos não manifestarão a síndrome de X-frágil, contudo, no futuro, o feto do sexo feminino deverá ser alertado para o risco de transmitir a mutação completa à descendência e para possibilidade de sofrer menopausa precoce.

3. CASO CLÍNICO 3

Menina de 10 anos com déficit cognitivo e dificuldades de aprendizagem, havendo história familiar positiva de atraso intelectual. Deste modo, foi pedido o estudo da síndrome de X-Frágil e das regiões subteloméricas, pois alterações nestas regiões estão frequentemente associadas a estes quadros clínicos. Além disso, deve ser feito o estudo do cariógrama para salvaguardar a presença de rearranjos estruturais.

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS

Procedeu-se ao estudo do cariógrama a partir de cultura celular sincronizada de linfócitos, espalhamento de metafases e bandagem GTG. Foi feito PCR convencional para a pesquisa de Síndrome de X-frágil. Utilizou-se a técnica de MLPA recorrendo ao painel para o estudo das regiões subteloméricas (SALSA MLPA P-036) segundo as instruções do fabricante e para confirmação do resultado foi feito FISH.

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO

Do estudo do cariótipo, concluiu-se que este apresentava uma constituição feminina normal 46,XX. De igual modo, a análise para a Síndrome de X-frágil revelou-se normal, mostrando que a menina apresentava alelos com 25 e 32 repetições CGG. Posteriormente, procedeu-se à técnica de MLPA para pesquisa de microdeleções nas regiões subteloméricas e através da análise com *software* adequado (Tabela I) observaram-se os seguintes resultados:

Tabela I: Resultados obtidos utilizando o painel de sondas P-036, após análise através de *software* adequado.

Gene	Chr pos	Criança	Mãe	Pai	Irmã
		Rácio	Rácio	Rácio	Rácio
TNFRSF4 probe 2269-L01761	01p	Normal (1,01)	Normal (0,99)	Normal (0,96)	Normal (0,98)
KIAA1720 probe 2392-L02149	01q	Normal (0,99)	Normal (1)	Normal (1,01)	Normal (0,99)
ACP1 probe 2274-L08758	02p	Normal (0,98)	Normal (0,95)	Normal (0,85)	Normal (0,87)
CAPN10 probe 1742-L01308	02q	Normal (1,01)	Normal (1)	Normal (1,07)	Normal (1,08)
CHL1 probe 1721-L01329	03p	Normal (1,11)	Normal (1,1)	Normal (1,13)	Normal (1,1)
BDH probe 2013-L02052	3q	Normal (1,01)	Normal (1,03)	Normal (1,02)	Normal (1,05)
FLJ20265 probe 2005-L02047	04p	LOH (0,55)	Normal (1)	LOH (0,56)	LOH (0,53)
TRIML2 probe 7046-L06655	4q	Normal (0,97)	Normal (1)	Normal (0,98)	Normal (0,96)
PDCD6 probe 1723-L01327	05p	Normal (0,99)	Normal (1,02)	Normal (1,03)	Normal (1,08)
GNB2L1 probe 3319-L02737	05q	Normal (0,96)	Normal (0,97)	Normal (0,88)	Normal (0,88)
IRF4 probe 1724-L02048	06p	Normal (0,96)	Normal (1,04)	Normal (1,05)	Normal (1)
PSMB1 probe 1746-L01304	06q	Normal (1,01)	Normal (1,06)	Normal (1,01)	Normal (1,03)
CENTA1 probe 2275-L02049	07p	Normal (0,9)	Normal (0,99)	Normal (0,95)	Normal (0,97)
VIPR2 probe 1747-L01303	07q	Normal (1,02)	Normal (0,99)	Normal (0,98)	Normal (0,98)
FBXO25 probe 2397-L01845	08p	Normal (1,04)	Normal (1)	Normal (1,01)	Normal (1,08)
KIAA0150 probe 1748-L01302	08q	Normal (1,08)	Normal (1,07)	Normal (1,09)	Normal (1,14)

DMRT1 probe 1727-L02050	09p	Normal (0,96)	Normal (0,91)	Normal (0,95)	Normal (0,91)
EHMT1 probe 8205-L08170	09q	Normal (1)	Normal (1,08)	Normal (1,11)	Normal (1,13)
KIAA0934 probe 2277-L01768	10p	Normal (1,09)	Normal (1)	Normal (1,1)	Normal (1,11)
PAO probe 9142-L09953	10q	Normal (0,95)	Normal (0,94)	Normal (0,97)	Normal (1)
RIC-8 probe 3315-L02733	11p	Normal (1,03)	Normal (0,99)	Normal (1,04)	Normal (1,04)
KIAA0056 probe 1751-L01299	11q	Normal (1,08)	Normal (1,03)	Normal (1,07)	Normal (1,12)
SLC6A12 probe 2276-L01767	12p	Normal (1,03)	Normal (1,01)	Normal (0,95)	Normal (0,94)
ZNF10 probe 2687-L02154	12q	Normal (1,06)	Normal (1,12)	Normal (1,03)	Normal (1,11)
PSPC1 probe 2399-L01847	13p	Normal (1)	Normal (1)	Normal (0,99)	Normal (0,98)
F7 probe 1753-L01297	13q	Normal (1,07)	Normal (1,09)	Normal (1,09)	Normal (1,12)
HEI10 probe 1732-L01318	14p	Normal (1,08)	Normal (1,1)	Normal (1,11)	Normal (1,16)
MTA1 probe 2778-L02201	14q	Normal (0,91)	Normal (1,02)	Normal (0,95)	Normal (1,04)
MKRN3 probe 7291-L08858	15p	Normal (1,06)	Normal (1)	Normal (1,07)	Normal (1,09)
ALDH1A3 probe 1755-L01295	15q	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (0,87)	Normal (0,85)
POLR3K probe 1734-L01316	16p	Normal (0,99)	Normal (0,96)	Normal (1,02)	Normal (1,09)
GAS11 / GAS8 probe 3201-L02669	16q	Normal (0,97)	Normal (0,96)	Normal (0,96)	Normal (0,96)
RPH3AL probe 1735-L01315	17p	Normal (0,92)	Normal (0,93)	Normal (0,92)	Normal (0,86)
TBCD probe 1757-L01293	17q	Normal (0,97)	Normal (0,99)	Normal (0,92)	Normal (0,88)
USP14 probe 1736-L02051	18p	Normal (1,04)	Normal (1,06)	Normal (1,15)	Normal (1,14)
FLJ21172 probe 1758-L01292	18q	Normal (1,05)	Normal (1,02)	Normal (1,09)	Normal (1,1)
CDC34 probe 1737-L01313	19p	Normal (0,89)	Normal (0,87)	Normal (0,81)	Normal (0,77)
BC-2 probe 9143-L10626	19q	Normal (0,94)	Normal (0,98)	Normal (0,95)	Normal (0,97)
SOX12 probe 2396-L01844	20p	Normal (0,99)	Normal (1,01)	Normal (0,97)	Normal (0,89)
OPRL1 probe 2688-L02884	20q	Normal (0,9)	Normal (1,03)	Normal (0,88)	Normal (0,8)
RBM11 probe 1739-L01311	21p	Normal (1,02)	Normal (1,06)	Normal (1,05)	Normal (1,01)
HMT1 probe 2586-L02059	21q	Normal (0,94)	Normal (1,03)	Normal (0,98)	Normal (0,98)
BID probe 1740-L01310	22p	Normal (1,01)	Normal (0,98)	Normal (1,06)	Normal (1,07)
RABL2B probe 1762-L08761	22q	Normal (0,9)	Normal (0,98)	Normal (0,85)	Normal (0,88)
SHOX probe 1148-L01331	X/Yp	Normal (1,02)	Normal (1,01)	Normal (1,07)	Normal (1,06)
SYBL1 probe 1763-L02150	X/Yq	Normal (1)	Normal (0,97)	Normal (0,91)	Normal (0,9)

Detetou-se uma deleção na região subtelo mérica do braço curto do cromossoma 4 (região 4p16.3) na menina em estudo, esquematizada na Figura 19. A mesma deleção foi encontrada na irmã, (que também apresenta atraso geral de desenvolvimento psicomotor) e no pai (Tabela I).

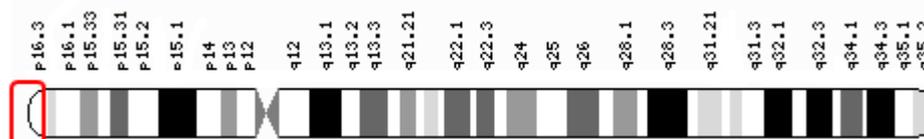


Figura 19: Ideograma do cromossoma 4 representando a região em deleção. Adaptado de [51].

Os rearranjos cromossômicos desequilibrados, particularmente os que envolvem as regiões subtelo méricas, têm demonstrado estar associados a défice cognitivo [52-54] presumivelmente devido às características estruturais das terminações dos cromossomas [55]. Estas regiões são ricas em genes e muito polimórficas, havendo assim uma maior suscetibilidade para rearranjos cromossômicos [55].

Sabe-se ainda que as deleções na região 4p16.3 podem incluir a região crítica da síndrome de Wolf-Hirschhorn [56]. Esta síndrome manifesta-se através de atraso de desenvolvimento psicomotor, convulsões e os indivíduos portadores apresentam determinadas características faciais [56]. Assim, para esclarecer se o fenótipo manifestado se relaciona com esta síndrome, recorreu-se a técnica de FISH utilizando uma sonda para a região crítica da síndrome de Wolf-Hirschhorn (*WHSCI*) (Figura 20), bem como uma sonda

para a região subteloamérica 4p (*locus* D4S3359) para confirmar o resultado obtido por MLPA (Figura 21).

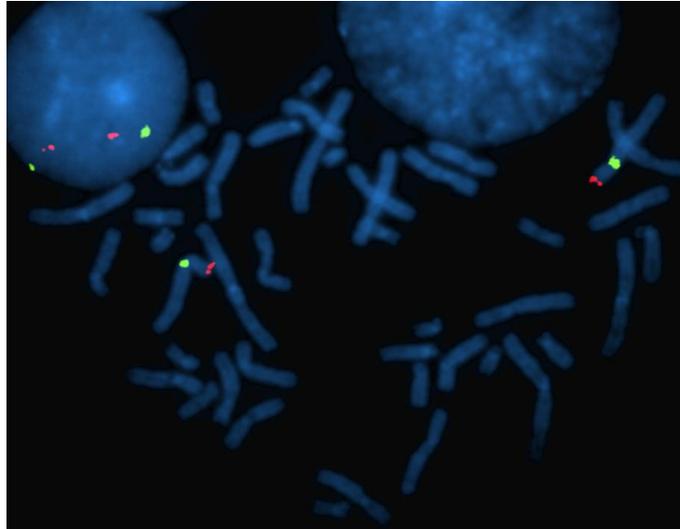


Figura 20: Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metafase com uso da técnica de FISH. Sonda de sequência única a vermelho para a região crítica da síndrome de Wolf- Hirschhorn (região 4p16.3). Sonda centromérica (região 4p11.2-q11.1) a verde como sonda controle. Ambas as sondas, para a região crítica (vermelho) e para a região controle (verde) mostram sinais normais de hibridização.

