

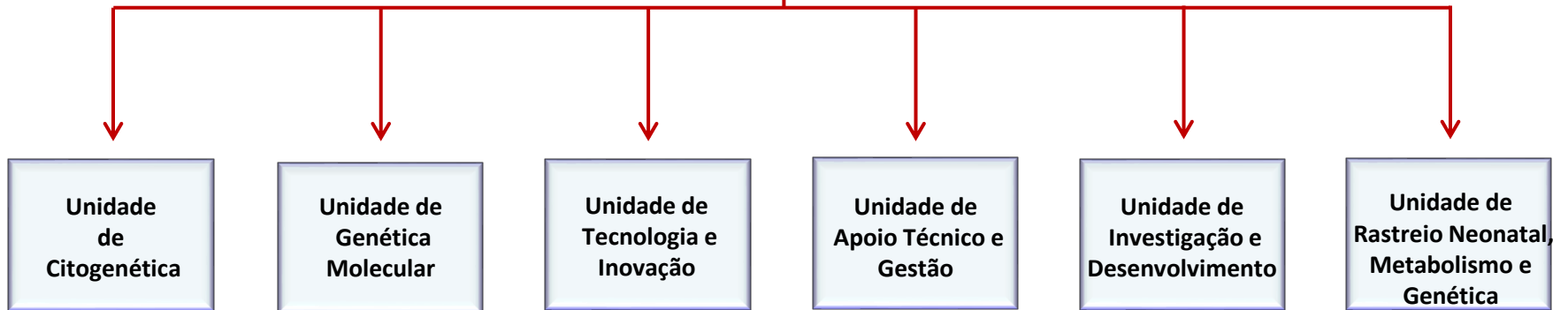
# DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA

## UNIDADE DE CITOGENÉTICA

### A CITOGENÉTICA/CITOGENÉTICA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GENÉTICAS DE BASE CROMOSSÓMICA E DOENÇAS HEMATOLÓGICAS MALIGNAS

**Hildeberto Correia**  
Filomena Brito  
Maria do Céu Gerales

## DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA



# A CITOGENÉTICA/CITOGENÉTICA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GENÉTICAS DE BASE CROMOSSÓMICA

**Objetivo:** Dar conhecimento dos testes de genética efetuados na Unidade de Citogenética (UCI) para identificação de alterações num cromossoma ou gene, permitindo a prevenção e diagnóstico de doenças genéticas

- 1. Anomalias Cromossómicas e Metodologias Laboratoriais**
- 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes**
- 3. Apresentação de casos práticos**

# 1. Anomalias Cromossómicas e Metodologias Laboratoriais

## Genoma

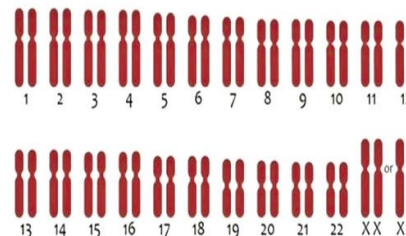
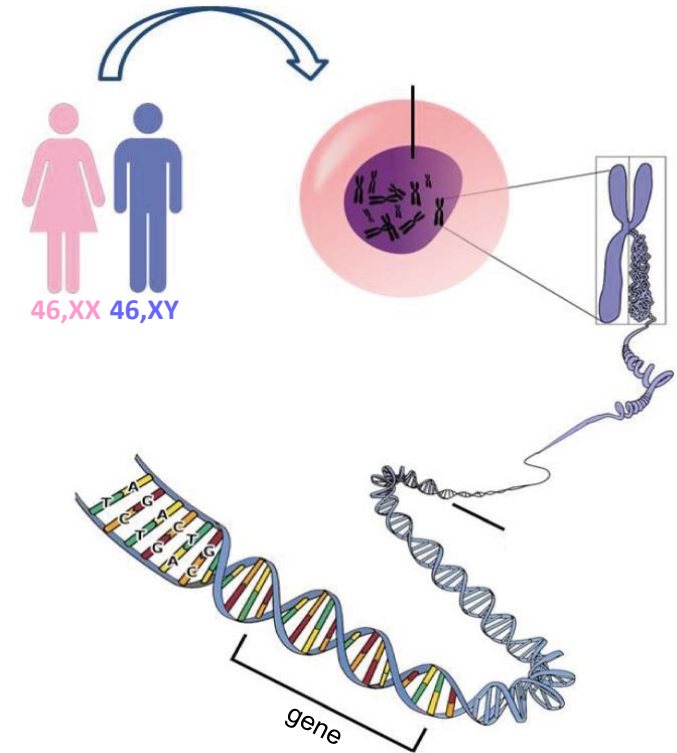
- ✓ É toda a informação hereditária de um organismo, codificada no seu DNA, que determina as características e o desenvolvimento biológico de um indivíduo
- ✓ Inclui **genes** ( $\approx 27.000$   $\leftrightarrow$  3%) e sequências não codificantes (importantes para a regulação génica além de outras funções)
- ✓ As sequências de DNA formam os **cromossomas**

## Cromossomas

- ✓ Estruturas em que se encontram os cerca de dois metros de DNA de um genoma diploide humano

## Citogenética /Citogenómica

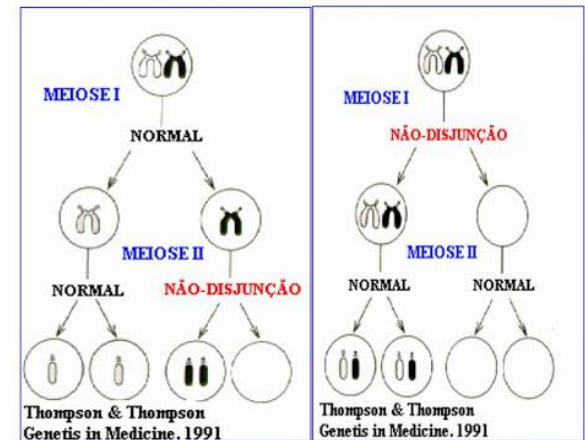
- ✓ Área da genética que estuda os **cromossomas** e a relação das alterações destes com o **fenótipo**.



# 1. Anomalias Cromossómicas e Metodologias Laboratoriais

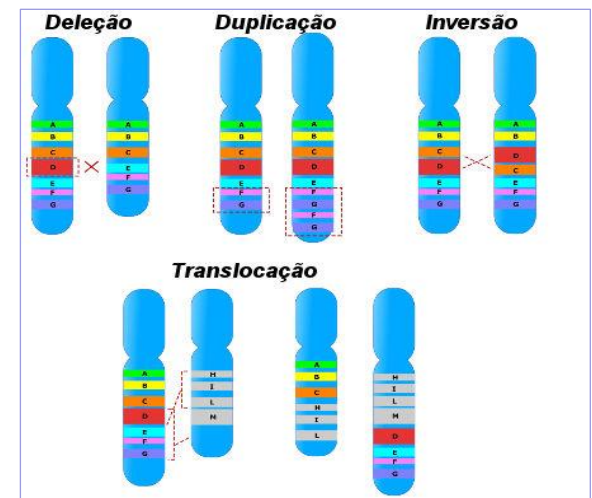
## Anomalias Numéricas

- ✓ As **aneuploidias** são a alteração mais frequente (não disjunção)
- ✓ Envolvem a perda ou ganho de cromossomas (Autossomas ou Cr. sexuais)
- ✓ As **poliploidias** correspondem a múltiplos do nº básico de cromossomas (3n, 4n...)



## Anomalias Estruturais

- ✓ Envolvem alterações na estrutura do cromossoma
- ✓ Podem envolver um, dois ou mais cromossomas
- ✓ Podem ou não determinar perda ou ganho de material genético (A. Desequilibradas/ A. Equilibradas)  
Ex. **Deleção**; **duplicação**; **inversão**; **translocação**;...



# 1. Anomalias Cromossómicas e Metodologias Laboratoriais

## Características

### Estudo Global do Genoma

#### Cariotipo

- ✓ Identifica A. Cromossómicas ( $\approx 0,7\%$ ) que originam alteração no **número** (alterações numéricas) ou no **padrão de bandas** dos cromossomas (alterações estruturais).
- ✓ Limiar de resolução de **3-10 Mb**.

#### Teste genético de array

- ✓ Identifica **ganhos ou perdas** de material genómico, designados por **CNVs** (*Copy Number Variants*)
- ✓ Resolução a partir de **10 Kb** (dependendo da plataforma e filtros usados).

### Estudo Dirigido de Regiões do Genoma

#### FISH (Hibridação *in situ*)

- ✓ Localiza sequências específicas de DNA (**100-200 Kb**) nos cromossomas, utilizando sondas fluorescentes.
- ✓ Identifica cromossomas utilizando sondas centroméricas e/ou de cobertura total (WCP)

#### Metafase/Interfase

#### MLPA (*Multiplex Probe Amplification*)

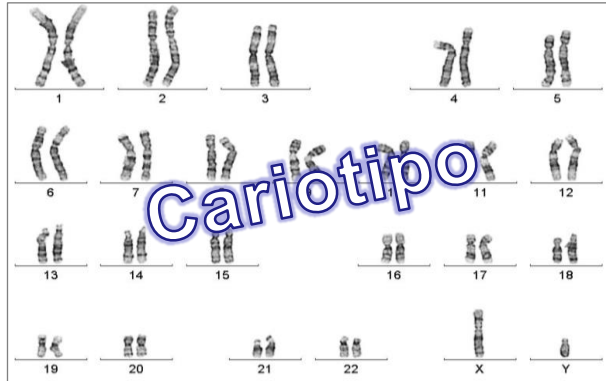
- ✓ Identifica alteração no número de cópias de sequências genómicas, permitindo evidenciar deleções e/ou duplicações.