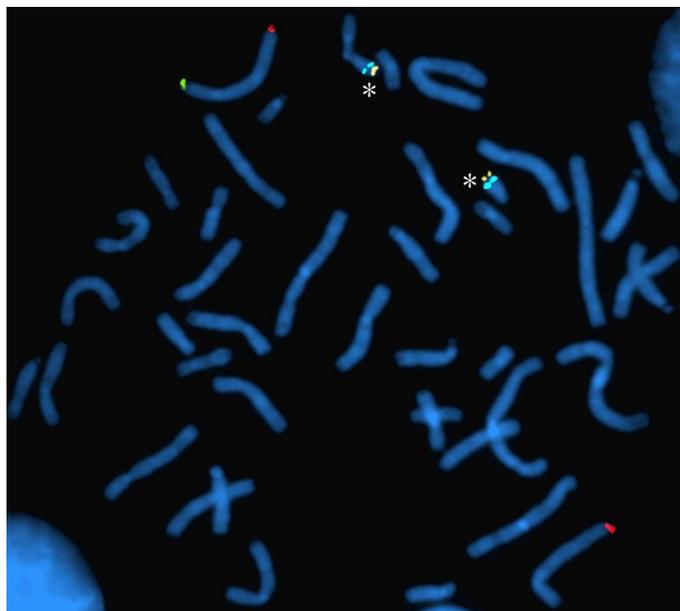


Figura 21: Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metafase com uso da técnica de FISH. Sonda telomérica a verde para o *locus* D4S3359 (região 4p16.3). Sonda telomérica a vermelho para a zona terminal do braço longo do cromossoma 4 (região 4q35.2) usada como controle. Combinadas com sonda a aqua para o cromossoma 21 (região 21q22.12) usada também como sonda controle *. Observa-se apenas um sinal a verde (região 4p16.3) em deleção num dos cromossomas).

A sonda para o *locus* D4S3359 confirmou a microdeleção em 4p encontrada por MLPA. No entanto, a sonda para a região crítica da síndrome de Wolf-Hirschhorn revelou um resultado normal, permitindo concluir que a deleção encontrada é distal a este *locus*.

Assim, a deleção na região terminal do braço curto do cromossoma 4 poderá ser responsável pelo fenótipo manifestado nas duas irmãs e terá sido herdada do pai, que provavelmente possui fenótipo associado.

Seria interessante estudar este caso por *array* CGH para redefinir com mais precisão o tamanho da deleção e os pontos de quebra e ainda verificar quais os genes envolvidos para assim conseguir estabelecer com maior rigor a relação entre o genótipo e o fenótipo manifestado. Seria também importante estudar o pai e os seus progenitores de modo a avaliar se a deleção observada tem origem familiar e consequentemente estabelecer a necessidade de estender o estudo a outros familiares. Posteriormente, estes resultados são explicados aos familiares em consulta de aconselhamento genético assim como é oferecida a possibilidade de DPN em futuras gestações.

4. CASO CLÍNICO 4

Menino de 14 anos com perturbação do espectro do autismo. Foi pedido estudo por MLPA para as regiões associadas ao autismo uma vez que existe um painel de sondas específico para estes estudos. Para salvaguardar a existência de rearranjos estruturais, deve ser feito o estudo do cariógrama.

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS

Procedeu-se à análise citogenética convencional para estudo do cariógrama a partir de cultura celular sincronizada de linfócitos, espalhamento de metafases e bandagem GTG. Utilizou-se a técnica de MLPA recorrendo ao painel de sondas (SALSA MLPA P-343) para deteção de alteração do normal número de cópias nas regiões associadas ao autismo. Confirmaram-se os resultados por FISH utilizando a sonda para o cromossoma 15, locus *UBE3A*.

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO

O estudo do cariótipo revelou um pequeno aumento da região proximal do braço longo do cromossoma 15 na região q11.2 (Figura 22).



Figura 22: Cariograma de um indivíduo do sexo masculino mostrando um cromossoma 15 com duplicação da região proximal. 46,XY,dup(15)(q11.2q11.2).

Efetuuou-se a técnica de MLPA para o caso em estudo juntamente com um controlo normal (Tabela 2) e após análise com *software* adequado obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 2: Resultados obtidos utilizando o painel de sondas P-343 após análise por *software* adequado.

Gene	Chr pos	Length (nt)	Criança Rácio	Controlo Rácio
SNRPN-HB2-85 probe 12718-L13906	15q11.2	214	Gain (1,43)	Normal (1,03)
SNRPN-HB2-85 probe 12720-L13795	15q11.2	475	Gain (1,36)	Normal (0,99)
UBE3A probe 01317-L00864	15q11.2	256	Gain (1,43)	Normal (1,06)
UBE3A probe 10886-L14677	15q11.2	244	Gain (1,47)	Normal (1,1)
UBE3A probe 10883-L11553	15q11.2	142	Gain (1,35)	Normal (1,07)
UBE3A probe 04620-L14668	15q11.2	160	Gain (1,46)	Normal (1,07)
UBE3A probe 10880-L11550	15q11.2	197	Gain (1,44)	Normal (1,09)
ATP10A probe 11165-L12883	15q12	270	Gain (1,41)	Normal (1,03)
ATP10A probe 12964-L14669	15q12	136	Gain (1,36)	Normal (0,9)
GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	220	Gain (1,5)	Normal (1,08)
GABRB3 probe 10875-L11545	15q12	292	Gain (1,45)	Normal (1,08)
GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	382	Gain (1,4)	Normal (1,08)
GABRB3 probe 10872-L11542	15q12	148	Gain (1,4)	Normal (1,03)
GABRB3 probe 10870-L11540	15q12	319	Gain (1,42)	Normal (1,02)
GABRB3 probe 10868-L11538	15q12	184	Gain (1,49)	Normal (1,05)
GABRB3 probe 10867-L11537	15q12	355	Gain (1,44)	Normal (1,05)
OCA2 probe 02040-L01553	15q13.1	436	Gain (1,39)	Normal (1,07)
OCA2 probe 02041-L03725	15q13.1	445	Gain (1,49)	Normal (1)
APBA2 probe 01314-L00867	15q13.1	202	Normal (0,96)	Normal (0,97)
NDNL2 probe 08377-L08231	15q13.1	178	Normal (0,99)	Normal (1,03)
TJP1 probe 08389-L14671	15q13.1	300	Normal (1,02)	Normal (1,06)
TRPM1 probe 08397-L14672	15q13.3	373	Normal (1)	Normal (1)
KLF13 probe 08376-L08230	15q13.3	166	Normal (0,96)	Normal (0,91)
CHRNA7 probe 12956-L08237	15q13.3	286	Normal (1,01)	Normal (1,07)
SCG5 probe 12954-L14464	15q13.3	492	Normal (1)	Normal (1,04)
SCG5 probe 12951-L14742	15q13.3	427	Normal (0,94)	Normal (1,03)
LAT probe 11677-L12448	16p11.2	481	Normal (1,01)	Normal (0,94)
SPN probe 11672-L12443	16p11.2	364	Normal (1,04)	Normal (0,95)
MAZ probe 11669-L12440	16p11.2	238	Normal (0,94)	Normal (0,92)
MAZ probe 11673-L12444	16p11.2	418	Normal (0,95)	Normal (0,93)
MVP probe 00550-L00372	16p11.2	346	Normal (0,98)	Normal (0,92)
SEZ6L2 probe 11668-L12439	16p11.2	208	Normal (1)	Normal (0,94)
HIRIP3 probe 11674-L12445	16p11.2	454	Normal (0,97)	Normal (0,97)
HIRIP3 probe 11667-L14670	16p11.2	172	Normal (1)	Normal (0,92)
DOC2A probe 13162-L12447	16p11.2	226	Normal (1)	Normal (0,89)
MAPK3 probe 11675-L12446	16p11.2	465	Normal (0,98)	Normal (0,91)
CD2BP2 probe 11671-L12442	16p11.2	337	Normal (1)	Normal (0,92)
SHANK3 probe 06784-L06376	22q13.33	309	Normal (1)	Normal (0,95)
SHANK3 probe 14190-L15800	22q13.33	391	Normal (0,95)	Normal (0,95)
SHANK3 probe 06787-L07383	22q13.33	232	Normal (0,98)	Normal (0,97)
Reference probe 10243-L02149	01q44	265	Normal (0,93)	Normal (1)
Reference probe 05297-L04685	03q11	328	Normal (0,94)	Normal (1,09)
Reference probe 07208-L06858	07p14	409	Normal (0,94)	Normal (0,93)
Reference probe 10218-L14675	07q22	500	Normal (0,96)	Normal (1,12)
Reference probe 09431-L09680	11q13	154	Normal (0,96)	Normal (0,95)
Reference probe 02658-L02125	11q23	250	Normal (0,99)	Normal (1,05)
Reference probe 09727-L10077	12q24	130	Normal (0,95)	Normal (0,93)
Reference probe 09176-L09350	17q11	124	Normal (0,99)	Normal (0,95)
Reference probe 09979-L10438	19p13	190	Normal (0,96)	Normal (0,98)

Verifica-se a presença uma duplicação no braço longo do cromossoma 15 na região 15q11.2.15q12 (esquematizado na Figura 23), sendo que este resultado corrobora o resultado observado no cariótipo.

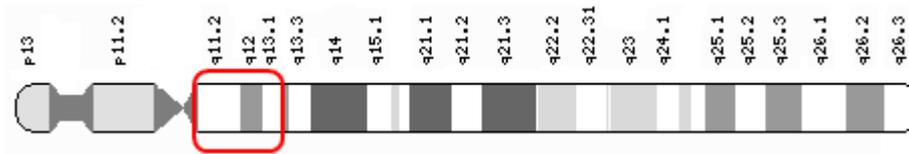


Figura 23: Ideograma do cromossoma 15 representando a região em duplicação. Adaptado de [51].

As regiões proximais dos cromossomas acrocêntricos, particularmente a região 15q11.2, estão frequentemente envolvidas em rearranjos estruturais [57]. O cromossoma 15 foi identificado como sendo rico em *low copy repeats* (LCR's) [58], que promovem uma recombinação homóloga não alélica durante a meiose I gerando pontos de quebra na região 15q11.2.q13 [59-62]. Além disso, tem sido demonstrado que as duplicações na região 15q11.q13 são as alterações mais comuns em indivíduos com autismo [63-66] e as CNVs nestas regiões contribuem significativamente para a etiologia das perturbações do espectro do autismo [64, 67].

Assim, pode concluir-se que a duplicação detetada é responsável pelo fenótipo observado. Para confirmar o resultado, aplicou-se a técnica de FISH (Figura 24) utilizando uma sonda específica para o *locus UBE3A* no cromossoma 15:

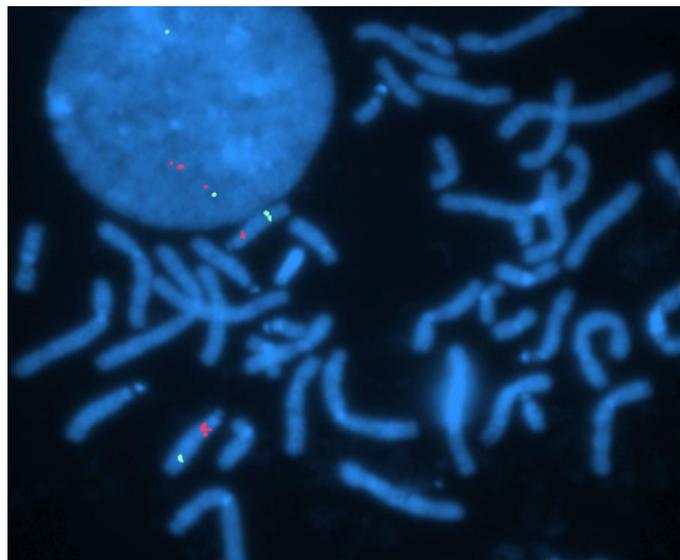


Figura 24: Observação ao microscópio de fluorescência de uma célula em metafase com uso da técnica de FISH. Sondas de sequência única a vermelho para o *locus UBE3A* (região 15q11.2) e a verde para a região controlo 15qter (15q26.3). As sondas controlo hibridizam normalmente, e a sonda para a região crítica (*locus UBE3A*) hibridiza duas vezes num dos cromossomas 15.

Observam-se ambos os cromossomas 15 com um sinais para a sonda controlo (verde) que hibridiza em 15q26.3 e serve para identificar não só o cromossoma alvo assim como providencia um controlo para o processo de hibridização. Um dos cromossomas 15

apresenta dois sinais para o *locus UBE3A* (vermelho), o que confirma a duplicação detetada por MLPA.

Sabe-se que a região 15q é rica em genes, sendo que a expressão de alguns desses genes é limitada ao sistema nervoso [68]. A origem parental das alterações pode influenciar o fenótipo [69], pois indivíduos com duplicações na região 15q11.2.q13 demonstram diferenças fenotípicas consoante a origem parental do cromossoma, sendo que alterações de origem materna estão associadas a um fenótipo mais severo [68]. Estes dados sugerem que a suscetibilidade para o autismo nesta região possa estar sujeito a *imprinting* [68].

O fenómeno de *imprinting* é um mecanismo epigenético em que um segmento de um cromossoma fica metilado (logo a expressão é impedida) de acordo com o sexo do progenitor de origem [3].

Estudou-se a mãe e um irmão do menino que apresentaram resultados normais para esta região. Contudo, não foi possível esclarecer se a alteração é *de novo* ou herdada, pois não foi possível o estudo do progenitor.

5. CASO CLÍNICO 5

Menina de 2 anos com atraso de crescimento, cardiopatia (comunicação intraventricular sub-aórtica, estenose pulmonar e canal arterial), macrocefalia relativa e hipoplasia das asas do nariz. Foi pedido estudo por aCGH de 180 K para esclarecimento das causas do fenótipo manifestado uma vez que apresenta várias anomalias congénitas e atraso de crescimento, o que pode ser indicativo de uma síndrome de microdeleção. Deve ser feito também estudo do cariógrama, para acautelar a presença de rearranjos estruturais.

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS

Procedeu-se ao estudo do cariógrama a partir de cultura celular sincronizada de linfócitos, espalhamento de metafases e bandagem GTG. Posteriormente, procedeu-se à análise por aCGH utilizando um *array* de oligonucleótidos de 180 K da *Agilent*. A leitura do slide foi feita utilizando um *scanner Agilent* e a análise foi feita recorrendo a *software* adequado. Recorreu-se a MLPA para confirmar resultados, utilizando para isso o painel para síndromes de microdeleção (MLPA SALSA P297-B1).

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO

Através de citogenética convencional encontrou-se uma deleção no braço longo do cromossoma 2 na região q32 (Figura 25):



Figura 25: Cariograma de um indivíduo do sexo feminino mostrando uma deleção intersticial no braço longo do cromossoma 2. 46,XX,del(2)(q32.1-q32.3).

O caso foi estudado por *Array CGH* para delimitar a região em deleção identificando as posições nucleotídicas que a flanqueiam. Após a análise dos resultados confirmou-se a deleção no braço longo do cromossoma 2 com aproximadamente 7 Mb (Figura 26):

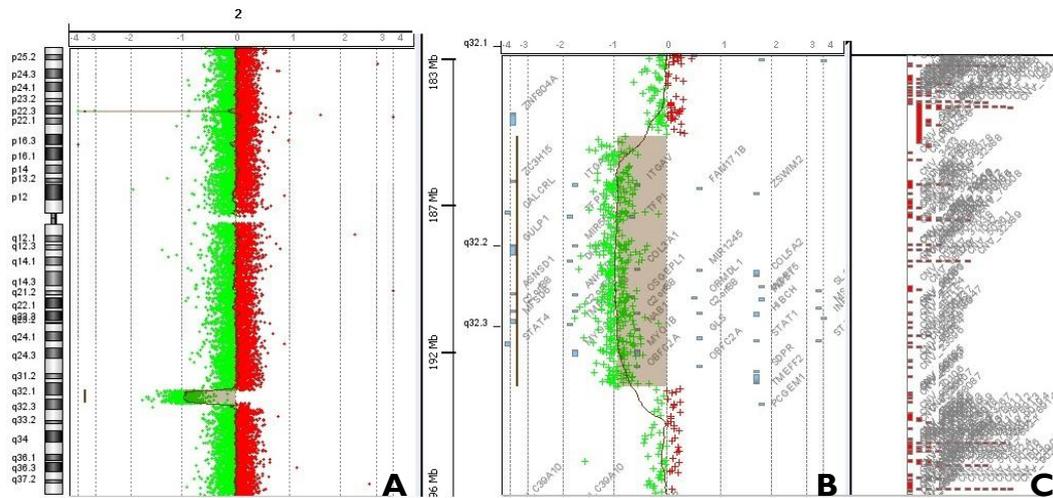


Figura 26: Perfil do cromossoma 2 obtido por aCGH.
A – deleção em 2q32.1q23.3;
B – genes envolvidos na deleção;
C – perfil de CNV's.

Foi adicionalmente identificada uma alteração inesperada: uma deleção no braço curto do cromossoma 20 entre a região p12.2 e p12.3 com aproximadamente 4Mb (Figura 27):

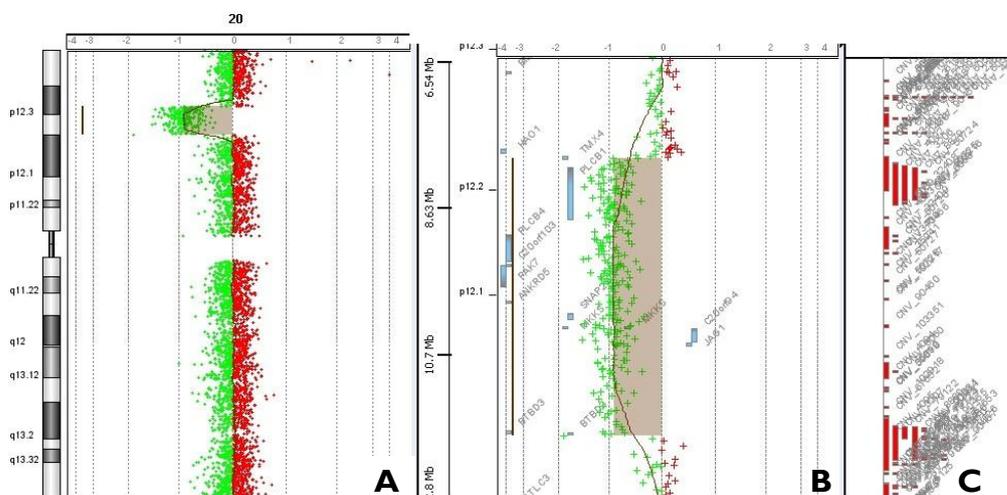


Figura 27: Perfil do cromossoma 20 obtido por aCGH.
A – deleção em 2q32.1q23.3;
B – genes envolvidos na deleção;
C – perfil de CNV's.

Verificaram-se os genes envolvidos nas alterações encontradas no cromossoma 2 na região 2q32.1q32.3 e no cromossoma 20 na região p12.2p12.3, que podem ser responsáveis pelo fenótipo manifestado. Deu-se especial importância aos genes patogénicos (reportados na base de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* - OMIM), e a que fenótipo estão normalmente associados (Tabela 3). Deste modo, verificou-se o seguinte para os cromossomas 2 e 20:

Tabela 3: Genes patogênicos (OMIM) com o respectivo fenótipo nos cromossomas 2 e 20, que se encontram em deleção no caso clínico apresentado.

Cromossoma	Gene	Fenótipo
Cromossoma 2	COL3A1	Síndrome Ehlers-Danlos tipo III (hipermobilidade): prolapso da válvula mitral; pele mole e hiperextensível; relaxamento das articulações
		Síndrome Ehlers-Danlos tipo IV (vascular): estatura baixa, lábios finos orelhas sem lóbulos, nariz pequeno; prolapso da válvula mitral, aneurisma intracraniano, pneumotórax espontâneo, hemoptise; prolapso uterino; prolapso da bexiga; hiper mobilidade das articulações interfalangeais distais; pele frágil,
	COL5A2	Síndrome Ehlers-Danlos tipo I (severo): estatura baixa, maxilar estreito, prolapso válvula mitral, dilatação da base da aorta, hipotonia na infância, hiper mobilidade das articulações
	SLC40A1	Hemocromatose tipo IV: deficiência em ferroportina
	GDF8	Hipertrofia muscular
	HIBCH	Deficiência em 3-hidroxisobutil-CoA hidrolase: tetralogia de Fallot (estenose pulmonar; aorta deslocada; defeito do septo ventricular; hipertrofia do ventrículo direito), face dimórfica, anomalias nas vertebrae
	STAT4	Susceptibilidade para o lupus eritematoso sistémico
STAT1	Susceptibilidade para infeções por micobacterias e virais	
Cromossoma 20	PLCB1	Encefalopatia epilética na infância: convulsões
	PLCB4	Síndrome auriculocondilar: macrocefalia, cara redonda, bochechas proeminentes, fenda auricular, fenda do palato, dificuldades de mastigação e da fala, hipoplasia do côndilo mandibular
	MKKS	Síndrome Bardet-Bied 6: obesidade, hipertrofia ventricular esquerda, defeitos cardíacos congénitos, hipertensão, fibrose hepática, anomalias renais, polidactilia, atraso de desenvolvimento
		Síndrome McKusic-Kaufman: doença cardíaca congénita, hipoplasia dos pulmões
	JAG1	Surdez, defeitos cardíacos congénitos, tetralogia de Fallot
Síndrome Alagille: anomalias faciais, nariz longo com a ponta bulbosa, estenose da artéria pulmonar, defeito do septo atrial, defeito do septo ventricular, tetralogia de Fallot, contração da aorta, colestase, doença hepática, insuficiência pancreática, rins pequenos		

Na literatura, as deleções reportadas na região 2q32 são mais abrangentes (2q31.22q32.3) que a deleção encontrada na menina, e manifestam-se como atraso de desenvolvimento psicomotor, dismorfismos faciais, hérnia inguinal, dificuldades na alimentação, micrognatia [70-74]. Contudo, a menina apresenta um fenótipo menos severo do que seria de esperar, manifestando principalmente alterações relacionadas com a deleção 20p12, nomeadamente com a síndrome de Alagille, mas apenas a nível cardíaco. A síndrome de Alagille pode afetar o fígado, coração, esqueleto, olhos, rins, e sistema nervoso central e podendo também manifestar-se através de características faciais. A doença cardíaca congénita pode ser a única manifestação desta síndrome e pode apresentar-se como tetralogia de Fallot e/ou outras malformações, como defeito no septo ventricular, defeito no septo atrial, estenose da aorta [75], consistentes com o fenótipo da menina.

O uso da técnica de aCGH revelou-se crucial dado que, além de definir os pontos de quebra, permitiu a descoberta da deleção no braço curto do cromossoma 20 na região p12, que se mostrou ser responsável pelo fenótipo da criança. Caso não tivesse sido utilizada, não se iria conseguir estabelecer uma relação entre o genótipo e o fenótipo, ou o fenótipo seria associado apenas com a região 2q32.

Para esclarecer se as alterações encontradas na criança são *de novo* ou herdadas estudaram-se os progenitores. Recorrendo à citogenética convencional verificou-se que ambos os progenitores são normais, não apresentando a deleção no cromossoma 2. Para estudar a deleção no cromossoma 20 recorreu-se à técnica MLPA (*kit* para as síndromes de microdeleção) o que foi útil também para confirmar o resultado do aCGH (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados obtidos utilizando o painel de sondas P-297 após análise por software adequado.