#### DNA

# 1. Anomalias Cromossómicas e Metodologias Laboratoriais

## Exemplos

### Estudo Global do Genoma



Cariotipo

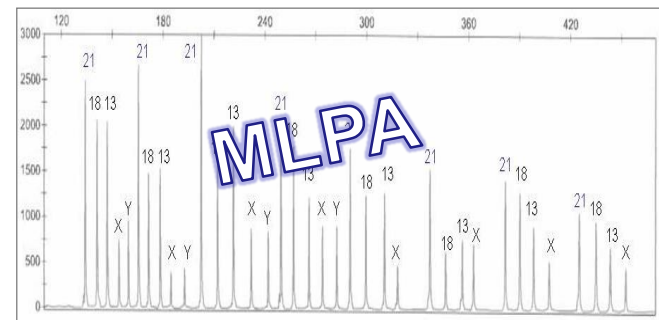


Array

### Estudo Dirigido de Regiões do Genoma

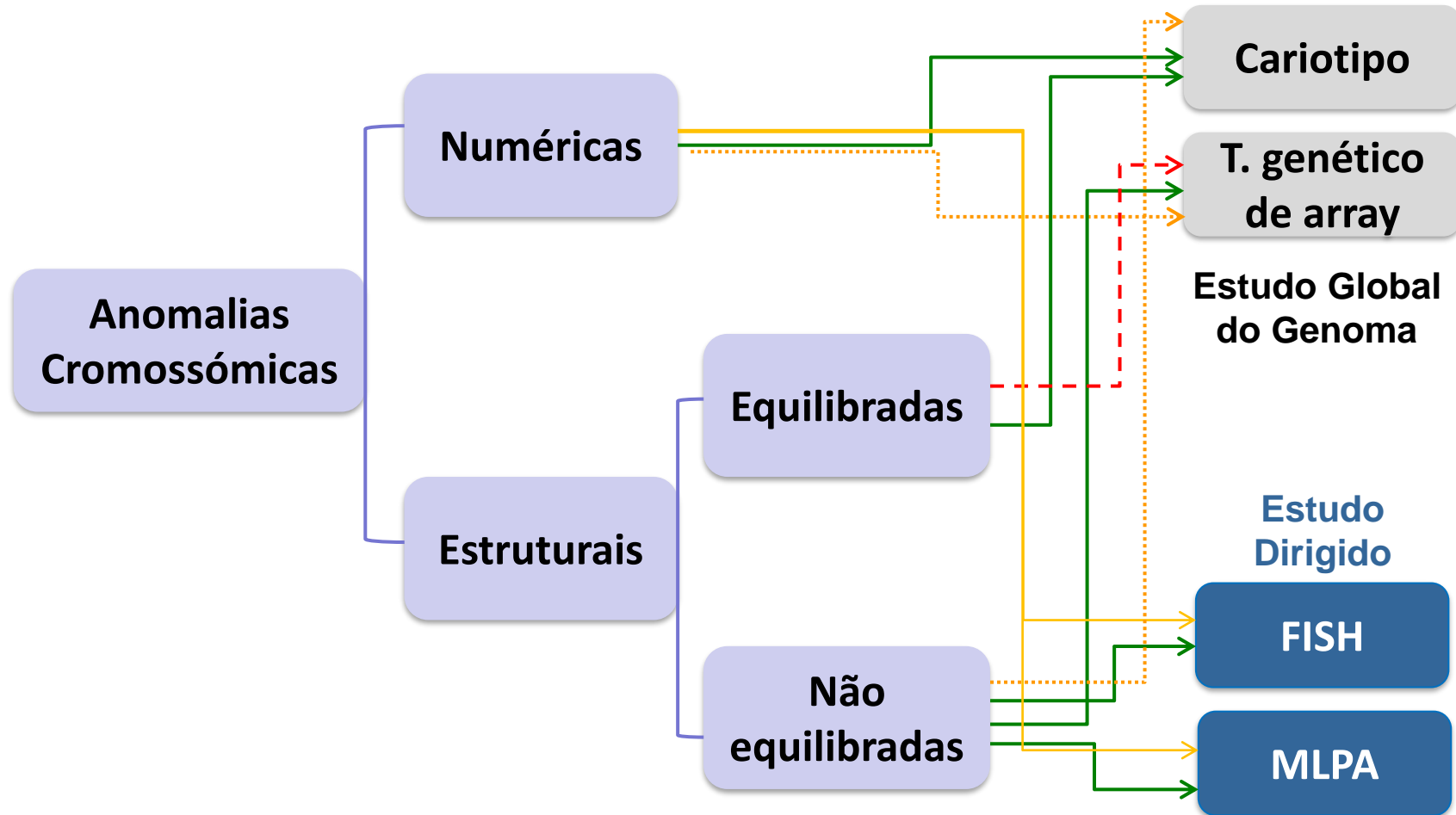


Metafase/Interfase



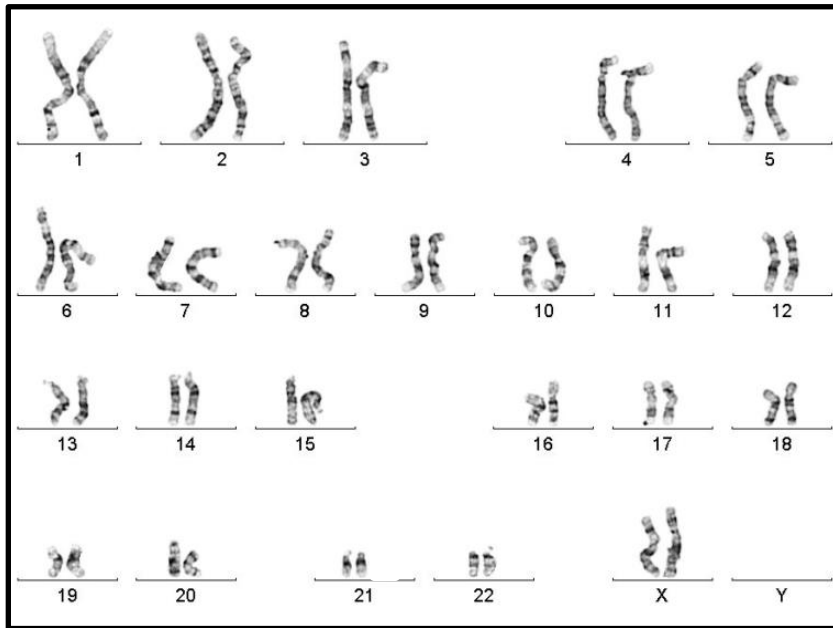
DNA

# 1. Anomalias Cromossómicas e Metodologias Laboratoriais

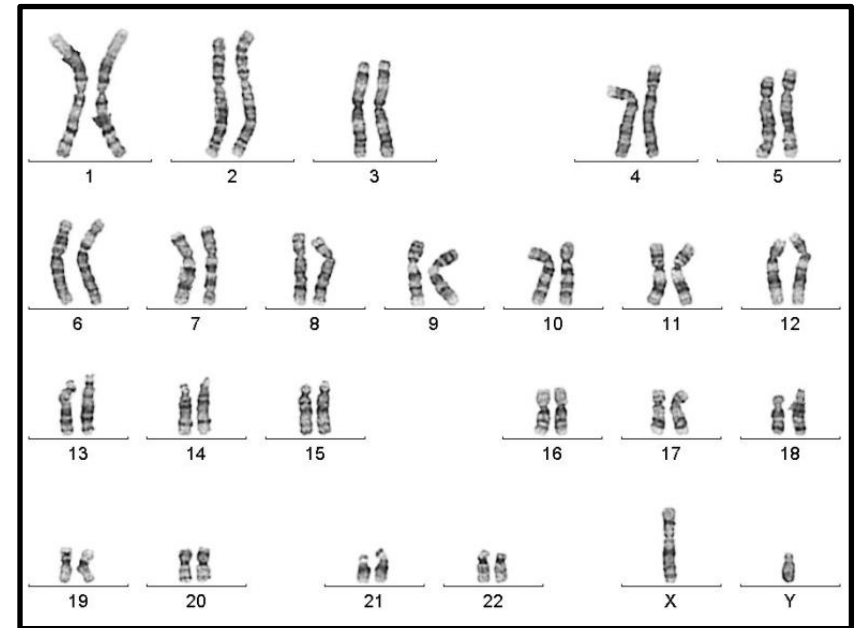


## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

**HOMEM** – 46 cromossomas (22 pares autossomas + 1 par cr sexuais)



**Mulher – 46,XX**



**Homem – 46,XY**

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

- ✓ Atualmente são reconhecidos mais de 100 Síndromes Cromossómicas
- ✓ O seu diagnóstico permite melhorar a qualidade de vida dos portadores e fazer a prevenção de novos casos



## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Numéricas:

- ✓ Síndrome de Down
- ✓ Síndrome de Edwards
- ✓ Síndrome de Patau
- ✓ Síndrome do Triplo X
- ✓ Síndrome de Klinefelter
- ✓ Síndrome de Turner
- ✓ Triploidia

### ➤ Anomalias Estruturais

- ✓ Síndrome de Wolf-Hirschhorn
- ✓ Síndrome de Cri-du-chat
- ✓ Síndrome de Williams
- ✓ Síndrome de DiGeorge
- ✓ Síndrome de Prader-Willi
- ✓ Síndrome de Angelman

↓  
**Síndromes de Microdeleção**

- ✓ **Síndromes Polimalformativos Inespecíficos/ Atraso Mental**

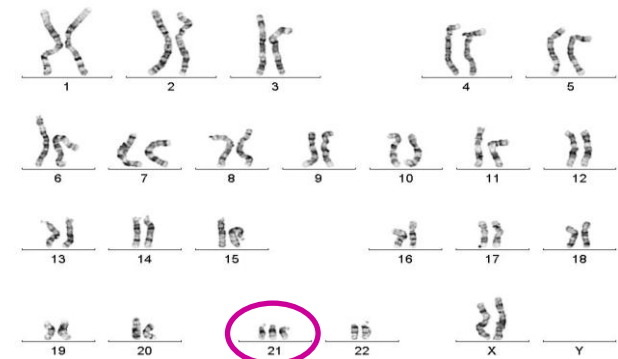
## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Numéricas

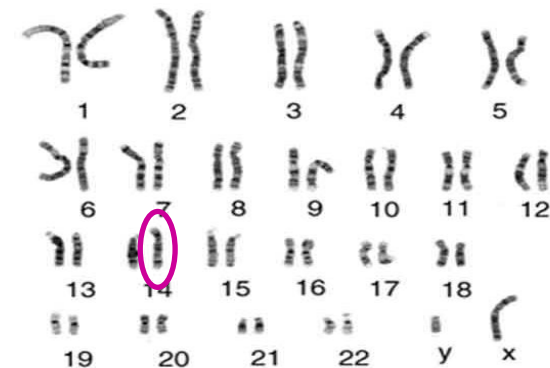
#### ✓ Síndrome de Down

- Incidência 1/800 RN( Gardner &Sutherland, 1996)
- 95% casos trissomia 21 livre
- 2% translocação Robertsoniana
- 1% rearranjos cr. (21q22)
- 2% mosaicismo
- Associação com idade materna
- Têm risco para epilepsia, leucemia, Alzheimer e deficiência imunitária

Teste diagnóstico: **Cariotipo/ MLPA**



**Cariótipo: 47,XX,+21** (A. Numérica)



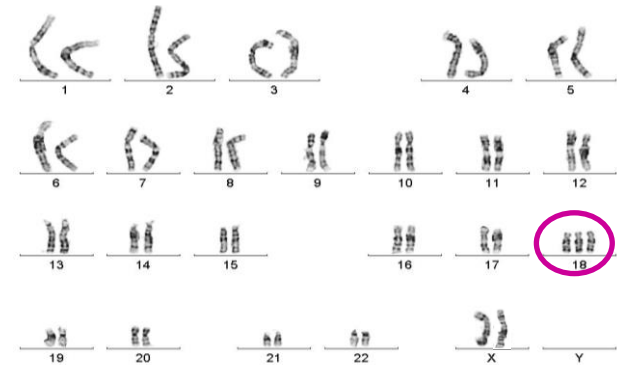
**Cariótipo: 46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21**  
(A. Estrutural)

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Numéricas

#### ✓ Síndrome de Edwards

- Trissomia do Cr. 18
- Incidência 1/7900 RN (Parker *et al.* 2003) (> no sexo feminino; taxa de sobrevivência muito reduzida)
- A maioria das concepções resultam em AE (DPN)
- 85% dos casos derivam de não disjunção materna
- Ocasionalmente podem surgir em mosaico
- Correlacionável com a idade materna



**Cariótipo: 47,XX,+18**

**Teste diagnóstico: Cariótipo/ MLPA**

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Numéricas

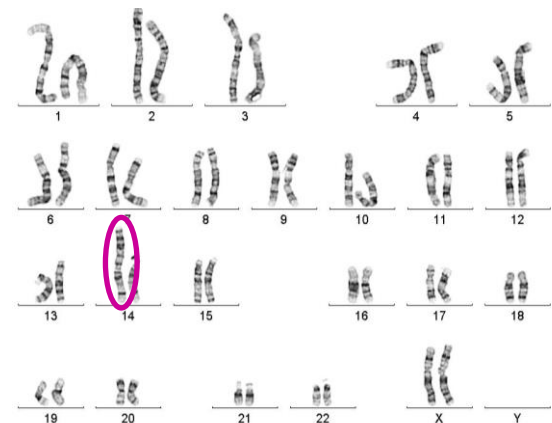
#### ✓ Síndrome de Patau

- Trissomia do Cr. 13
- Incidência 1/9500 RN (Parker *et al.* 2003) com mau prognóstico de sobrevivência
- A maioria das conceções resultam em AE (DPN)
- 90% resultam de trissomia livre e devem-se a erros de não disjunção materna
- 5-10% resultam de translocações (sobretudo 13;14)
- Correlacionável com a idade materna

**Teste diagnóstico:** Cariotipo/MLPA



**Cariótipo: 47,XX,+13** (A. Numérica)



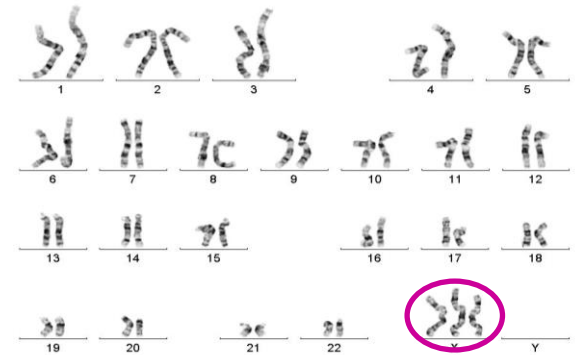
**Cariótipo: 46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)**  
(A. Estrutural)

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Numéricas

#### ✓ Síndrome do Triplo X

- Trissomia do Cr X
- Incidência 1/1000 RN sexo feminino (frequentemente achado incidental)
- Origem paterna ou materna
- Correlação com idade materna (30% casos)
- Pequena proporção na forma de mosaico (47,XXX/46,XX)



**Cariótipo: 47,XXX**

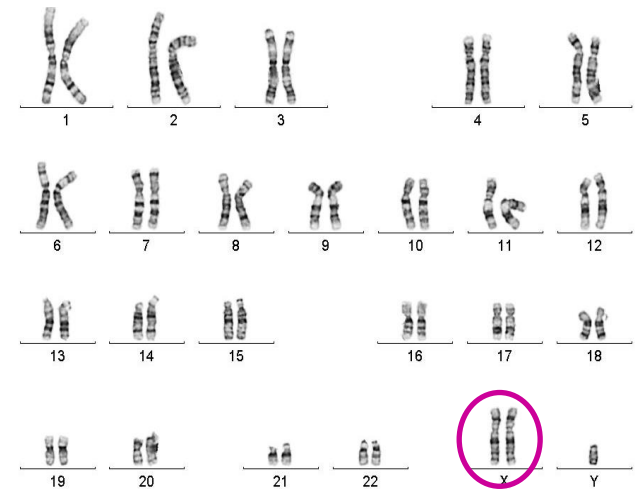
**Teste diagnóstico: Cariotipo/MLPA**

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Numéricas

#### ✓ Síndrome de Klinefelter

- Cr X supranumerário
- Incidência 1/600-1/800 RN sexo masculino
- Origem paterna ou materna
- Correlação com idade materna
- Pequena proporção na forma de mosaico
- (47,XXY/46,XY)
- Podem existir mais do que um cromossoma X extra (48,XXXY)



**Cariótipo: 47,XXY**

**Teste diagnóstico: Cariotipo/MLPA**

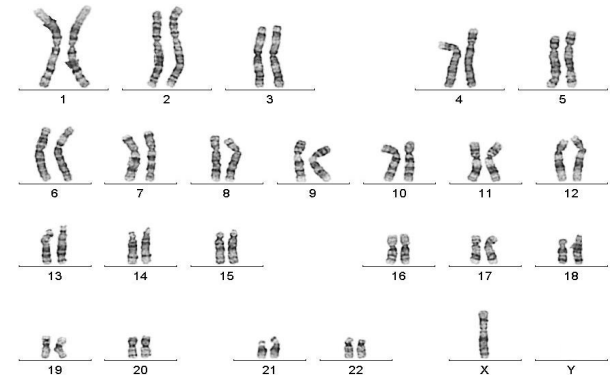
## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Numéricas

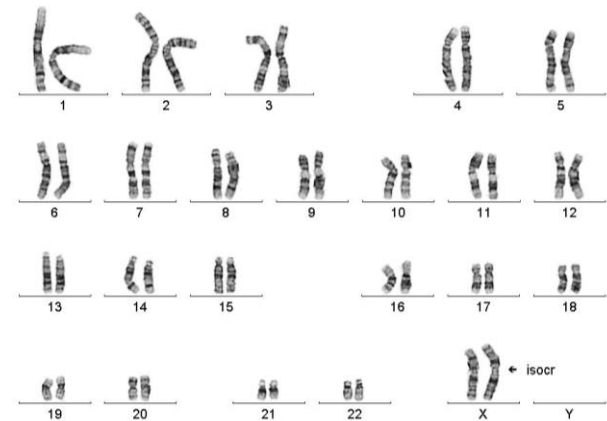
#### ✓ Síndrome de Turner

- Monossomia do Cr X (46%)
- Incidência – 1/5000-1/10000 R.N. Sexo feminino
- A maioria (99%) das conceções resultam em AE
- Na maioria dos casos (80%) o cromossoma X é materno
- Pode surgir na forma de mosaico (45,X/46,XX;45,X/46,X,delXp45;45,X/46,i(Xq), etc)