Gene	Chr pos	Length (nt)	Mãe	Pai	Criança
			Rácio	Rácio	Rácio
PDE4DIP probe 05712-L05712	01q21.1	130	Normal (0,91)	Normal (1,04)	Normal (1,02)
HFE2 probe 08387-L08241	01q21.1	274	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (1)
PEX11B probe 08398-L08252	01q21.1	382	Normal (0,94)	Normal (1,03)	Normal (0,96)
PEX11B probe 08405-L08259	01q21.1	454	Normal (1,09)	Normal (0,95)	Normal (1,08)
CD160 probe 08373-L08227	01q21.1	142	Normal (0,99)	Normal (0,96)	Normal (0,89)
PRKAB2 probe 12949-L14104	01q21.1	319	Normal (1,06)	Normal (1,06)	Normal (1,07)
FMO5 probe 12944-L14099	01q21.1	220	Normal (0,92)	Normal (1)	Normal (0,95)
BCL9 probe 12945-L14100	01q21.1	250	Normal (1)	Normal (0,99)	Normal (1,08)
ACP6 probe 13163-L14105	01q21.1	472	Normal (0,97)	Normal (1,01)	Normal (1,04)
GJA5 probe 12946-L14101	01q21.1	256	Normal (0,99)	Normal (0,95)	Normal (0,99)
GJA8 probe 12948-L14103	01q21.1	283	Normal (1,11)	Normal (1)	Normal (0,96)
PAK2 probe 08378-L08232	03q29	184	Normal (1,07)	Normal (1,09)	Normal (1,02)
DLG1 probe 08374-L08228	03q29	136	Normal (1,03)	Normal (0,97)	Normal (1,08)
CNTNAP2 probe 12947-L14102	07q36.1	265	Normal (0,99)	Normal (1,02)	Normal (1,02)
CNTNAP2 probe 12953-L14108	07q36.1	436	Normal (0,99)	Normal (1)	Normal (1,03)
C12orf11 probe 12941-L14450	12p11.23	154	Normal (1,02)	Normal (1,02)	Normal (0,97)
PPFIBP1 probe 12943-L14461	12p11.23	172	Normal (1,04)	Normal (1)	Normal (1)
TJP1 probe 08399-L14456	15q13.1	400	Normal (0,92)	Normal (0,96)	Normal (0,93)
TJP1 probe 08389-L14453	15q13.1	296	Normal (0,93)	Normal (0,91)	Normal (0,87)
MTMR15 probe S0356-L13236	15q13.2	119	Normal (1,01)	Normal (1,13)	Normal (1,08)
MTMR15 probe S0357-L13235	15q13.2	114	Normal (0,97)	Normal (1,04)	Normal (1,08)
TRPM1 probe 08397-L08251	15q13.3	373	Normal (1,08)	Normal (0,94)	Normal (1,01)
TRPM1 probe 08404-L08258	15q13.3	445	Normal (0,92)	Normal (0,96)	Normal (1,09)

KLF13 probe 08376-L08230	15q13.3	166	Normal (0,93)	Normal (0,96)	Normal (0,98)
CHRNA7 probe 12956-L14452	15q13.3	289	Normal (0,93)	Normal (0,93)	Normal (1,03)
SCG5 probe 12954-L14464	15q13.3	493	Normal (0,96)	Normal (1)	Normal (1)
SCG5 probe 12951-L14106	15q13.3	418	Normal (1,15)	Normal (1,06)	Normal (0,99)
PML probe 06253-L05759	15q24.1	463	Normal (1,19)	Normal (1,11)	Normal (1,03)
PML probe 06258-L09341	15q24.1	481	Normal (1,08)	Normal (0,98)	Normal (0,93)
PALB2 probe 07504-L07166	16p12.1	337	Normal (1,11)	Normal (1,03)	Normal (1,04)
PALB2 probe 07496-L06744	16p12.1	409	Normal (1)	Normal (1,05)	Normal (0,97)
PALB2 probe 07495-L07157	16p12.1	355	Normal (0,87)	Normal (0,95)	Normal (1,02)
IL21R probe 03332-L02719	16p11.2	328	Normal (0,94)	Normal (0,99)	Normal (0,9)
IL21R probe 03333-L02720	16p11.2	196	Normal (1,14)	Normal (0,96)	Normal (1,03)
MAZ probe 11669-L12980	16p11.2	244	Normal (1,06)	Normal (0,97)	Normal (1,1)
MVP probe 00550-L00372	16p11.2	346	Normal (0,94)	Normal (0,9)	Normal (0,94)
HIRIP3 probe 11667-L14462	16p11.2	178	Normal (1,11)	Normal (0,99)	Normal (0,96)
DOC2A probe 13162-L12447	16p11.2	226	Normal (1,1)	Normal (0,98)	Normal (0,94)
MAPK3 probe 11670-L14454	16p11.2	303	Normal (1,09)	Normal (1)	Normal (0,9)
LHX1 probe 08396-L08250	17q12	364	Normal (0,96)	Normal (0,95)	Normal (1)
AATF probe 08381-L12887	17q12	208	Normal (0,92)	Normal (1,01)	Normal (0,97)
AATF probe 08372-L08226	17q12	148	Normal (1)	Normal (0,99)	Normal (1)
HNF1B probe 08969-L09065	17q12	202	Normal (1,13)	Normal (1,15)	Normal (1,06)
HNF1B probe 08968-L14455	17q12	309	Normal (1,08)	Normal (1,04)	Normal (1)
HNF1B probe 07700-L07459	17q12	238	Normal (0,91)	Normal (0,94)	Normal (0,97)
HNF1B probe 07699-L12885	17q12	161	Normal (0,97)	Normal (1,01)	Normal (0,96)
TCF4 probe 12522-L13572	18q21.2	391	Normal (1,01)	Normal (1,14)	Normal (1,1)
TCF4 probe 12506-L14451	18q21.2	214	Normal (1,08)	Normal (1,12)	Normal (1,02)
PAK7 probe 12942-L14463	20p12.2	190	Normal (0,95)	Normal (0,9)	LOH (0,45)
PAK7 probe 12952-L14107	20p12.2	427	Normal (1,01)	Normal (1,02)	LOH (0,56)

Os resultados de MLPA confirmam a deleção na região 20p12.2 na criança, e pode-se concluir que a deleção é *de novo*, dado que nenhum dos progenitores é portador. Testando os pais, o cariótipo revelou-se normal, todavia existe a possibilidade de mosaïcismo gonadal, pelo que, apesar do baixo risco de recorrência, em futuras gestações é oferecido DPN ao casal.

C. Discussão geral e Conclusões

A correta caracterização das alterações cromossômicas é crucial para estabelecer uma adequada correlação entre o genótipo e o fenótipo. Isto é possível graças ao estudo dos cromossomas, do uso de técnicas de biologia molecular, e da análise de casos clínicos reportados na literatura com características semelhantes, bem como da consulta de bases de dados. Se a alteração já foi reportada antes num indivíduo com o mesmo fenótipo ou se uma microdeleção/microduplicação é frequentemente associada a um fenótipo bem definido, a relação causal fica estabelecida [39]. No entanto, a relação entre o genótipo e o fenótipo nem sempre é tão linear, principalmente com o uso de novas tecnologias como o aCGH que devido à sua abrangência e sensibilidade levantam variados problemas de interpretação de resultados. É pois necessária uma articulação entre as técnicas disponíveis de forma a obter resultados fidedignos e que as técnicas tenham uma relação custo-benefício adequada. Assim é crucial um conhecimento de base sobre as técnicas, das suas sensibilidades e especificidades. No quadro resumo seguinte (Tabela 5) são abordadas as técnicas utilizadas e é feita uma comparação entre as suas principais vantagens/desvantagens.

Tabela 5: Comparação entre as vantagens/desvantagens das técnicas utilizadas.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Citogenética convencional	Deteta: <ul style="list-style-type: none">▪ Aneuploidias▪ Rearranjos equilibrados▪ Euploidias▪ Mosaicismo Boa relação custo-benefício	Requer células em divisão celular ativa Resolução limitada (entre 3 - 5 Mb) Depende da experiência do técnico
FISH	Deteta: <ul style="list-style-type: none">▪ Aneuploidias▪ Rearranjos equilibrados▪ Euploidias▪ Mosaicismo Pode ser aplicado em interfase ou metafase Visualização <i>in situ</i> das alterações Identificação da origem de cromossomas marcadores	Número limitado de sondas Técnica dirigida Custo elevado

MLPA	Sensível Deteta alterações do número de cópias (deleções/duplicações) Várias amostras numa só amostragem Boa relação custo-benefício	Não deteta rearranjos estruturais equilibrados Técnica dirigida Não deteta mosaicismo de baixa expressão Resultados anómalos motivados por SNPs no local de hibridização ou regiões de CNVs
aCGH	Muito sensível Deteta alterações do número de cópias (deleções / duplicações) Análise de todo o genoma	Não deteta rearranjos estruturais equilibrados Não deteta mosaicismo de baixa expressão Custos elevados Dificuldades de interpretação

Assim, a utilização das técnicas é pensada tendo em conta o objetivo do estudo. A citogenética convencional é uma abordagem recomendada, pois permite analisar a constituição cromossómica dos pacientes. Além disso, as técnicas de citogenética (convencional e FISH) são as únicas que permitem detetar rearranjos equilibrados.

Tendo em conta o fenótipo do paciente, podem também fazer-se estudos dirigidos utilizando diferentes painéis de sondas de MLPA específicos para vários síndromes de microdeleção, regiões subteloméricas, autismo, entre outras, permitindo assim um diagnóstico rápido e barato, que deverá depois ser confirmado por outra técnica, como FISH por exemplo. O MLPA é também usualmente utilizado para confirmar um resultado obtido por aCGH.

O aCGH é indicado como teste de primeira linha em casos de défice cognitivo ou atraso de desenvolvimento psicomotor fornecendo uma grande amplitude de dados que por vezes tornam difícil a sua interpretação.

Através de aCGH é feita uma análise de todo o genoma, com alta resolução, tornando-se especialmente relevante para o diagnóstico de pacientes sem alterações cromossómicas visíveis ou com rearranjos estruturais aparentemente equilibrados [39]. A aplicação desta tecnologia permitiu também mostrar que a variabilidade genética entre indivíduos é significativa. Os genomas de indivíduos sem laços familiares podem variar significativamente, não na sequência de DNA, mas sim no número de cópias de cada sequência de DNA [76, 77]. Estas CNVs causam dificuldades de interpretação, pois pensava-se que tal como na citogenética convencional, em que existe um modelo *standard* de cariótipo, também existiria

um modelo *standard* de genoma para identificar alterações que poderiam estar implicadas na etiologia de cada doença [78]. Assim, é importante classificar as CNVs como benignas, patogénicas ou VOUS e deve verificar-se se as CNVs encontradas são herdadas ou *de novo*, pois se forem herdadas de indivíduos fenotipicamente normais, provavelmente a CNV é clinicamente insignificante. Ainda assim, deve ter-se em conta a possibilidade de mosaicismo, penetrância incompleta entre outras situações.

As CNVs *de novo* devem ser comparadas com CNVs identificadas em doentes e em pessoas saudáveis listadas em bases de dados adequadas, sendo que CNVs não reportadas na *Database of Genomic Variants* (DGV) devem ser referenciadas como patogénicas [78]. Também o tamanho da CNV deve ser tido em conta na determinação da etiologia da doença, no entanto, a relevância clínica de uma CNV relaciona-se principalmente com número de genes envolvidos, especialmente para os genes OMIM, se forem conhecidos como importantes para o desenvolvimento e/ou se têm efeito de dosagem associado [78].

A disponibilização de informação nas diferentes bases de dados facilita a comparação de resultados de aCGH de indivíduos com alterações cromossómicas, possibilitando não só estabelecer a relação genótipo-fenótipo como eventualmente delinear novas síndromes. Ainda assim, serão necessários mais estudos para melhor caracterizar CNVs e elaborar mapas de variação genética mais abrangentes.

Assim, a aplicação de aCGH no diagnóstico de défice cognitivo e anomalias congénitas permitiu ultrapassar as limitações da citogenética convencional, sem no entanto ser possível abdicar da mesma dada a sua importância para uma análise cromossómica completa. Além disso, a citogenética convencional está disponível há várias décadas sendo uma técnica uniformizada com um sistema de nomenclatura internacional, enquanto que o aCGH é mais divergente nas técnicas utilizadas, na cobertura genómica e na interpretação de resultados [44].

RISCO DE RECORRÊNCIA

A determinação do risco de recorrência requer uma história familiar detalhada, com elaboração de um heredograma completo e um diagnóstico preciso. O risco de recorrência pretende representar a probabilidade de uma determinada condição voltar a ocorrer numa próxima gestação do mesmo casal ou dentro de uma mesma família [3]. Quando uma criança possui alterações cromossómicas associadas a fenótipo anormal deve ser feito o estudo dos pais para verificar se a alteração é herdada ou *de novo*. Os rearranjos *de novo* podem ocorrer na mitose pré-meiótica, na meiose ou na mitose pós-zigótica, sendo que a maioria dos casos

de novo tem origem na meiose. Se o rearranjo ocorre na meiose ou na mitose pós-zigótica, geralmente assume-se um risco de recorrência comum à população em geral. Contudo se o rearranjo ocorre na mitose pré-meiótica, pode haver mosaicismismo gonadal de um dos progenitores e aumenta o risco de recorrência. No entanto, é difícil estabelecer o mosaicismismo gonadal como causa antes de ocorrer um segundo nascimento com a mesma alteração [3]. Em todo o caso, é oferecido DPN em gestações futuras. Nos casos em que a alteração é herdada o risco de recorrência é muito superior, e devem estudar-se outros familiares de forma a perceber se existem mais portadores da alteração e conseqüentemente providenciar aconselhamento genético também aos familiares.

Nos casos de doenças ligadas ao cromossoma X, como a síndrome de X-Frágil, o aconselhamento genético é feito sobretudo para identificar as portadoras de alelos pré-mutados que podem transmitir a doença à descendência. No caso de mulheres portadoras de pré-mutação têm 50% de hipóteses de transmitir o alelo pré-mutado à descendência, o qual pode ou não expandir para mutação completa. Os homens portadores do alelo pré-mutado podem transmiti-lo às suas filhas mas sem risco de manifestarem a doença, uma vez que só a transmissão materna é responsável por expansões dos alelos pré-mutados e conseqüentemente pelo fenótipo na descendência. As portadoras de mutação completa têm 50% de hipóteses de transmitir o alelo mutado à descendência e portanto os filhos que o receberem terão síndrome de X-Frágil. Além disso, devem fazer-se estudos familiares para efeitos de aconselhamento genético [3].

NOVAS TECNOLOGIAS

Outros métodos de genética molecular recentemente desenvolvidos providenciaram novas ferramentas para caracterizar com precisão rearranjos cromossómicos e descobrir a grande complexidade do genoma humano.

Desde o desenvolvimento da *next generation sequencing* em 2005, a sequenciação de um genoma inteiro pode ser conseguida em poucos dias. A sequenciação de todo o genoma pode revelar mutações pontuais e todos os tipos de rearranjos cromossómicos, incluindo rearranjos equilibrados e pode ser utilizada para reconstruir a arquitetura do genoma, pelo que a *next generation sequencing* se tornou uma alternativa aliciante aos testes baseados em *array* no campo da citogenética molecular [40].

Com o aumento da resolução dos métodos atuais e do grande número de variantes estruturais encontradas em cada genoma, o desafio agora é inferir o seu impacto na variação normal e/ou no fenótipo dos indivíduos estudados [40].

O desenvolvimento de diferentes tecnologias possibilitou o desenvolvimento da citogenética molecular e genômica, providenciando ao clínico um melhor diagnóstico dos seus pacientes, bem como a oferta de aconselhamento genético aos familiares. Dada a complexidade do genoma humano, torna-se desafiante a interpretação de resultados e o estabelecimento de causalidade entre o genótipo e o fenótipo. Além do desenvolvimento tecnológico, é muito importante entender a estrutura e a dinâmica do próprio genoma para que no futuro se possam ultrapassar os obstáculos na interpretação de resultados e estabelecer indubitavelmente a relação genótipo-fenótipo.

IV - Hematologia e Hemostase

A. Generalidades

A Hematologia é uma das áreas das Análises Clínicas mais vasta que se prende essencialmente com o estudo das células sanguíneas e das suas patologias.

As células sanguíneas formam-se na medula óssea, a partir de células precursoras hematopoiéticas sob a influência de diferentes fatores de crescimento. Podem dividir-se em três grupos principais: a série vermelha, composta pelos eritrócitos; a série branca composta por vários tipos de leucócitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos); e as plaquetas sanguíneas.

O estudo das células sanguíneas pode dar informações importantes acerca do bom funcionamento dos órgãos de origem ou de degradação das mesmas [79].

ERITRÓCITOS

Diariamente formam-se cerca de 10^{12} novos eritrócitos num processo complexo e rigorosamente regulado denominado eritropoiese. Este processo é regulado pela eritropoetina, uma hormona produzida no rim, que estimula a eritropoiese aumentando o número de células progenitoras dos eritrócitos. São necessários também outros elementos para uma eritropoiese eficaz, destacando-se o ferro, vitaminas (vitamina B12, folato, vitamina C, vitamina B6, tiamina, riboflavina) e hormonas como androgénios e T4. Deficiências em qualquer um destes fatores podem causar quadros de anemia [80].

A principal função dos eritrócitos é transportar O_2 aos tecidos e remover CO_2 para os pulmões, e o que permite a existência destas trocas gasosas é a hemoglobina. A molécula de hemoglobina A (hemoglobina normalmente presente em maior quantidade no adulto) é composta por quatro cadeias globínicas ($\alpha_2\beta_2$) cada uma delas contendo um grupo heme. O grupo heme, por sua vez, é composto por uma protoporfirina combinada com átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). Além da hemoglobina A podem ser encontradas no adulto, em menor quantidade, mais dois tipos de hemoglobina: a hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$) e a hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$) [80].

De forma a garantir as trocas gasosas de forma eficaz, o eritrócito tem de ser capaz de: passar repetidamente pela microcirculação, de manter a hemoglobina no estado ferroso, e de manter o equilíbrio osmótico. Assim, para garantir estas funções, o eritrócito assume a

forma de disco bicôncavo flexível com capacidade para gerar energia de trabalho sob a forma de ATP e energia redutora sob a forma de NADH e NADPH [80].

Uma das situações mais frequentes na clínica é a anemia, que se traduz pela diminuição da concentração de hemoglobina, e está normalmente acompanhada da diminuição do número de eritrócitos [79]. Esta pode ter varias causas, como por exemplo défices alimentares de Fe (anemia microcítica) ou vitamina B12 (anemia macrocítica), por perda (hemorragias) ou causa hemolítica. Para distinguir estes diferentes tipos de anemia é necessário ter em conta além do hemograma e esfregaço sanguíneo outros parâmetros como por exemplo o Fe sérico, bilirrubina (total e direta) e urobilinogénio. É aconselhável fazer a contagem de reticulócitos, dado que em situações de anemia estes tendem a aumentar em resposta ao estímulo da eritropoiese. Caso os reticulócitos se encontrem diminuídos é sugestivo de disfunção medular ou eritropoiese ineficiente. Por outro lado, deve ter-se em conta o número de leucócitos e de plaquetas, para distinguir uma situação de anemia de uma pancitopenia [80].

LEUCÓCITOS

A principal função dos leucócitos é defender o organismo de agentes estranhos e microrganismos capazes de originar infeções [80].

Os granulócitos e os monócitos são formados na medula óssea a partir das mesmas células precursoras, contudo, através da influência de diferentes fatores de crescimento.

Os monócitos passam pouco tempo na corrente sanguínea, em vez disso, dirigem-se para os tecidos onde exercem as suas principais funções como macrófagos [80]. A principal função destas células é a fagocitose [79].

Os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) designam-se assim devido à presença de grânulos no citoplasma, estes grânulos têm composição diferente consoante o tipo de célula. Os neutrófilos apresentam uma granulação mais fina, composta por grânulos acidófilos e apresentam o núcleo lobulado. Os eosinófilos apresentam uma granulação característica alaranjada, e possuem um papel importante nas infeções por parasitas. Já os basófilos apresentam uma granulação escura e grosseira, devido à presença de grânulos de histamina e heparina. Nos tecidos passam a designar-se mastócitos e desempenham um papel fundamental na reação alérgica [79].

Outro tipo de leucócitos são os linfócitos, células imunologicamente competentes capazes de gerar especificidade antigénica e memória imunológica. Estas células formam-se a partir de um precursor diferente dos outros leucócitos, e podem amadurecer na medula

óssea (linfócitos B) ou no timo (linfócitos T), exercendo funções diferentes consoante o local de amadurecimento [80].

PLAQUETAS

A principal função das plaquetas é a formação de coágulos durante a resposta hemostática normal a uma lesão nos vasos sanguíneos [80].

As plaquetas são produzidas na medula óssea pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, sendo que cada megacariócito origina entre 1000 a 5000 plaquetas. A síntese de plaquetas é regulada pela trombopoietina, hormona produzida no fígado, que induz a maturação dos megacariócitos [80].

A estrutura das plaquetas permite executar as funções de adesão e agregação, nomeadamente devido à presença de glicoproteínas na sua superfície. Estão também presentes numerosos grânulos contendo inúmeras substâncias importantes para a hemóstase sanguínea [80].

HEMÓSTASE

A hemóstase é o conjunto de mecanismos responsáveis pela manutenção do fluxo sanguíneo, pelo controlo da hemorragia através da formação de coágulos na zona lesada e assegura a dissolução do coágulo após a cicatrização do vaso sanguíneo [81]. O processo da coagulação envolve um sistema biológico de amplificação em que poucas substâncias ativam uma cascata de proteínas precursoras em circulação, o que culmina com a formação de trombina que por sua vez converte o fibrinogénio em fibrina (Figura 28) [80].

A fibrina liga-se ao agregado plaquetar no local do dano vascular formando um coágulo estável. No entanto, após a formação do coágulo é necessário reverter este processo através do sistema fibrinolítico. Assim, é muito importante a interação entre fatores pró-coagulantes e anticoagulantes, de forma a controlar a hemorragia, mas mantendo o coágulo apenas no local do dano vascular [80].

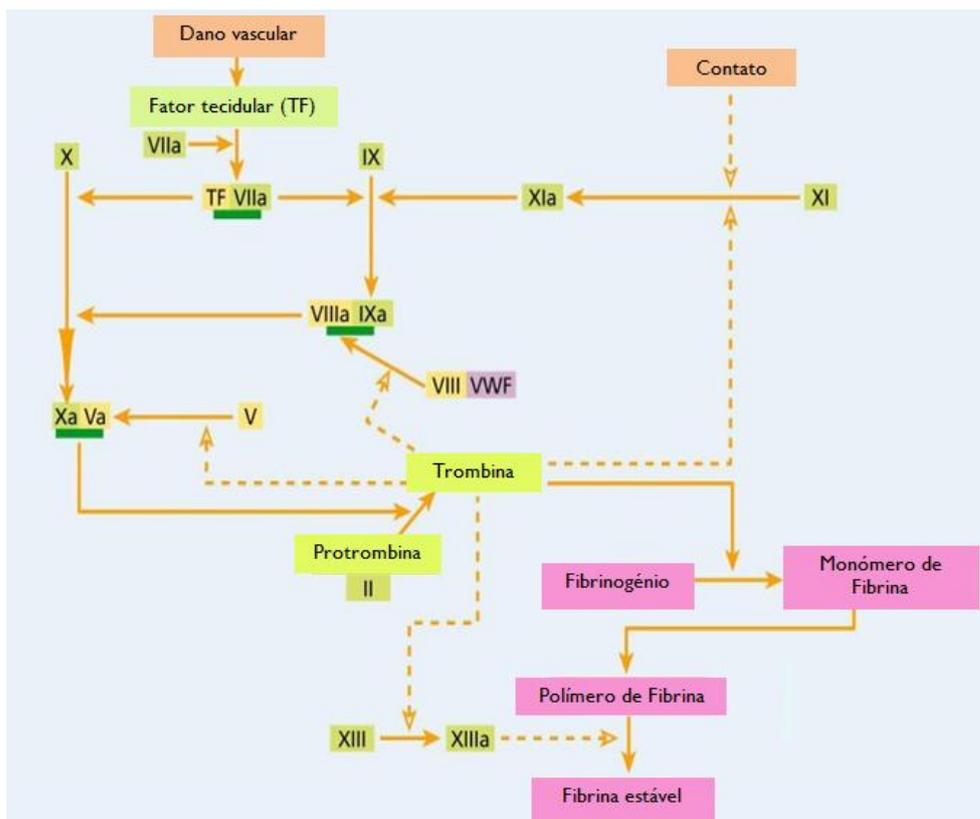


Figura 28: Esquema representativo da cascata da coagulação. O fator tecidual (TF) presente na superfície das células liga-se ao fator VII presente na corrente sanguínea. Este complexo ativa os fatores X e IX. Por sua vez, o complexo VIII-IXa amplifica a produção de Xa. A formação de trombina a partir de protrombina pela ação do complexo Xa-Va leva à formação de fibrina. A trombina ativa também os fatores XI, V e XIII (linhas a tracejado) e separa o fator VIII do seu transportador, o fator de von Willebrand, aumentando assim a formação do complexo VIIIa-IXa e por isso também do complexo Xa-Va. Adaptado de Hoffbrand, A.; Moss, P. [80].