Teste diagnóstico: **Cariotipo/MLPA**



**Cariótipo: 45,X**



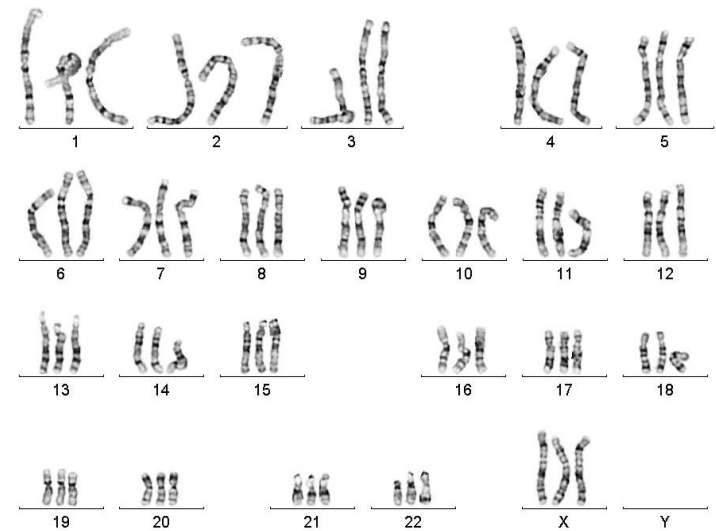
**Cariótipo: 46,X, i(X)(q10)**

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Numéricas

#### ✓ Triploidia

- Três cópias do conjunto haploide de cromossomas
- Correspondem a ≈ 7,5% dos AE (DPN)
- Gestação inviável
- Não associado a idade materna
- Origem diândrica (paterna) ou digínica (materna)



**Cariótipo: 69,XXX**

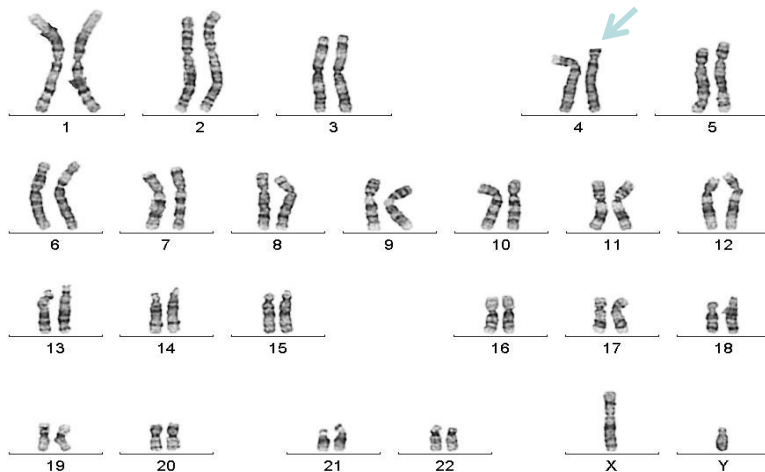
**Teste diagnóstico: Cariotipo/MLPA**

## 2. Anomalias Cromossômicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais

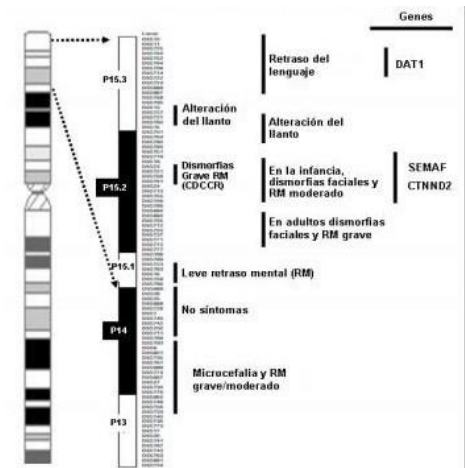
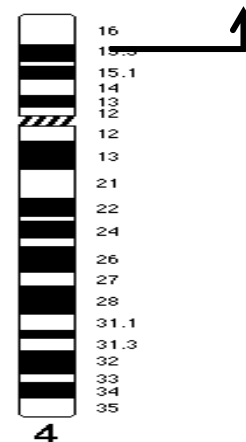
#### ✓ Síndrome de Wolf-Hirschhorn (OMIM#194190)

- Incidência de 1/50 000 RN
- 90% casos são *de novo*
- Deleção no Cr.4 (p16.3), com perda de vários genes



**Cariótipo:** 46,XY,del(4)(p15.2)

**Região deletcionada**



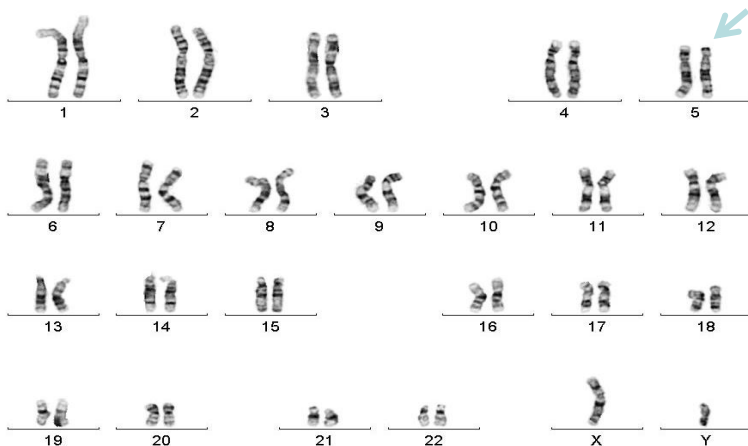
**Teste diagnóstico:** Array/Cariotipo

## 2. Anomalias Cromossômicas e Síndromes mais frequentes

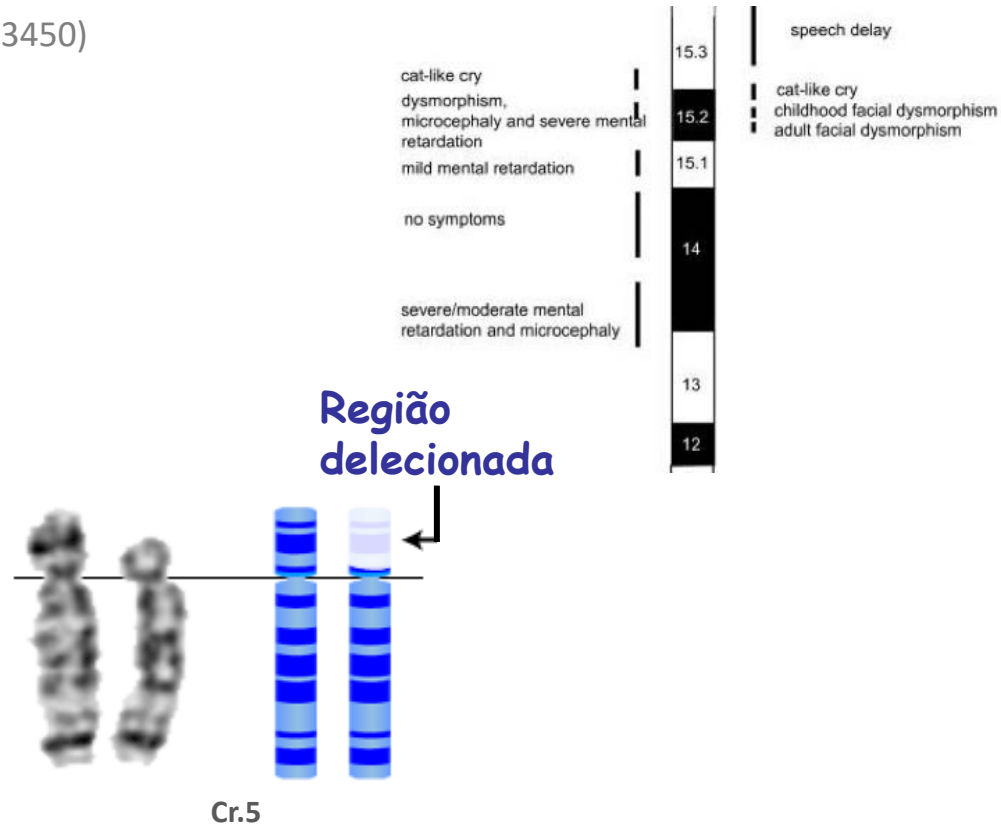
### ➤ Anomalias Estruturais

#### ✓ Síndrome de Cri-du-chat (OMIM#123450)

- Incidência de 1/50 000
- 90% dos casos são *de novo*
- Deleção no Cr.5 (p15.2), com perda de múltiplos genes



**Cariótipo: 46,XY,del(5)(p14)**



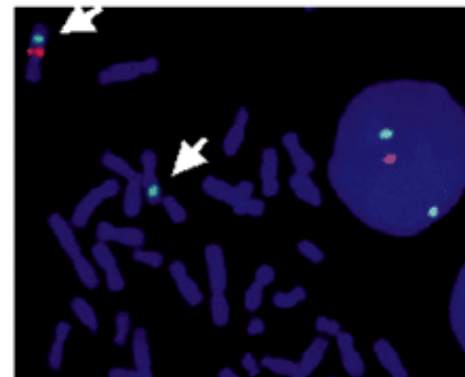
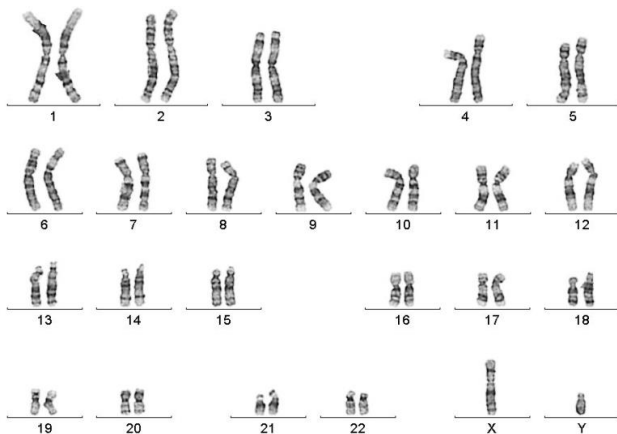
**Teste diagnóstico: Array/Cariotipo**

## 2. Anomalias Cromossômicas e Síndromes mais frequentes

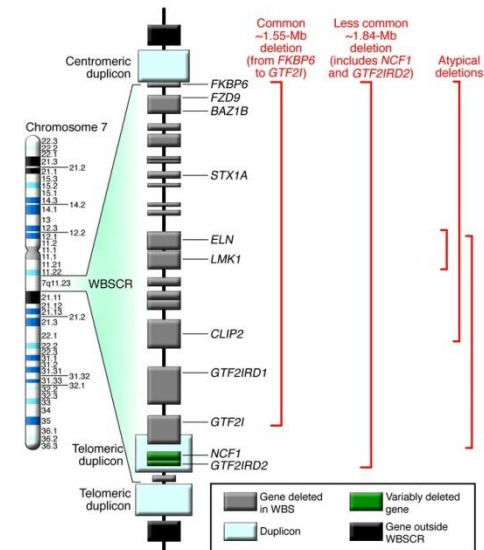
### ➤ Anomalias Estruturais – Síndromes Microdeleção

#### ✓ Síndrome de Williams-Beuren (OMIM#194050)

- Incidência de 1/20 000 a 1/50 000
- 90-95% apresentam deleção em 7q11.23 (21 genes)
- O gene da Elastina (*ELN*) parece ser o responsável pela maior parte das características clínicas



ish del(7)(q11.23q11.23) (ELN-)



Cariótipo: 46,XY

Teste diagnóstico: FISH/ Array/Cariotipo

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais – Síndromes Microdeleção

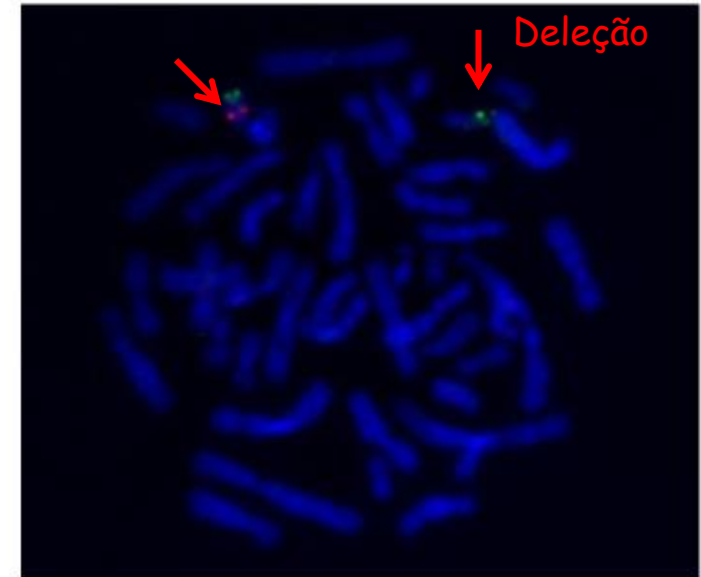
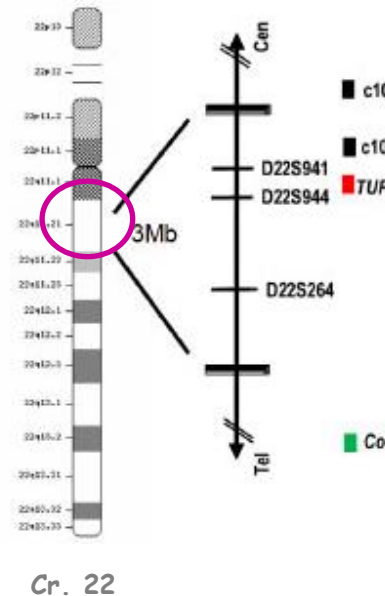
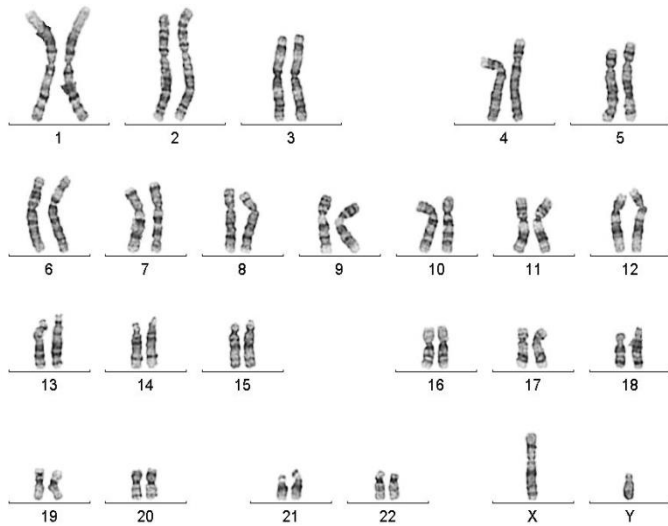
#### ✓ Síndrome de DiGeorge (OMIM#188400)