B. Exames Laboratoriais utilizados em Hematologia

I. HEMOGRAMA

O hemograma é um dos testes mais pedidos na rotina laboratorial, dado que as alterações encontradas podem ser o primeiro indício da presença de distúrbios hematológicos [82]. Este teste é utilizado na contagem diferencial das diferentes células sanguíneas e na medição de vários índices hematológicos. Para caracterizar a série vermelha são efetuados os seguintes testes: contagem de eritrócitos, determinação da concentração de hemoglobina, hematócrito, volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), e a RDW (*red cell distribution width*) [81]. Para caracterizar a série branca é feita a contagem total e diferencial dos leucócitos. É feita também a contagem das plaquetas sanguíneas bem como a determinação do volume plaquetar médio [81].

A amostra utilizada é sangue total e deve ser colhida em EDTA. O hemograma é então realizado num contador automático que avalia os vários parâmetros através de diferentes técnicas: impedância para as contagens celulares; método ótico para o doseamento de hemoglobina; e VCS (volume, condutividade e laser) para a contagem diferencial de leucócitos [81].

O método da impedância, desenvolvido por Wallace Coulter em 1956, baseia-se no facto das células serem fracos condutores da corrente eléctrica enquanto que alguns diluentes são bons condutores. O sangue é diluído numa solução adequada e as células são forçadas a passar numa pequena abertura, ocupando assim o espaço do diluente e aumentando a resistência eléctrica. Ocorre uma diferença de potencial que pode ser medida e é proporcional ao tamanho da célula que passa na abertura.

A contagem diferencial dos leucócitos é feita no sangue total. Num compartimento após a lise de todas as células, é doseada a hemoglobina e são contados os núcleos para determinar o número total de leucócitos. Noutro compartimento, é feita a forma leucocitária conforme a estrutura da membrana celular e o tamanho da célula [81].

Na interpretação do hemograma há que ter em conta alguns parâmetros mais relevantes como a concentração de hemoglobina, que pode indiciar a presença de anemia, assim como o VGM que permite classificar o tipo de anemia. É também importante estar atento ao número de leucócitos e de plaquetas [82].

2. ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Quando são encontradas alterações no hemograma, como por exemplo anemias, leucopenia ou leucocitose, trombocitopenia ou trombocitose, entre outras situações, é feito um esfregaço sanguíneo para observação das células ao microscópio (Figura 29).

A técnica de coloração utilizada é a de May-Grünwald-Giema e consiste na fixação do esfregaço com metanol seguida de coloração com May-Grünwald e com Giema, após lavagem e secagem, podem observar-se as lâminas ao microscópio [81].

A observação do esfregaço permite visualizar as características morfológicas das células, como tamanho, cor, forma, o que no caso dos eritrócitos permite caracterizar melhor as anemias nomeadamente parâmetros não observáveis através do hemograma como por exemplo a presença de anisocitose (diferentes tamanhos) e a presença poiquilocitose (diferentes formas) [80]. No caso dos leucócitos é possível detetar algumas alterações morfológicas como alterações no número de lóbulos do núcleo, e confirmar a forma

leucocitária dada pelo aparelho. Já no caso das plaquetas permite verificar o seu número, tamanho e a formação de agregados plaquetares [81].

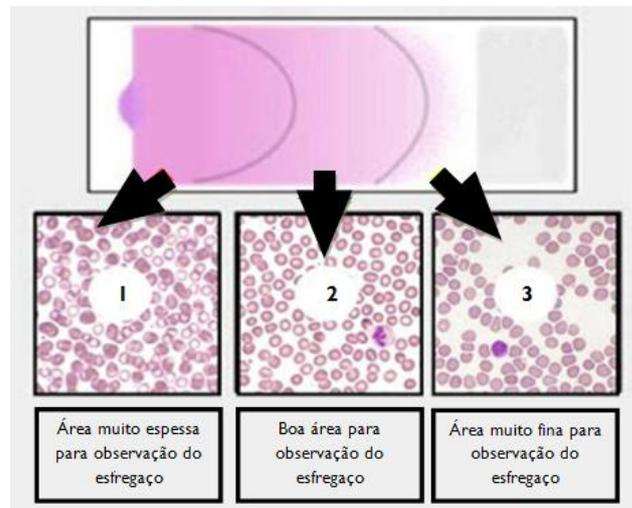


Figura 29: Representação de um esfregaço sanguíneo. Adaptado de [83].

3. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

Este ensaio, juntamente com a proteína C reativa permite avaliar a resposta inflamatória de fase aguda. Durante a fase aguda inflamatória ocorrem alterações na concentração de vários componentes séricos como o aumento do fibrinogénio, da haptoglobina, da ceruloplasmina e das imunoglobulinas. Este processo provoca alteração da carga na superfície dos eritrócitos (a carga negativa favorece a repulsão entre os eritrócitos), promovendo a formação de agregados, e por conseguinte, ao aumento da velocidade de sedimentação [81].

O método utilizado para medir a VS baseia-se no método desenvolvido em 1921 por Westergren e que consiste na medição da sedimentação dos eritrócitos recorrendo a uma pipeta calibrada colocada na posição vertical durante 1h. Sendo que a velocidade de sedimentação corresponde à altura de plasma em milímetros até aos eritrócitos precipitados [81].

Há que ter em conta que a VS aumenta fisiologicamente com a idade e durante a gravidez. É um teste pouco sensível (demora a dar resposta), e inespecífico, pois é influenciado pelas imunoglobulinas e pela anemia, além disso a proteína C reativa é mais rápida a responder à fase aguda e é mais sensível [81]. No entanto, a VS é um teste simples e barato e daí continuar a ser pedido nas análises de rotina.

4. PROVAS DE COAGULAÇÃO

A avaliação laboratorial da hemóstase é realizada em plasma obtido de sangue colhido com citrato de sódio. Além da contagem de plaquetas, podem ser feitas provas de coagulação, doseamento de fatores de coagulação e provas de função plaquetar [81].

As provas de coagulação efetuadas no LAC são o tempo de protrombina (PT) que avalia a via extrínseca da cascata de coagulação, e o tempo de tromboplastina parcial ativada (aTTP) que avalia a via intrínseca da cascata de coagulação.

4.1. TEMPO DE PROTROMBINA

Este teste serve para avaliar vários fatores de coagulação da via extrínseca e via final comum nomeadamente os fatores VII, X, V, protrombina e fibrinogénio. Para isso, é adicionado tromboplastina artificial e cálcio. Mede-se o tempo necessário para que ocorra a coagulação, que num indivíduo saudável deverá ser entre 11 e 15 segundos. As causas mais comuns para um PT aumentado são a administração de anticoagulantes orais, doença hepática, deficiência em vitamina K e coagulação intravascular disseminada [81].

O valor de PT é referido como INR (*International Normalized Ratio*), dado que permite comparar resultados e tem valor de diagnóstico. Este teste pode ser utilizado para monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais (derivados cumarínicos) dado que estes normalmente possuem intervalos terapêuticos estreitos. O valor normal encontra-se entre 0,9 e 1,1 e o intervalo terapêutico desejável é entre 2 e 3 [84].

A OMS criou o ISI (*International Sensivity Index*) para a padronização da tromboplastina utilizada e uniformização de resultados. Após a determinação do ISI os resultados calculam-se com base na relação entre o PT do doente e o PT de referência elevado ao valor do ISI obtendo-se assim um valor para o INR. Alterações inesperadas no INR podem dever-se a: interações medicamentosas, alterações na ingestão de vitamina K, consumo de álcool, patologias coexistentes ou má adesão à terapêutica [81].

4.2. TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

Este teste é utilizado para avaliação da via intrínseca e via final comum, pois avalia todos os fatores de coagulação exceto os fatores VIII e IX. Para isso são adicionados fosfolípidos, tromboplastina e cloreto de cálcio. No indivíduo saudável o tempo normal de coagulação encontra-se entre 25 e 35 segundos.

As causas mais comuns para um aTTP aumentado são a coagulação vascular disseminada, doença hepática, administração ou contaminação com heparina, a presença de um anticoagulante circulante inibidor ou deficiência em algum fator de coagulação que não o fator VII [81].

V – Conclusão

A realização do estágio curricular revelou-se de extrema importância, não só pela introdução ao contexto real de trabalho como também pela aquisição e consolidação dos conhecimentos adquiridos durante todo o 2º ciclo.

Foi também muito interessante contactar com uma área menos usual nas Análises Clínicas como é o caso da Genética. No LCG tive o privilégio de integrar uma equipa muito bem preparada, eficiente, em que o controlo de qualidade é imprescindível para a obtenção de resultados fiáveis, e em que há uma busca continua pela aquisição de conhecimentos, por exemplo através de reuniões semanais em que é apresentado um tema pelos técnicos do laboratório ou pelos alunos estagiários. Assim, pude explorar diversos temas subordinados à área da Citogenética e Genómica e contactar com diversas tecnologias de biologia molecular, o que me permitiu obter novos conhecimentos.

Também a passagem no LAC foi muito interessante e proveitosa dado que pude contactar com a rotina de trabalho num laboratório de análises clínicas, perceber a importância do controlo de qualidade, bem como compreender os processos, metodologias e particularidades de muitos dos ensaios realizados no LAC aumentando assim a minha preparação para um futuro contexto profissional. Além de tudo isto, ambos os locais fomentam a participação ativa e o espírito crítico dos alunos.

Futuramente, talvez fosse interessante uma pequena reestruturação do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas, concentrando as aulas do 2º ano no 1º semestre, de forma a permitir uma maior dedicação ao estágio no restante ano letivo. Também a atribuição de orientadores dentro da Faculdade de Farmácia é uma mais-valia para o aluno, na medida em que permite uma melhor orientação e aperfeiçoamento do relatório de estágio, contudo era importante que fosse feita no início do ano letivo.

Por último, penso que a frequência deste mestrado foi muito importante na aquisição de conhecimentos variados, na preparação para um bom desempenho em futuros contextos de trabalho e na percepção da importância das Análises Clínicas para o diagnóstico e acompanhamento do doente.

VI - Referências

1. LEJEUNE, J.; GAUTIER, M.; TURPIN, R. (1959) - Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 248 (1959) 1721-1722.
2. WELLESLEY, D.; DOLK, H.; BOYD, P. A.; GREENLESS, R.; HAEUSLER, M.; NELEN, V.; GARNE, E.; KHOSHNOOD, B.; DORAY, B.; RISSMANN, A.; MULLANEY, C.; CALZOLARI, E.; BAKKER, M.; SALVADOR, J.; ADDOR, MC.; DRAPER, E.; RANKIN, J.; TUCKER, D. – Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *European Journal of Human Genetics*, 20 (2012) 521–526.
3. GARDNER, R. J. M.; SUTHERLAND, G. R. – Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 3rdEd, New York: Oxford University Press, 2004. ISBN 0195149602.
4. Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, Inc, 2005.
5. CASPERSSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G. E.; KUDYNOWSKI, J.; MODEST, E. J.; SIMONSSON, E.; WAGH, U.; ZECH, L. – Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research*, 49 (1968) 219-222.
6. GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B. – The Principles of Clinical Cytogenetics. 2ndEd. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2005. eISBN 1-59259-833-1.
7. STUPPIA, L.; ANTONUCCI, I.; PALKA, G.; GATTA V. - Use of MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (2012) 3245-3276.
8. PINKEL, D.; GRAY, J. W.; TRASK, B.; ENGH, G.; FUSCOE, J.; DEKKEN, H.; – Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 (Pt 1) (1986) 151-157.
9. CATALINA, P.; COBO, F.; CORTES, J. L.; NIETO, A. I.; CABRERA, C.; MONTES, R.; CONCHA, A.; MENENDEZ, P. – Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: A concise review. *Cell Biology International*, 31 (2007) 861-869.
10. WIPPOLD II, F. J.; PERRY, A. – Neuropathology for the Neuroradiologist: Fluorescence in Situ Hybridization. *American Journal of Neuroradiology*, 28 (2007) 406-410.
11. SPEICHER, M. R.; BALLARD, S. G.; WARD, D. C. – Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics*, 12 (1996) 368-375.

-
12. SCHROCK, E.; MANOIR, S.; VELDMAN, T.; SCHOELL, B.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M. A.; NING, Y.; LEDBETTER, D. H.; BAR-AM, I.; SOENKSEN, D.; GARINI, Y.; RIED, T. – Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273 (1996) 494-497.
 13. UHRIG, S.; SCHUFFENHAUER, S.; FAUTH, C.; WIRTZ, A.; DAUMER-HAAS, C.; APACIK, C.; COHEN, M.; MULLER-NAIVIA, J.; CREMER, T.; MURKEN, J.; SPEICHER, M. R. – Multiplex FISH for pré- and postnatal diagnostic applications. *The American Journal of Human Genetics*, 65 (1999) 448–462.
 14. KLINGER, K.; LANDES, G.; SHOOK, D.; HARVEY, R.; LOPEZ, L.; LOCKE, P.; LERNER, T.; OSATHANONDH, R.; LEVERONE, B.; HOUSEAL, T.; PAVELKA, K.; DACKOWSKI, W. – Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *The American Journal of Human Genetics*, 51 (1992) 55–65.
 15. PINKEL, D.; LANDEGENT, J.; COLLINS, C.; FUSCOE, J.; SEGRAVES, R.; LUCAS, J.; GRAY, J. – Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (1988) 9138-9142.
 16. OOSTRA, B. A.; WILLEMSSEN, R. (2009) – *FMR1*: A gene with three faces. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790 (2009) 467-477.
 17. SHERMAN, S. L.; JACOBS, P. A.; MORTON, N. E.; FROSTER ISKENIUS, U.; HOWARD-PEEBLES, P. N.; NIELSEN, K. B.; PARTINGTON, M. W.; SUTHERLAND, G. R.; TURNER, G.; WATSON, M. – Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Human Genetics*, 69 4 (1985) 289-299.
 18. ESPOSITO, G.; RUGGIERO, R.; SAVARESE, G.; SAVARESE, M.; TREMOLATERRA, M. R.; SALVATORE, F.; CARSANA, A. - A 15-year case-mix experience for fragile X syndrome molecular diagnosis and comparison between conventional and alternative techniques leading to a novel diagnostic procedure. *Clinica Chimica Acta*, 417 (2013) 85–89.
 19. BAGNI, C.; TASSONE, F.; NERI, G.; HAGERMAN, R. – Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*, 122 12 (2012) 4314-4322.
 20. DOMBROWSKI, C.; LEVESQUE, S.; MOREL, M. L.; ROUILLARD, P.; MORGAN, K.; ROUSSEAU, F. – Premutation and intermediate-size *FMR1* alleles in 10572 males from the general populations: loss of an AGG interruption is a late event in the

-
- generation of fragile X syndrome alleles. *Human Molecular Genetics*, 11 (2002) 371-378.
21. NOLIN, S. L.; BROWN, W. T.; GLICKSMAN, A.; HOUCK, E.; GARGANO, A. D.; SULLIVAN, A.; BIANCALANA, V.; BRONDUM-NIELSEN, K.; HJALGRIM, H.; HOLINSKI-FEDER, E.; KOOY, F.; LONGSHORE, J.; MACPHERSON, J.; MANDEL, J. L.; MATTHIJS, G.; ROUSSEAU, F.; STEINBACH, P.; VAISANEN, M. L.; KOSKULL, H.; SHERMAN, S. – Expansion of the Fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *American Journal of Human Genetics*, 72 (2003) 454-464.
 22. MALTER, H. E.; IBER, J. C.; WILLERMSSEN, R.; GRAAFF, E.; TARLETON, J. C.; LEISTI, J.; WARREN, S. T.; OOSTRA, B. A. – Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nature Genetics*, 15 (1997) 165-169.
 23. JACQUEMONT, S.; HAGERMAN, R. J.; LEEHEY, M. A.; HALL, D. A.; LEVINE, R. A.; BRUNBERG, J. A.; ZHANG, L.; JARDINI, T.; GANE, L.; HARRIS, S. W.; HERMAN, K.; GRISGSBY, J.; GRECO, C. M.; BERRY-KRAVIS, E.; TASSONE, F.; HAGERMAN, P. – Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a permutation carrier population. *The Journal of the American Medical Association*, 291 4 (2004) 460-469.
 24. SULLIVAN, A. K.; MARCUS, M.; EPSTEIN M. P.; ALLEN, E.; ANIDO, A.; PAQUIN, J.; YADAV-SHAH, M.; SHERMAN, S. L. – Association of FMRI repeat size with ovarian dysfunction. *Human Reproduction*, 20 2 (2005) 402-412.
 25. SENECA, S.; LISSENS, W.; ENDELS, K.; CALJON, B.; BONDUELLE, M.; KEYMOLEN, K.; RANDEMAEKER, M.; ULLMAN, U.; HAENTIJENS, P.; BERKEL, K. V.; DOOREN, S. V. – Reliable and sensitive detection of Fragile X (expanded) alleles in clinical prenatal DNA samples with a fast turnaround time. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14 6 (2012) 560-568.
 26. MULIS, K. B.; FALONNA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. – Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 (1986) 263-273.
 27. BOEHM, C. D. – Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. *Clinical Chemistry*, 35 9 (1989) 1843-1848.
 28. STRACHAN, T.; READ, A. – *Human Molecular Genetics*. 2ndEd. New York: Wiley-Liss., 1999. ISBN-10: 1-85996-202-5.
 29. WILSON, J. A.; PRATT, V. M.; PHANSALKAR, A.; MURALIDHARAN, K.; HIGHSMITH, W. E.; BECK, J. C.; BRIDGEMAN, S.; COURTNEY, E. M.; EPP, L.; FERREIRA-GONZALEZ, A.; HJELM, N. L.; HOLTEGAARD, L. M.; JAMA, M. A.
-

-
- JAKUPCIAK, J. P.; JOHNSON, M. A.; LABROUSSE, P.; LYON, E.; PRIOR, T. W.; RICHARDS, C. S.; RICHIE, K. L.; ROA, B. B.; ROHLFS, E. M.; SELLERS, T.; SHERMAN, S. L.; SIEGRIST, K. A.; SILVERMAN, L. M.; WISZNIEWSKA, J.; KALMAN, L. V.; and the Fragile Xperts Working Group of the Association for Molecular Pathology Clinical Practice Committee – Consensus characterization of 16 *FMR1* reference materials: A consortium study. *Journal of Molecular Diagnostics*, 10 1 (2008).
30. CHEN, L.; HADD, A.; SAH, S.; FILIPOVIC-SADIC, S.; KROSTING, J.; SEKINGER, E.; PAN, R.; HAGERMAN, J.; STENZEL, T. T.; TASSONE, F.; LATHAM, G. – An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of Fragile X expanded alleles and minimizes the need for Southern Blot analysis. *Journal of Molecular Diagnostics*, 12 5 (2010) 589-600.
31. SCHOUTEN, J. P.; McELGUNN, C. J.; WAAIJER, R.; ZWIJNENBURG, D.; DIEPVENS, F.; PALS, G. – Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30 12 e57 (2002).
32. WILLIS, A. S.; VEYVER, I.; ENG, C. M. – Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 32 (2012) 315-320.
33. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - General Protocol, MRC-Holland, 2012.
34. SOLINAS-TOLDO, S.; LAMPEL, S.; STILGENBAUER, S.; NICKOLENKO, J.; DOHNER, H.; CREMER, T.; LICHTER, P. – Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 20 (1997) 399-407.
35. VERMEESCH, J. R.; RAUCH, A. – Reply to Hochstenbach et.al ‘Molecular Karyotyping’. *European Journal of Human Genetics*, 14 10 (2006) 1063-1064.
36. ALLEMEERSCH, J.; VOOREN, S. V.; HANNES, F.; MOOR, B.; VERMEESCH, J. R.; MOREAU, Y. – An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH. *BMC Bioinformatics*, 10 380 (2009).
37. SHAFFER, L. G.; BEJJANI, B. A. – Development of new postnatal diagnostic methods for chromosome disorders. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 16 (2011) 114-118.
38. Consulta em:
http://www.ogt.co.uk/resources/literature/524_selecting_the_right_cytosure_array_format_for_your_study (26/2/2013).
39. VERMEESCH, J. R.; FIEGLER, H.; LEEUW, N.; SZUHAI, K.; SCHOUMANS, J.; CICCONE, R.; SPELEMAN, F.; RAUCH, A.; CLAYTON-SMITH, J.; RAVENSWAAIJ,

-
- C. V.; SANLAVILLE, D.; PATSALIS, P. C.; FIRTH, H.; DEVRIENDT, K.; ZUFFARDI, O. – Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *European Journal of Human Genetics*, 15 (2007) 1105–1114.
40. SCOUARNEC, S.; GRIBBLE, S. M. – Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity*, 108 (2012) 75-85.
41. Consulta em: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/microarray-based-comparative-genomic-hybridization-acgh-45432> (10-1-2013).
42. CRAIG, J. M.; KRAUS, J.; CREMER, T. – Removal of repetitive sequences from FISH probes using PCR-assisted affinity chromatography. *Human Genetics*, 100 (1997) 472-476.
43. LIU, J.; BERNIER, F.; LAUZON, J.; LOWRY, R. B.; CERNOS, J. – Application of microarray-based comparative genomic hybridization in prenatal and postnatal settings: Three case reports. *Genetics Research International*, 2011 (2011).
44. MILLER, D.; ADAM, M. P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L. G.; BROTHMAN, A. R.; CARTER, N. P.; CHURCH, D. M.; CROLLA, J. A.; EICHER, E. E.; EPSTEIN, C. J.; FAUCETT, W. A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J. M.; HAMOSH, A.; JACKSON, L.; KAMINSKY, E. B.; KOK, K.; KRANTZ, I. A.; KUHN, R. M.; LEE, C.; OSTELL, J.; ROSENBERG, C.; SCHERER, S.; SPINNER, N.; STAVROPOULOS, D. J.; TEPPERBERG, J. H.; THORLAND, E. C.; VERMEESCH, J. R.; WAGGONER, D. J.; WATSON, M. S.; MARTIN, C. L.; LEDBETTER, D. H. – Consensus statement: Chromosomal Microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individual with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American Journal of Human Genetics*, 86 (2010) 749–764.
45. STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. – Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annual Review of Medicine*, 61 (2010) 437-455.
46. SANLAVILLE, D.; LAPIERRE, J. M.; TURLEAU, C.; COQUIN, A.; BORK, G.; COLLEAUX, L.; VEKEMANS, M.; ROMANA, S. P. – Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. *European Journal of Medical Genetics*, 48 (2005) 214–231.
47. GUILHERME, R. S.; MELONI, V. A.; KIM, C. A.; PELLEGRINO, R.; TAKENO, S. S.; SPINNER, N. B.; CONLIN, L. K.; CHRISTOFOLINI, D. M.; KULIKOWSKI, L. D.; MELARAGNO, M. I. – Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. *BMC Medical Genetics*, 12 171(2011).
48. BONAGLIA, M. C.; GIORDIA, R.; BERI, S.; AGOSTINI, C.; NOVARA, F.; FICHERA, M.; GRILLO, L.; GALES, O.; VETRO, A.; CICCONE, R.; BONATI, M. T.; GIGLIO, S.; GUERRINI, R.; OSIMANI, S.; MARELLI, S.; ZUCCA, C.; GRASSO, R.; BORGATTI, R.;
-