- Também designada por CATCH 22 (S. Velocardiofacial (VCFS), S. Deleção 22q11.2, S. Craniofacial , S. de Anomalias da face)
- Incidência de 1/1800 n.v.
- Causada por microdeleção em 22q11.2 (*TBX1 e TUPLE1*)
- Espectro semelhante podem ter deleção no Cr.10p14, 4q35,8p23, 9q34, 17p13 e 22q13
- 93% dos casos são de novo

## 2. Anomalias Cromossômicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais – Síndromes Microdeleção

#### ✓ Síndrome de Deleção DiGeorge



**Cariótipo: 46,XY**

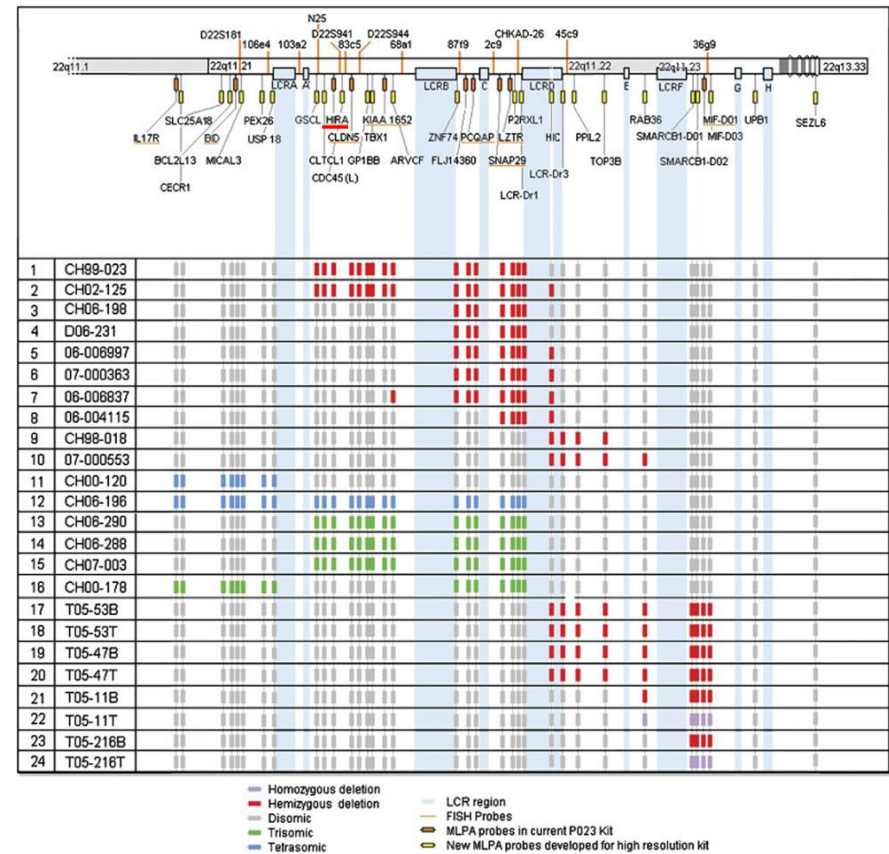
Análise por **FISH** em que se observa a ausência de sinal num dos cr.22, evidenciando a **deleção**

## 2. Anomalias Cromossômicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais – Síndromes Microdeleção

#### ✓ Síndrome de DiGeorge

- Cerca de 70% das deleções em 22q11.2 são detetáveis pela técnica de FISH (TUPLE1)
- Existem deleções “atípicas” em 22q11.2 (+/- 30%), detetáveis por MLPA
- Todas as deleções em 22q11.2 são detetáveis por Array.



Teste diagnóstico: **MLPA/FISH/Cariotipo/Array**

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais – Síndromes Microdeleção

#### ✓ S. Prader-Willi (OMIM#176270)

- Incidência - 1/10 000 – 1/15 000
- Etiologia
  - Deleção em 15q11-13
  - Deleção paterna (70%-75%)
  - UPD materna (25%)
  - Outras alterações no cr. 15 paterno (3%-4%)
  - Alteração padrão de metilação(5%)

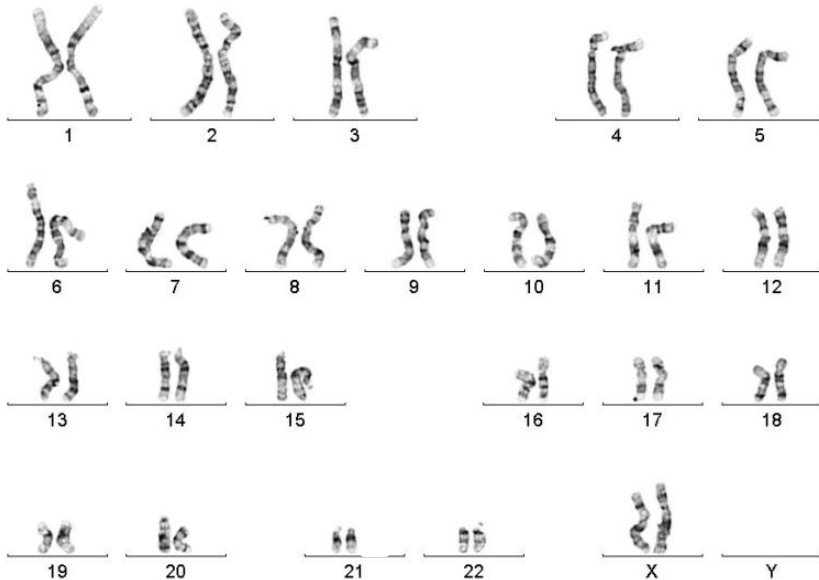
#### ✓ S. Angelman (OMIM#105830)

- Incidência 1/20 000
- Etiologia
  - Deleção em 15q11-13
  - Deleção materna (70%)
  - Mutações no gene UBE3A mat(25%)
  - UPD paterna (2%)
  - Alteração padrão de metilação(3%)
  - Alteração genética não identificada (5-10%)

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais – Síndromes Microdeleção

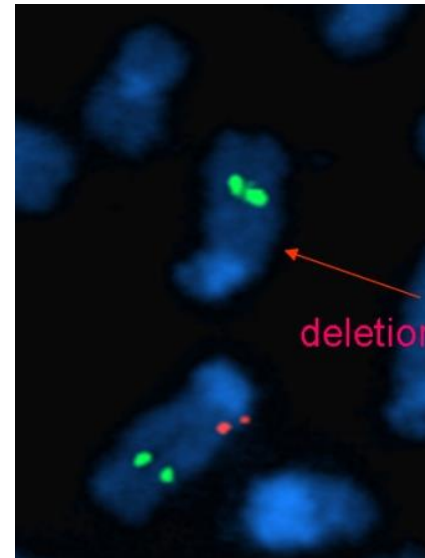
#### ✓ S. Prader-Willi/S. Angelman



**Cariótipo: 46,XX**

≈(5%)

**Teste diagnóstico: MS-MLPA/FISH/Array/Cariotipo**



Análise por **FISH**, com sonda de sequência única em que se observa a ausência de sinal num dos cr.15, evidenciando a **deleção**.

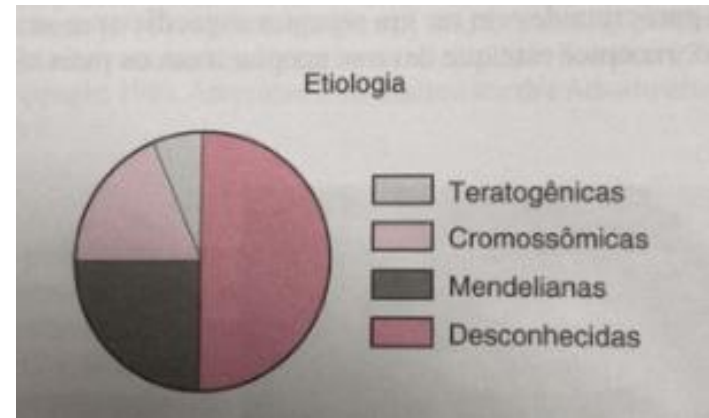
≈(70%)

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais

### ✓ Síndromes Polimalformativos Inespecíficos/Atraso Mental

- Conjunto de malformações congénitas sem constituir um síndrome reconhecido
- Atraso mental de etiologia desconhecida
- Têm etiologia variada/desconhecida
- Podem ter etiologia cromossómica



(Thompson & Thompson, 2002)

### Teste diagnóstico: **Array/Cariotipo**

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

- ✓ Alguns Síndromes Específicos podem ser identificados com o **Cariótipo**
- ✓ Os Síndromes Específicos de Microdeleção/Microduplicação raramente são identificáveis com a realização Cariótipo; são identificáveis com técnicas de **Microarray**, **FISH** utilizando sondas específicas e por **MLPA**
- ✓ Os Síndromes Malformativos Inespecíficos e/ou Atraso Mental são identificáveis por **Microarray**

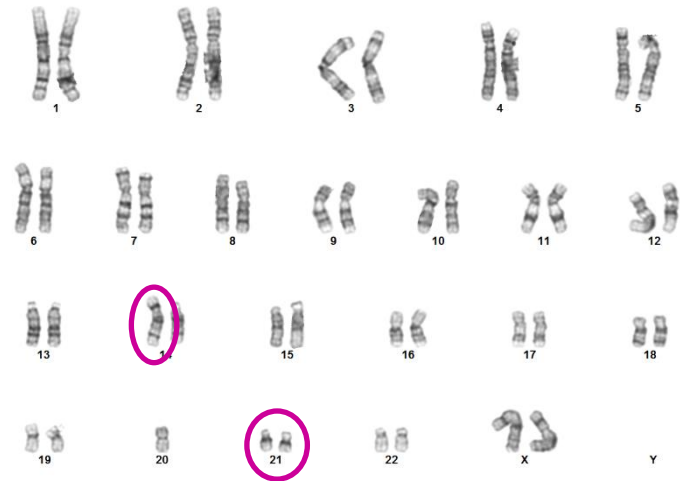
### 3. Apresentação de casos práticos

#### #1 – Pós- Natal

RN, feminino, 7d

Inf. Clínica: Fenótipo sugestivo Down

Teste pedido: **Cariotipo**



#### Relatório:

**Cariotipo:** 46,XX,+21,der(14;21)(q10;q10)

O estudo revelou a existência de um cariotipo anormal, em que um dos cromossomas 14 se encontra substituído por um cromossoma de conformação anómala, compatível com uma translocação Robertsoniana entre um dos cromossomas 14 e um dos cromossomas 21, em todas as células examinadas, num indivíduo do sexo feminino. Esta constituição cromossómica determina a trissomia do cromossoma 21, o que é compatível com o **Síndrome de Down**, concordante com o diagnóstico clínico.

Sugere-se o estudo dos progenitores de forma a verificar se a alteração cromossómica encontrada é *de novo* ou herdada.

Sugere-se igualmente o Aconselhamento Genético ao doente e caso se verifique uma situação reprodutiva deste indivíduo, deverá efetuar-se a realização de Diagnóstico Pré-Natal.

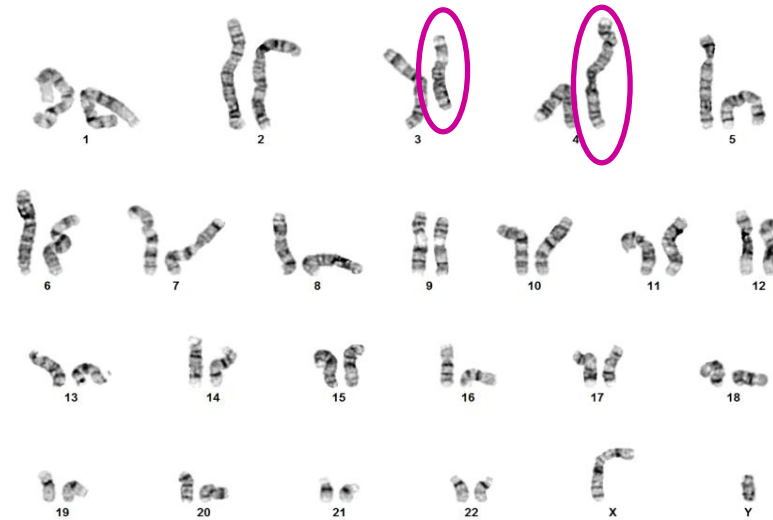
### 3. Apresentação de casos práticos

#### #2 – Pós- Natal

Masculino, 32 A

Inf. Clínica: Casal com AE

Teste pedido: **Cariotipo**



**Relatório:**

**Cariotipo: 46,XY,t(3;4)(q22;q33) pat**

O estudo revelou a existência, em todas as células examinadas, de um rearranjo estrutural interpretado como uma translocação recíproca e aparentemente equilibrada, entre o braço longo de um dos cromossomas 3 e o braço longo de um dos cromossomas 4, cujos pontos de quebra parecem ser em 3q22 e 4q33, num indivíduo do sexo masculino. Este rearranjo é compatível com o observado no estudo citogenético do pai, de acordo com a cópia do relatório do mesmo disponibilizada pelo utente (a 30/06/2020).

Os indivíduos portadores apresentam um risco considerável de ter descendência com síndromes pol imformativos e/ou atraso mental (Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 2012. Gardner, Sutherland & Shaffer. 4 th ed). Dado que o doente veio referenciado por AE, não é de excluir correlação entre a indicação clínica e a alteração cromossómica observada.

Sugere-se Aconselhamento Genético, bem como a realização de Diagnóstico Pré-Natal de Anomalias Cromossómicas em futuras gestações do casal.

## 3. Apresentação de casos práticos

### #3 – Pré-Natal

Grávida 30 A; 17S

Amostra: LA

Inf. Clínica: Rastreio Combinado positivo

Testes pedidos: **DRA + Cariótipo**



**DRA:**  $rsa(13)x2,(18)x3,(21,X)x2$

**Cariotipo:**  $46,XX,der(21)t(18;21)$

## 3. Apresentação de casos práticos

### #3 – Pré-Natal

#### Relatório:

Este é um resultado **ANORMAL** para o cromossoma 18 indicando a presença de **trissomia 18 (Síndrome de Edwards)** para um feto do sexo feminino, compatível com a informação clínica.

O estudo revelou a existência de um cariotipo anormal, em que um dos cromossomas 21 se encontra substituído por um cromossoma de conformação anómala, compatível com um cromossoma derivado de translocação entre um cromossoma 18 e um cromossoma 21, em todas as células examinadas num feto do sexo feminino. Esta constituição cromossómica determina **trissomia** do braço longo do **cromossoma 18**. Este resultado confirma o estudo de biologia molecular anteriormente realizado por MLPA.

No sentido de verificar se a alteração cromossómica observada no feto constitui um acontecimento que ocorreu *de novo*, ou se terá sido herdada, modificando assim os riscos daí recorrentes em futuras gestações, solicitamos amostras de sangue periférico dos progenitores.

Sugere-se que o casal seja enviado a uma consulta de Aconselhamento Genético e a realização de Diagnóstico Pré-Natal de Anomalias Cromossómicas em futuras gestações.

### 3. Apresentação de casos práticos

#### #4 – Pós- Natal

4 A, feminino

**Inf. Clínica:** Hiperatividade e défice de atenção; perturbação da linguagem; atraso nas etapas de desenvolvimento; estrabismo

**Teste pedido:** Microarray

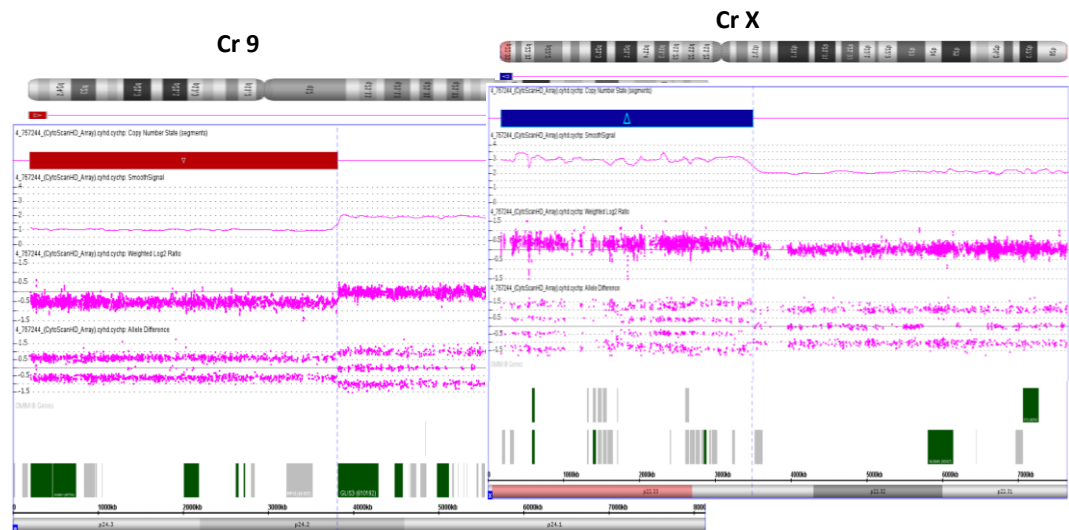
**Relatório:**

**Ganho intersticial** com um tamanho mínimo de 433 Kb, e máximo de 947 Kb, na região 15q13.3 (32003537-32436519). Significado clínico incerto, embora possivelmente patogénico.

**Deleção terminal** com cerca de 3.6Mb em **9p24.3p24.2** (203861-3824004). Significado clínico patogénico.

**Ganho terminal** com cerca de 3.3 Mb na região **Xp22.33** (168546-3489129). Significado clínico incerto, embora num indivíduo do sexo feminino se espere um impacto menor no fenótipo, com um significado clínico possivelmente benigno.

◆ **Cariotipo**

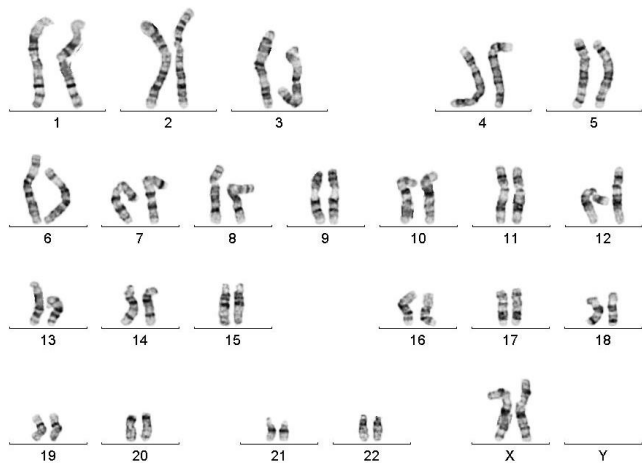


arr[GRCh37]

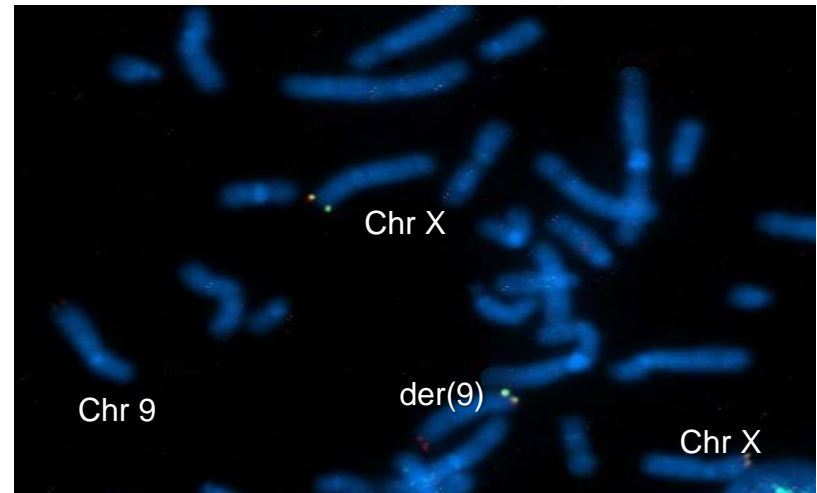
9p24.3p24.2(203861\_3824004)x1,15q13.3(32003537\_32436519)x3,Xp22.33(168546\_3489129)x3

### 3. Apresentação de casos práticos

#### #4 – Pós- Natal



**Cariotipo: 46,XX**



**ish der(9)t(X;9)(p22.33;p24.3p24.2)(305J7-T7-;DXYS129+)**

**Cariotipo: 46,XX.ish der(9)t(X;9)(p22.33;p24.3p24.2)(305J7-T7-;DXYS129+) dn**

**arr[GRCh37] 9p24.3p24.2(203861\_3824004)x1,15q13.3(32003537\_32436519)x3,Xp22.33(168546\_3489129)x3**

#### Relatório:

A análise citogenética não revelou anomalias cromossômicas nas metafases examinadas, sendo o cariotipo normal para um indivíduo do sexo feminino.

Os resultados de **FISH** são compatíveis com a presença de um derivado do cromossoma 9 por translocação entre os braços curtos de um dos cromossomas 9 e de um dos cromossomas X.

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais

#### #5 – Pós- Natal

10 A, Masculino

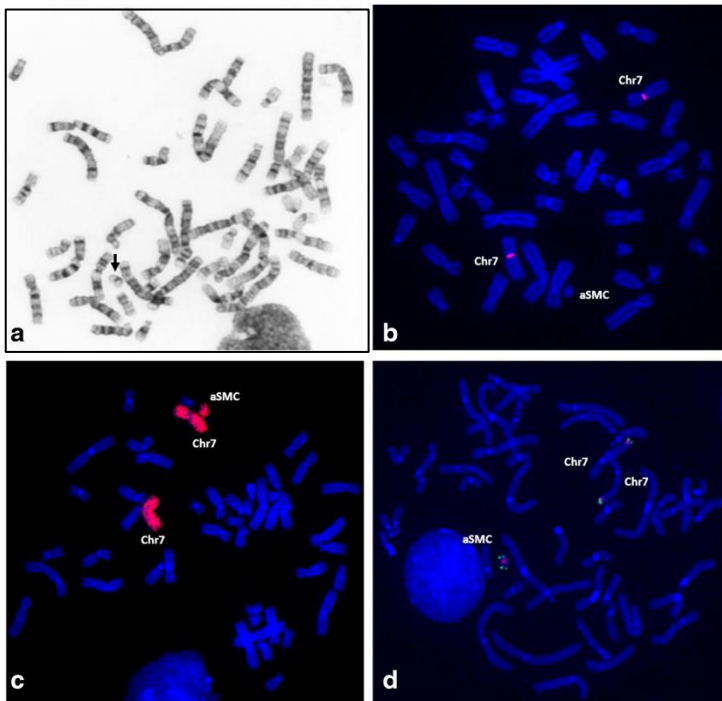
**Inf. Clínica:** AD severo, sem aquisição de linguagem, auto-agressividade;  
dismorfias faciais; infecções respiratórias recorrentes

**Teste pedido:** Cariotipo/ array

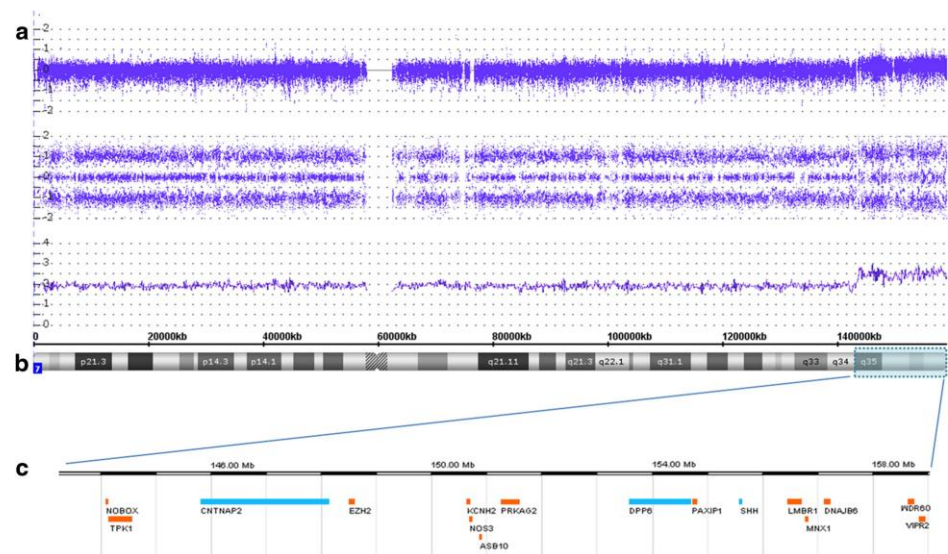
## 2. Anomalias Cromossômicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais

#### #5 – Pós- Natal



Metáfase parcial evidenciando SMC; sonda  $\alpha$ -satelite para cr 7 ausente no SMC; presença de WCP (7) no SMC; BAC RP11-298A10 e sonda subtele 7q caracterizando o SMC como invdup envolvendo a região terminal do cr 7 (7q35-qter)



Perfil SNParray para o cr 7 evidenciando ganho na região terminal

**Cariotipo:** mos 47,XY,+mar dn[73]/46,XY[27].ish

invdup(7)(qter→

q35::q35→neo→qter)(wcp7+,D7Z1-,RP11-298A

10++,TelVysion7q++).arr[GRCh37] 7q35q36.3(14321895

4x2,143594973\_159119707x4)

## 2. Anomalias Cromossómicas e Síndromes mais frequentes

### ➤ Anomalias Estruturais

#### #5 – Pós- Natal

Case Reports > Mol Cytogenet. 2016 Nov  
eCollection 2016.

### Molecular Characterization of a Supernumerary Marker Chromosome 7q35 → Qter: A Case Report

Bárbara Marques<sup>1</sup>, Cristina Ferreira<sup>1</sup>, Filomena Lourenço<sup>2</sup>, Marta Amorim<sup>2</sup>, Hildeberto Correia<sup>2</sup>

Affiliations + expand

PMID: 27924152 PMCID: PMC5123314 DOI: 10.1007/s12031-016-0987-4

[Free PMC article](#)

#### Abstract

**Background:** Analphoid supernumerary marker chromosomes (aSMC) are groups of SMC, and are characterized by a centromere and DNA. These marker chromosomes cannot be produced naturally and molecular cytogenetic methods are used for their identification.

Marques et al. *Molecular Cytogenetics* (2016) 9:87

Page 4 of 7

Mendelian Error Check tool and the parental origin of the aSMC was determined using MyPODFinder v.1.0.

#### Results

Cytogenetic analysis revealed a mosaic karyotype with the presence of a SMC, *de novo*, in 20% of lymphocytes and 73% of skin fibroblast cells (Fig. 2a).

FISH analysis with alpha-satellite probes for all chromosomes indicated that the SMC was an analphoid marker (Fig. 2b), while the presence of euchromatic material was revealed with whole chromosome painting probe for chromosome 7 (Fig. 2c). cCGH analysis indicated that the euchromatic material had origin in the 7q35-qter region (data not shown). Hybridization with RP11-298A10 and subtelomeric 7q probes, allowed establishing that the aSMC results of an invdup rearrangement of 7q35-qter region (Fig. 2d).

Affimetrix CytoScan HD array analysis redefines the aSMC to a region of about 15.42 Mb enclosing 67 OMIM genes, 16 of which are associated to disease (Fig. 3). Trio analysis of the patient and his parents

excluded the presence of UPD 7 and indicated a maternal origin of the aSMC.