-
- MANI, E.; MOTTA, C.; MOLteni, M.; ROMANO, C.; GRECO, D.; REITANO, S.; BAROCINI, A.; LAPI, E.; CECCONI, A.; ARRIGO, G.; PATRICELLI, M. G.; PANTALEONI, C.; D'ARRIGO, S.; RIVA, D.; SCIACCA, F.; BERNARDINA, B. D.; ZOCCANTE, L.; DARRA, F.; TERMINE, C.; MASERATI, E.; BIGONI, S.; PRIOLO, E.; BOTTANI, A.; GIMELLI, S.; BENA, F.; BRUSCO, A.; GREGORIO, E.; BAGNASCO, I.; GIUSSANI, U.; NITSCH, L.; POLITI, P.; MARTINEZ-FRIAS, M. L.; MARTINEZ-FERNANDEZ, M. L.; GUARDIA, N. M.; BREMER, A.; ANDERLID, B. M.; ZUFFARDI, O. – Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid Syndrome. *PLOS Genetics*, 7 7 (2011).
49. PHELAN, K.; McDERMID, H. E. – The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Molecular Syndromology*, 2 (2011) 186-201.
50. JEFFRIES, A. R.; CURRAN, S.; ELMSLIE, F.; SHARMA, A.; WENGER, S.; HUMMEL, M.; POWELL, J. – Molecular and phenotypic characterization of ring chromosome 22. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 137A (2005) 139–147.
51. Consulta em: www.ensembl.org (5-5-2013).
52. FLINT, J.; WILKIE, A. O. M.; BUCKLE, V. J.; WINTER, R. M.; HOLLAND, A. J.; McDERMID, H. – The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nature Genetics*, 9 (1995) 132-140.
53. STEGMANN, A. P. A.; JONKER, L. M. H.; ENGELEN, J. J. M. – Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *European Journal of Medical Genetics*, 51 (2008) 93-105.
54. KOOLEN, D. A.; NILLSEN, W.; VERSTEEG, M.; MERKX, G.; KNOERS, N.; KETS, M.; VERMEER, S.; RAVENSWAAIJ, C.; KOVEL, C.; BRUNNER, H.; SMEETS, D.; VRIES, B.; SISTERMANS, E. – Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *European Journal of Medical Genetics*, 41 (2004) 892-899.
55. LINARDOPOULOU, E. V.; WILLIAMS, E. M.; FAN, Y.; FRIEDMAN, C.; YOUNG, J. M.; TRASK, B. J. – Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature*, 437 7055 (2005) 94-100.
56. FARAVELLI, F.; MURDOLO, M.; MARANGI, G.; BRICARELLI, F. D.; ROCCO, M.; ZOLLINO, M. – Mother to son amplification of a small subtelomeric deletion: A new mechanism of familial recurrence in Microdeletion Syndromes. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 143A (2007) 1169–1173.

-
57. WANDSTRAT, A. E.; SCHWARTZ, S. – Isolation and molecular analysis of inv.dup(15) and construction of a physical map of a common breakpoint in order to elucidate their mechanism of formation. *Chromosoma*, 109 (2000) 498-505.
58. BAILEY, J. A.; GU, Z.; CLARK, R. A.; REINERT, K.; SAMONTE, R. V.; SCHWARTZ, S.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; EICHLER, E. E. – Recent segmental duplications in the human genome. *Science*, 297 (2002) 1003-1007.
59. CHRISTIAN, S. L.; FANTES, J.; MEWBORN, S.; HUANG, B; LEDBETTER, D.; – Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi /Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Human Molecular Genetics*, 8 (1999) 1025-1037.
60. ROBINSON, W. P.; BERNASCONI, F.; MUTIRANGURA, A.; LEDBETTER, D.; LANGLOIS, S.; MALCOM, S.; MORRIS, M.; SCHINZEL, A. (1993a) – Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *American Journal of Human Genetics*, 53 (1993) 740-751.
61. ROBINSON, W. P.; KUCHINKA, B.; BERNASCONI, F.; PETERSEN, M.; SCHULZE, A.; BRONDUM-NIELSEN, K.; CHRISTIAN, S. L.; LEDBETTER, D.; SCHINZEL, A.; HORSTHEMKE, B.; et al. – Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15: dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Human Molecular Genetics*, 7 (1998) 1011-1019.
62. ROBINSON, W. P.; SPIEGEL, R.; SCHINZEL, A. A. – Deletion breakpoints associated with the Prader-Willi and Angelman syndromes (15q11-q13) are not sites of high homologous recombination. *Human Genetics*, 91 (1993) 181-184.
63. SCHAEFER, G. B.; LUTZ, R. E. – Diagnostic yield in the clinical genetic evaluation of autism spectrum disorders. *Genetics in Medicine*, 8 9 (2006) 549-556.
64. SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; MALHOTRA, D.; TROGE, J.; LESE-MARTIN, C.; WALSH, T.; YAMROM, B.; YOON, S.; KRASNITZ, A.; KENDALL, J.; LEOTTA, A.; PAI, D.; ZHANG, R.; LEE, Y.; HICKS, J.; SPENCE, S.; LEE, A. T.; PUURA, K.; LEHTIMAKI, T.; LEDBETTER, D.; GREGERSEN, P.; BREGMAN, J.; STUCLIFFE, J. S.; JOBANPUTRA, V.; CHUNG, W.; WARBURTON, D.; KING, M.; SKUSE, D.; GESCHWIND, D.; GILLIAN, C.; YE, K.; WIGLER, M. – Strong association of *de novo* copy number mutations with autism. *Science*, 316 5823 (2007) 445-449.
65. CAI, G.; EDELMANN, L.; GOLDSMITH, J. E.; COHEN, N.; NAKAMINE, A.; REICHERT, J. G.; HOFFMAN, E.; ZURAWIECKI, D. M.; SILVERMAN, J. M.; HOLLANDER, E.; SOORYA, L.; ANAGNOSTOU, E.; BETANCUR, C.; BUXBAUM, J. D. – Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic scening in autism
-

-
- spectrum disorders: Efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT. *BMC Medical Genomics*, 1 50 (2008).
66. SIMON, E. W.; HAAS-GLIVER, B.; FINUCANE, B. – A longitudinal follow-up study of autistic symptoms in children and adults with duplications of 15q11-13. *American Journal of Medical Genetics, Part B* 153B (2009) 463-467.
67. CHRISTIAN, S. L.; BRUNE, C.; SUDI, J.; KUMAR, R.; LIU, S.; KARAMOHANED, S.; BADNER, J. A.; MATSUI, S.; CONROY, J.; McQUAID, D.; GERGEL, J.; HATCHWELL, E.; GILLIAM, T. C.; GERSHON, E.; NOWAK, N.; DOBYNS, W.; COOK, E. – Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*, 63 12 (2008) 1111-1117.
68. HOGART, A.; WU, D.; LASALLE, J. M.; SCHANEN, N. C. – The comorbidity of Autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiology of Disease*, 38 2 (2010) 181-191.
69. CHRISTOFOLINI, D. M.; MELONI, V. A.; RAMOS, M. A. P.; OLIVEIRA, M. M.; MELLO, C. B.; PELLEGRINO, R.; TEKENO, S. S.; MELARAGNO, M. I. – Autistic disorder phenotype associated to a complex 15q intrachromosomal rearrangement. *American Journal of Medical Genetics, Part B* 159B (2012) 823-828.
70. RIFAI, L.; PORT-LIS, M.; TABEL, A. C. ; BAILLEUL-FORESTIER, I. ; BENZACKEN, B. ; DRUNAT, S. ; KUZBARI, S. ; PASSEMARD, S. ; VERLOES, A. ; ABOURA, A. - Ectodermal dysplasia-like syndrome with mental retardation due to contiguous gene deletion: Further clinical and molecular delineation of del(2q32) syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 152A (2010) 111–117.
71. MENCARELLI, M.A.; CASELLI, R.; PESCUCCI, C.; HAYEK, G.; ZAPPELLA, M.; RENIERI, A.; MARI, F. - Clinical and molecular characterization of a patient with a 2q31.2-32.3 deletion identified by array-CGH. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 143A (2007) 858–865.
72. COCCHIELLA, A.; MALACARNE, M.; FORZANO, F.; MARCIANO, C.; PIERLUIGI, M.; PERRONI, L.; FARAVELLI, F.; MARIA, E. - The refinement of the critical region for the 2q31.2q32.3 Deletion Syndrome indicates candidate genes for mental retardation and speech impairment. *American Journal of Medical Genetics, Part B* 153B (2010) 1342–1346.
73. PRONTERA, P.; BERNARDINI, L.; STANGONI, G.; CAPALBO, A.; ROGAIA, D.; ARDISIA, C.; NOVELLI, A.; DALLAPICCOLA, B.; DONTI, E. - 2q31.2q32.3 deletion

-
- syndrome: Report of an adult patient. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 149A (2009) 706–712.
74. FERREIRA, S. I.; MATOSO, E.; VENANCIO, M.; SARAIVA, J.; MELO, J. B.; CARREIRA, I. M. – Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in Alagille Syndrome region. *Molecular Cytogenetics*, 5 25 (2012).
75. TURNPENNY, P. D.; ELLARD, S. – Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *European Journal of Human Genetics*, 20 (2012) 251-257.
76. IAFRATE, A. J.; FEUK, L.; RIVERA, M.; LISTEWNIK, M.; DONAHOE, P.; QI, Y.; SCHERER, S. W.; LEE, C. – Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature Genetics*, 36 9 (2004) 949-951.
77. SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; TROGE, J.; ALEXANDER, J.; YOUNG, J.; LUNDIN, P.; MANER, S.; MASSA, H.; WALKER, M.; CHI, M.; NAVIN, N.; LUCITO, R.; HEALY, J.; HICKS, J.; YE, K.; REINER, A.; GILLIAN, T. C.; TRASK, B.; PATTERSON, N.; ZETTERBERG, A.; WIGLER, M. – Large-scale copy number polymorphisms in the human genome. *Science*, 305 5683 (2004) 525-528.
78. LEE, C.; IAFRATE, A. J.; BROTHMAN, A. R. – Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nature Genetics Supplement*, 39 (2007) S48-S54.
79. THELM, H.; DIEM, H.; HAFERLACH, T. – Color Atlas of Hematology: Practical Microscopic and Clinical Diagnosis, 2ndEd, New York: Thieme, 2004. ISBN 1-58890-193-9.
80. HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. – Essential Haematology, 6thEd, Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN 978-1-4051-9890-5.
81. LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. – Dacie and Lewis: Practical Haematology, 9thEd, London, Churchill-Livingstone, 2001. ISBN 0 443 06377 X.
82. SMITH, G. – Problem Solving in Haematology, Oxford: Clinical Publishing, 2010. ISBN 978 1 84692 605 1.
83. Consulta em: <http://hematoufvjm.blogspot.pt/2009/09/esfregaco-sanguineo.html> (17/06/2013).
84. Prontuário Terapêutico – Infarmed, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP / Ministério da Saúde, 2012. ISBN 978-989-8369-11-6.
-