Based on these results, the karyotype was established as:

46,XY,+mar dn[73]/46,XY[27].ish invdup(7)(qter → q35::q35 → neo → qter)(wcp7+,D7Z1-,RP11-298A10+,TelVysion7q++).arr[GRCh37] 7q35q36.3(14321895-14321895)\_159119707x4).

#### Discussion

When an SMC is discovered in a current cytogenetic analysis, its identification can be a challenging task if using FISH only. The best approach to study an SMC with euchromatic material is to use DNA microarray to determine its origin, involved region and size, followed by FISH for its characterisation. In our case, the SMC identification and characterization was made by FISH and cCGH. Afterwards, SNParray was done to mapping at submicroscopic level the genomic imbalance, to exclude the presence of UPD and to determine the parental origin. This allowed the characterization of an aSMC,

# *A Citogenética nas Doenças Hematológicas Malignas*

1. Análise citogenética aplicado a doenças hematológicas malignas
2. Cariótipo vs Hibridação *in situ* por fluorescência (**FISH**)
3. Anomalias cromossómicas mais frequentes em doenças hematológicas malignas

# Análise citogenética

Estudo do cariótipo medular para pesquisa alterações cromossómicas clonais em:

- Aplasias medulares (constitucionais e adquiridas)
- Leucemias mielóides e linfoblásticas agudas
- Síndrome mielodisplásicos
- Neoplasmas mieloproliferativos (Leucemia mielóide crónica)
- Neoplasias de células B (doenças linfoproliferativos crónicos)
- Linfomas Hodgkin e não Hodgkin

## Quando se deve fazer?

- Alterações hematológicas periféricas persistentes cujo diagnóstico clínico é difícil de estabelecer
- No início de uma doença hematológica maligna e pré-maligna
- No decurso da evolução da doença
- Pós-terapêutica
- No agravamento da doença
- Sempre que se suspeite de uma recaída



## Em que consiste?

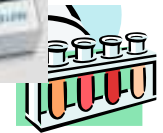
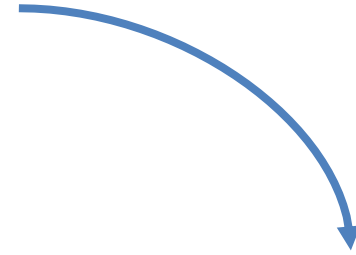
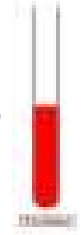
Consiste no estabelecimento de culturas de medula óssea de doentes com patologias hematológicas, com vista á obtenção de células em metafase que após coloração com técnicas de bandeamento permitam a visualização ao microscópio óptico dos cromossomas e suas alterações, determinando assim o cariótipo.



**1. Medula chega ao laboratório**



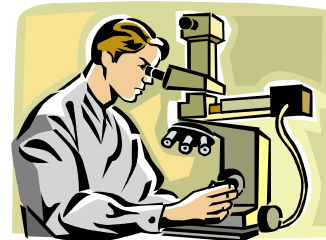
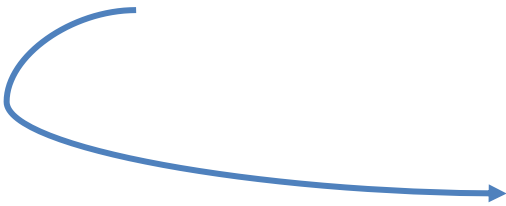
**2. Medula em cultura e incubação**



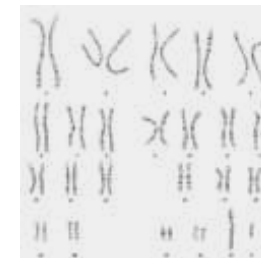
**3. Medula sofre choque hipotónico e centrifugação – Obtenção células fixadas**



**4. Espalhamento em lâminas das metafases**



**5. Após coloração, faz-se a análise microscópica**



**6. cariótipo**

## Dificuldades:

### Com a amostra

- **Volume da amostra**
- **Qualidade da amostra**
- **Transporte da amostra**
- **Informação clínica**

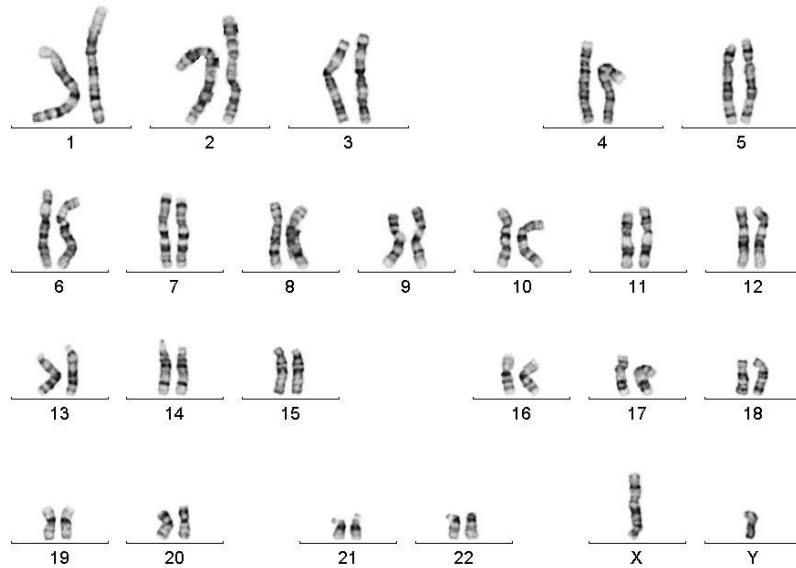
### Com a cultura

- **Baixo índice mitótico**
- **Obtenção de metafases condensadas e cromossomas contraídos (150 a 300 bandas por conjunto haplóide)**
- **Culturas que não fornecem metafases**
- **Culturas que devido à fraca divisão do clone celular anormal, este não é detetável**

## Com a análise microscópica

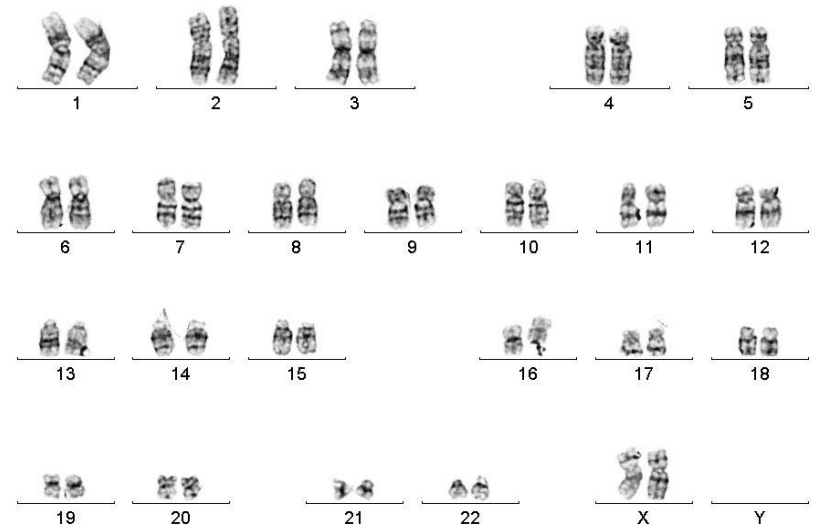
- **Reduzido número de metafases analisáveis**
- **Cromossomas de contornos pouco definidos**
- **Cromossomas contraídos que não permitem detetar micodelecções**

## Cariótipo de sangue periférico



**46,XY**

## Cariótipo de medula óssea



**46,XX**

## Com a análise microscópica

- **Reduzido número de metafases analisáveis**
- **Cromossomas de contornos pouco definidos**
- **Cromossomas contraídos que não permitem detetar microdelecções**
- **Cromossomas marcadores e rearranjos cromossómicos complexos difíceis de identificar pelas técnicas de citogenética convencional**

## Resultados:

- Analisar 30 metafases e cariotipar no mínimo 10
- Analisar metafases de boa e má qualidade
- Nunca se deve dar um resultado com base na análise de metafases provenientes de uma única cultura
- Sempre que se detete uma alteração clonal numa cultura, esta deve ser confirmada noutra cultura
- Analisar maior número de metafases se o doente sofreu terapia citotóxica
- Sempre que se detecte uma alteração cromossómica, suspeita de ter origem constitucional, deve-se analisar o sangue periférico do doente para confirmação
- Os resultados são expressos de acordo com o ISCN – International System for Human Cytogenetics Nomenclature

## Vantagens:

- **Permite o estudo de todo o genoma**
- **Permite a deteção de alterações cromossómicas clonais ainda antes do aparecimento das manifestações hematológicas típicas da doença**
- **Tem um limite de resolução da ordem de 5Mb**
- **Permite estabelecer o cariótipo**

## Metafase de medula óssea



**46,XX**

# Análise por *FISH*

- **Confirmação de resultados citogenéticos**
- **Esclarecimento de rearranjos complexos**
- **Estudo de anomalias não visíveis citogeneticamente**

ex: microdelecções

Rearranjos cripticos

- **Pesquisa de linhas celulares de baixa expressão**

ex: mosaicos

doença residual mínima

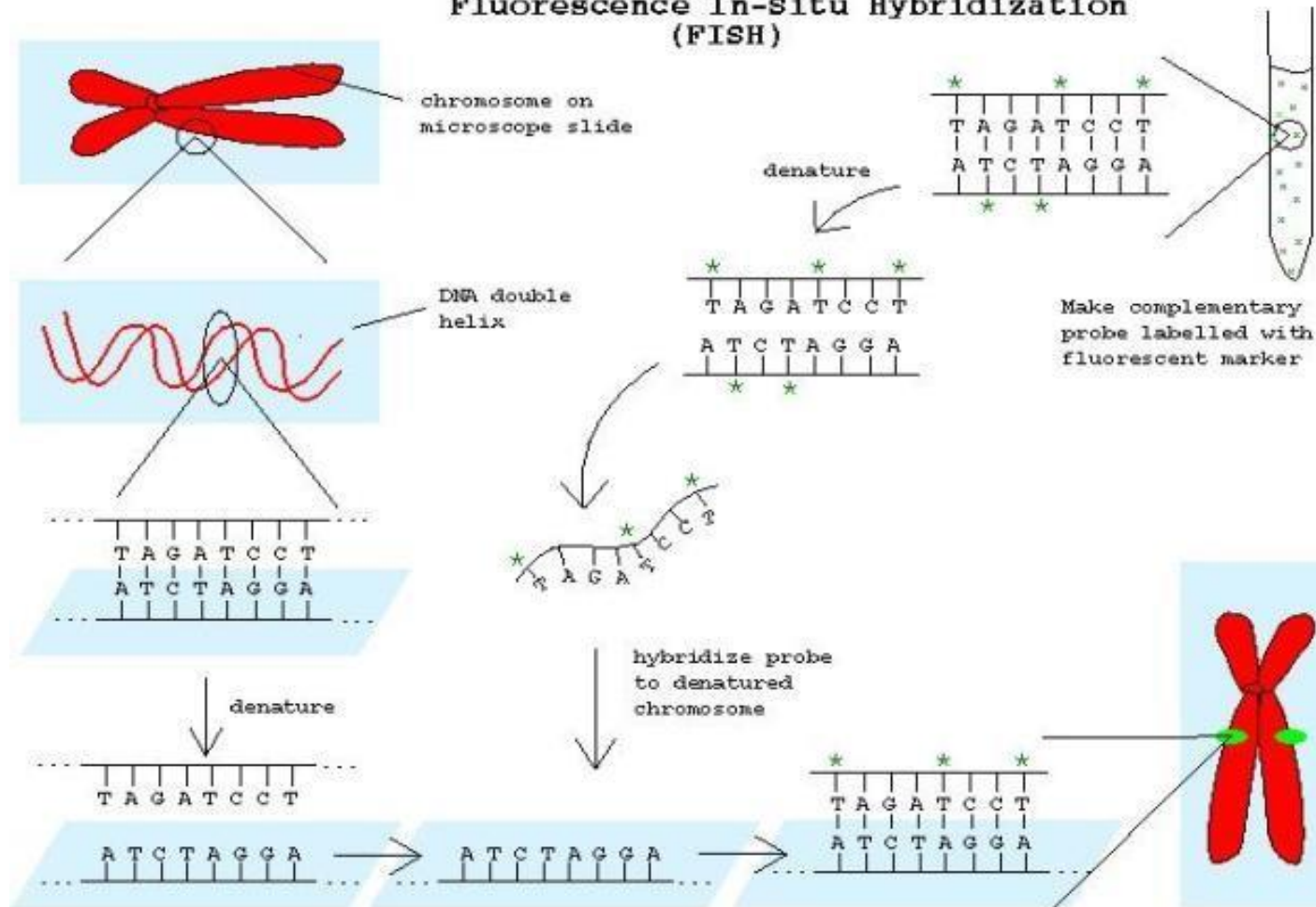
deteção de aneuploidias

## Em que consiste?

Consiste na obtenção de um sinal visível ao microscópio, resultante da hibridação de uma sonda marcada, com a sequência complementar de ácidos nucleicos ( DNA ou RNA), presente no material em estudo.

Possibilita a demonstração morfológica e a localização de sequências específicas de DNA ou RNA, em secções de tecidos, suspensões celulares ou preparações cromossómicas preservadas.

### Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH)

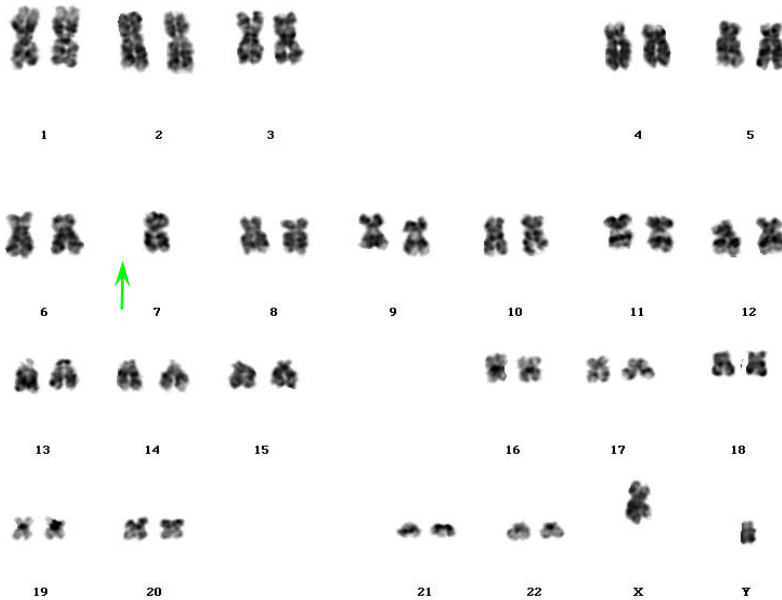


## Vantagens:

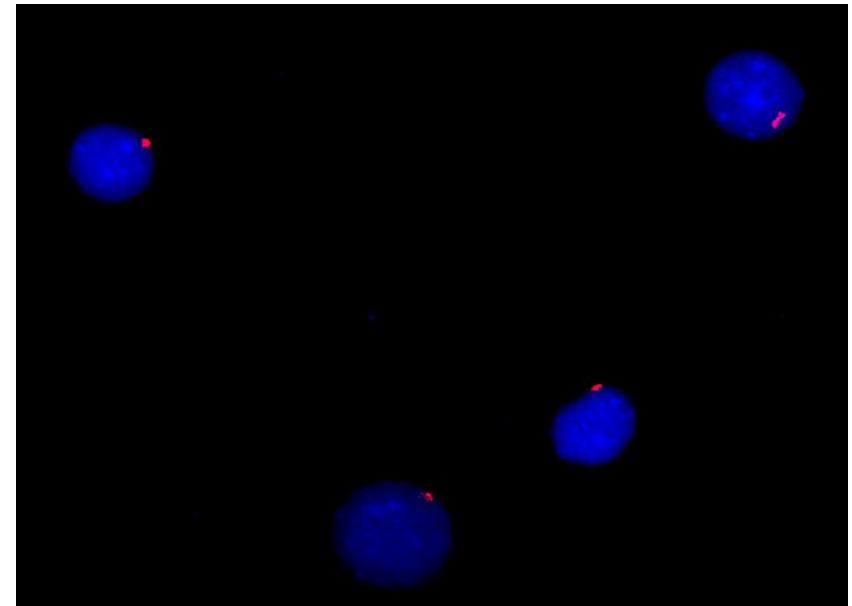
- **Permite o estudo em interfases e a análise de amostras não cultivadas**
- **Permite a contagem de um maior número de células**
- **Sensibilidade e especificidade elevadas da ordem de 200kb ao genoma total**

# Alterações cromossómicas mais frequentes nas diversas patologias hematológicas

# Síndromes Mielodisplásicas → Leucemia Mielóide Aguda



**45, XY,-7**



**monossomia 7/sonda D7Z1**

# Síndromes Mielodisplásicas; associado a del(5q)



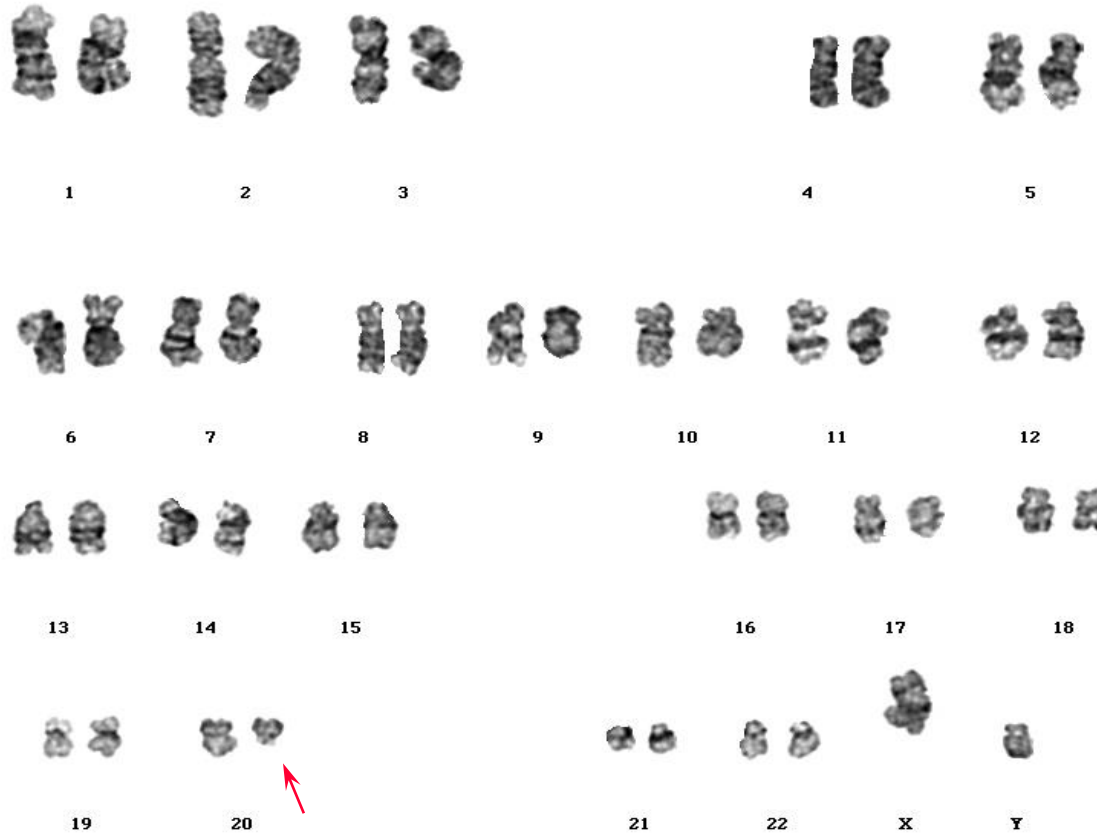
**46,XX,del(5)(q12q31)**

# Síndromes Mielodisplásicas



**47,XX,+8**

# Síndromes Mielodisplásicas



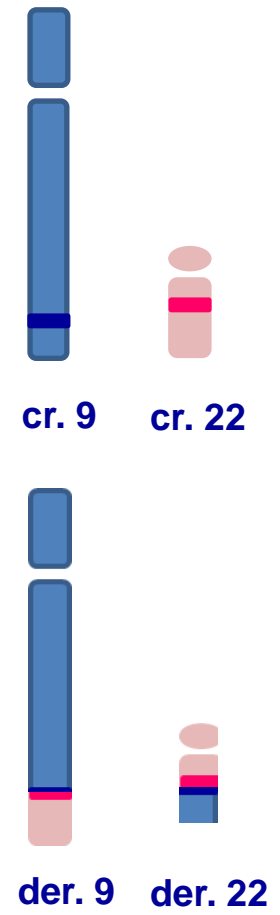
**46,XY,del(20)(q11)**

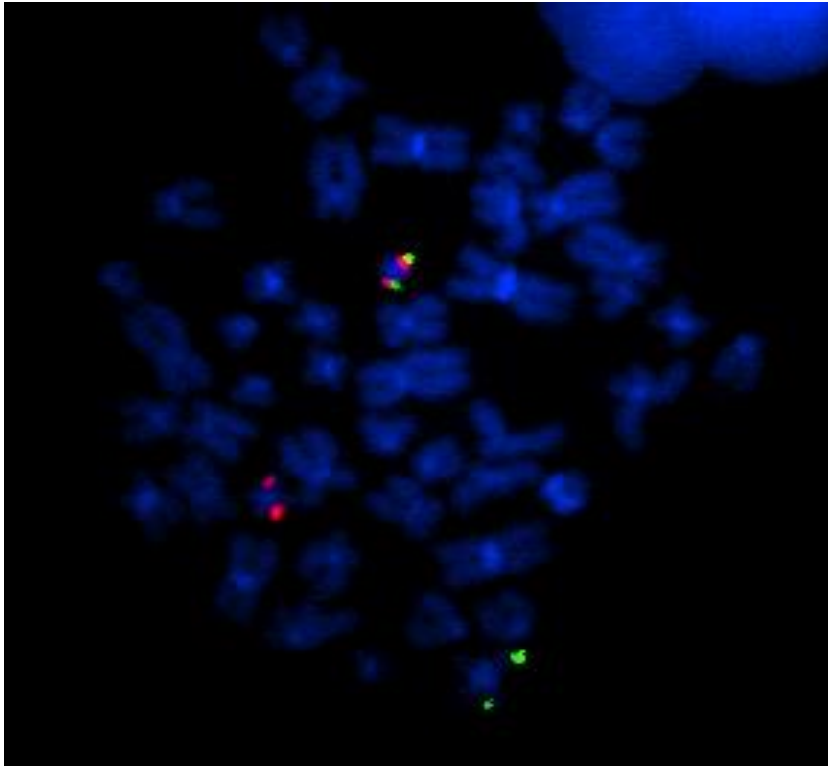
# Neoplasmas Mieloproliferativos; Leucemia Mielóide Crónica

Leucemia Linfoblástica Aguda (9%)

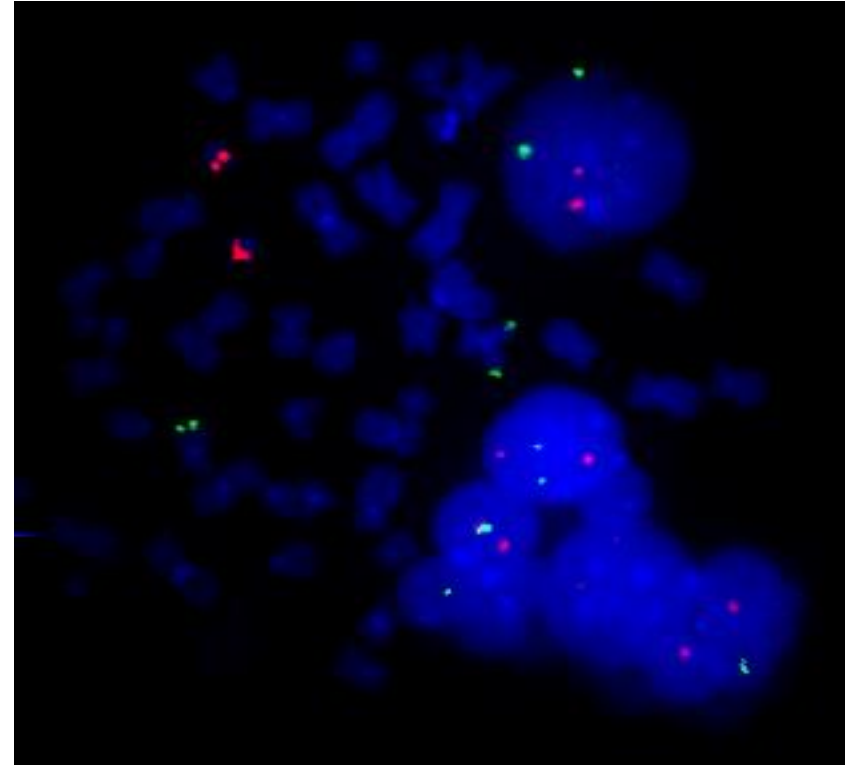


**46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)**





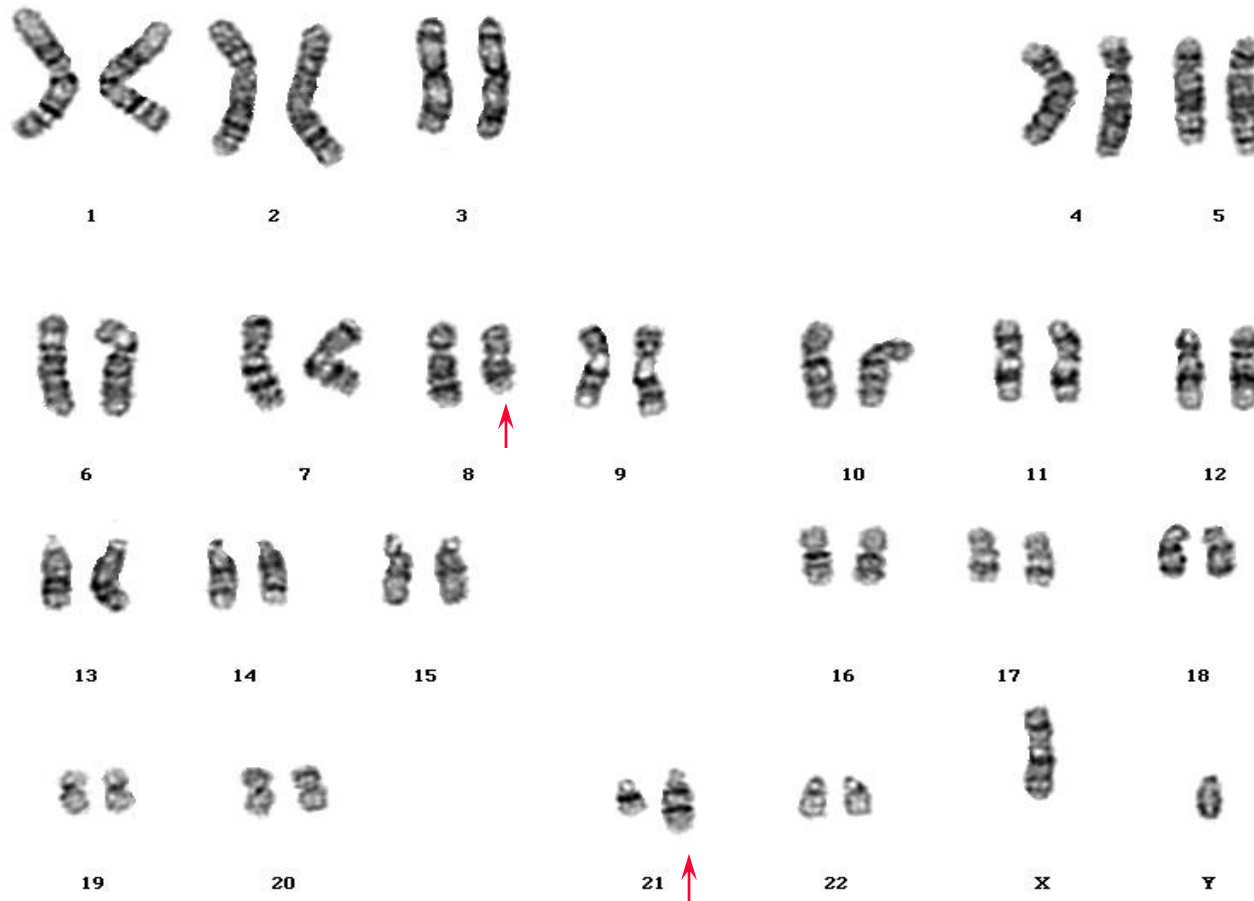
**t(9;22)**



**normal**

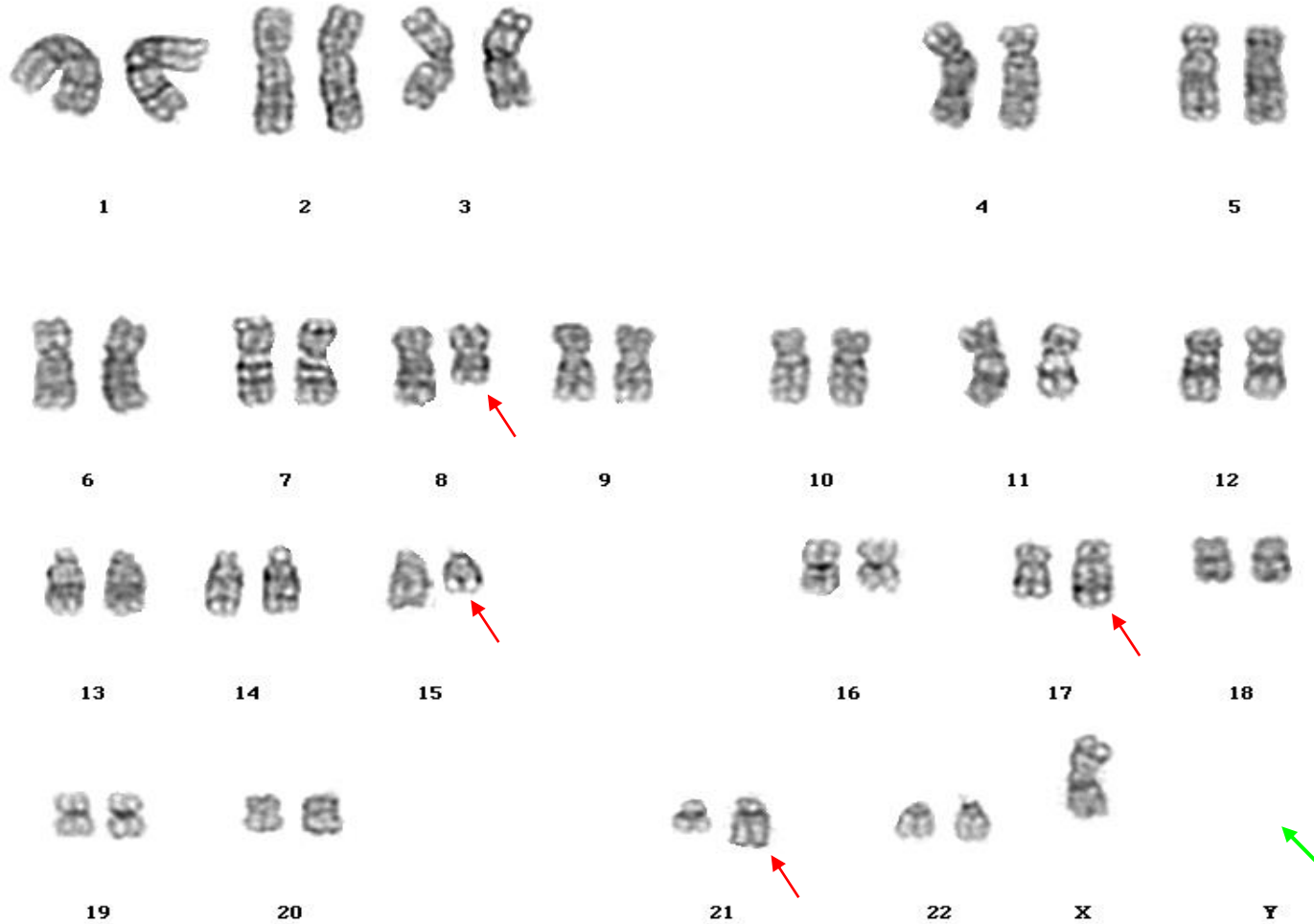
**Sonda para o gene *BCR/ABL1***

# Leucemia Mieloide Aguda (RUNX1/RUNX1T1)

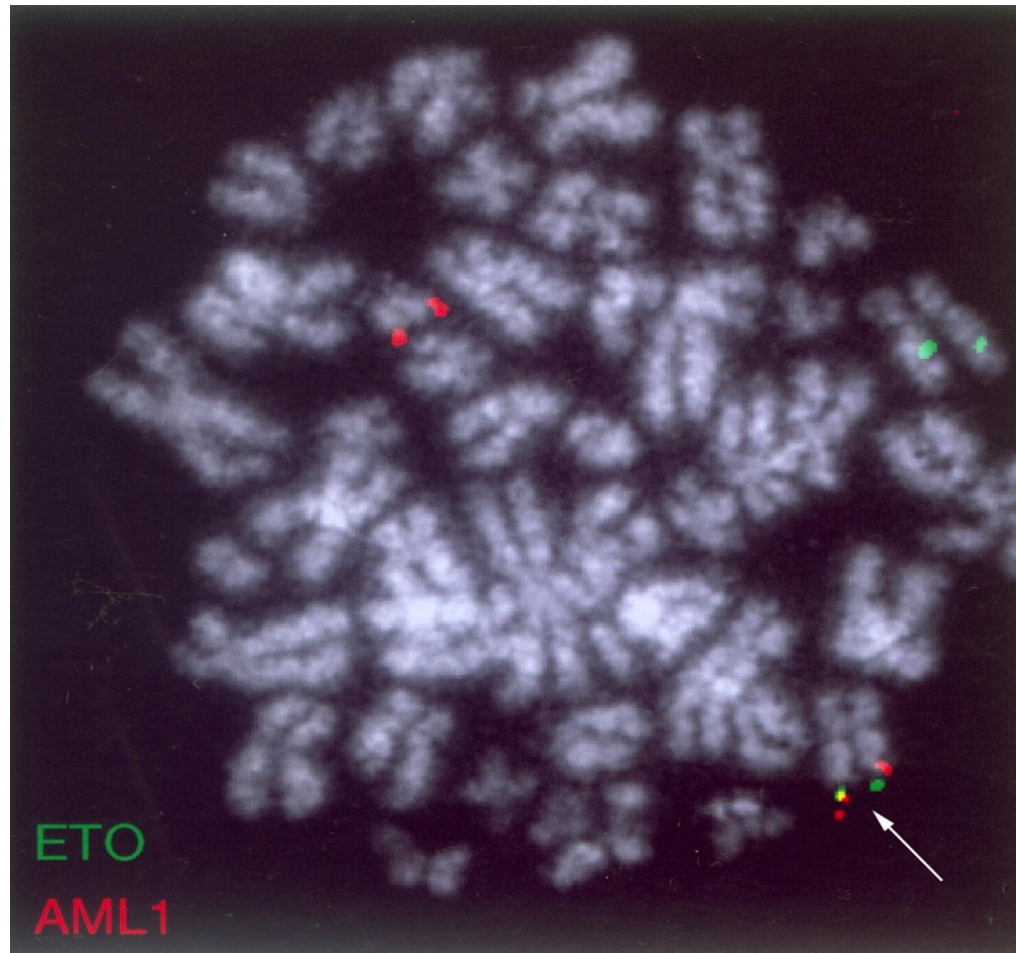


**46,XY,t(8;21)(q22;q22)**

# Leucemia Mieloide Aguda (translocação variante)



**45,X,-Y,t(8;17;15;21)(q22;q23;q15;q22)**

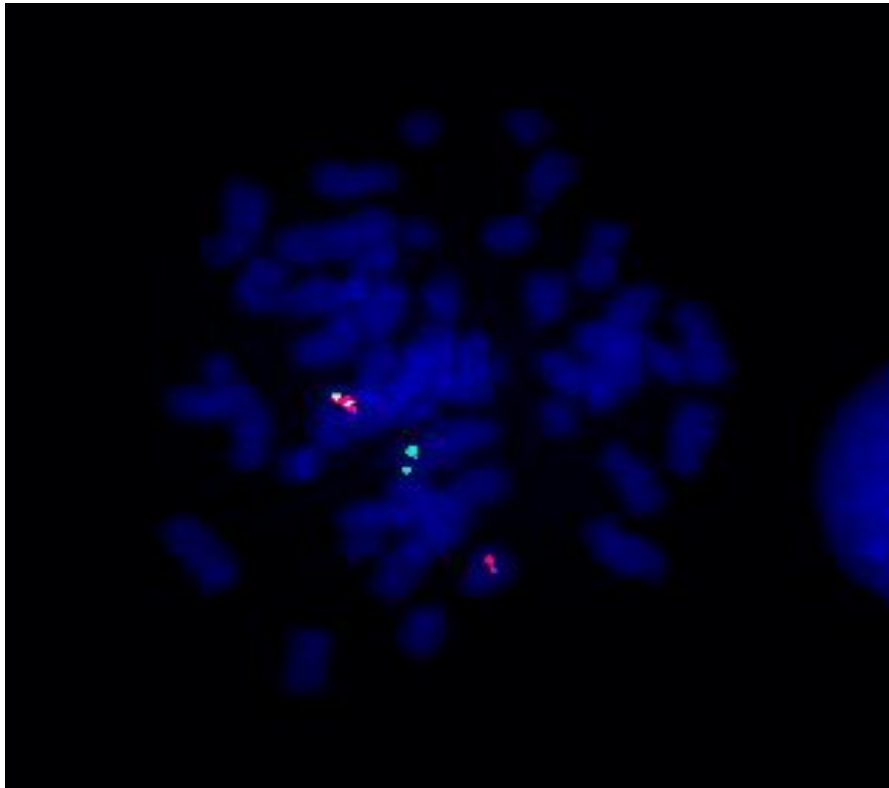


Sondas específicas para os genes  
RUNX1T1(*ETO*) e RUNX1(*AML1*)

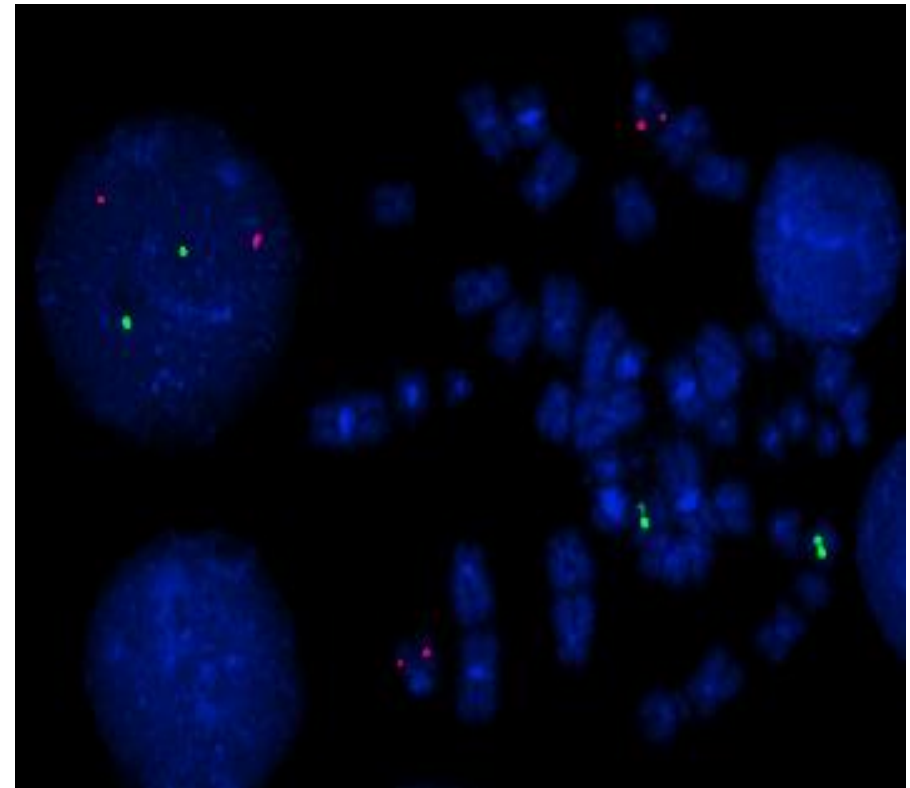
# Leucemia Promielocítica Aguda (PML/RAR $\alpha$ )



**46,XY,t(15;17)(q22;q12)**



**t(15;17)**



**normal**

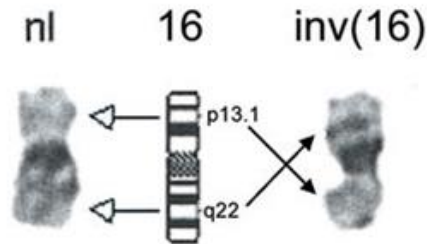
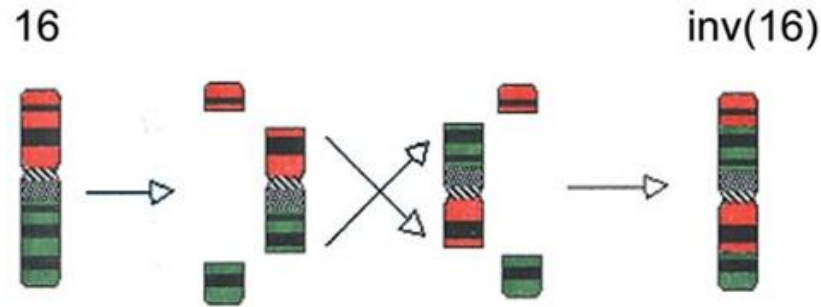
**Sondas específicas para os genes *PML* e *RARα***

# Leucemia Mielóide Aguda (CBFB/MYH11)

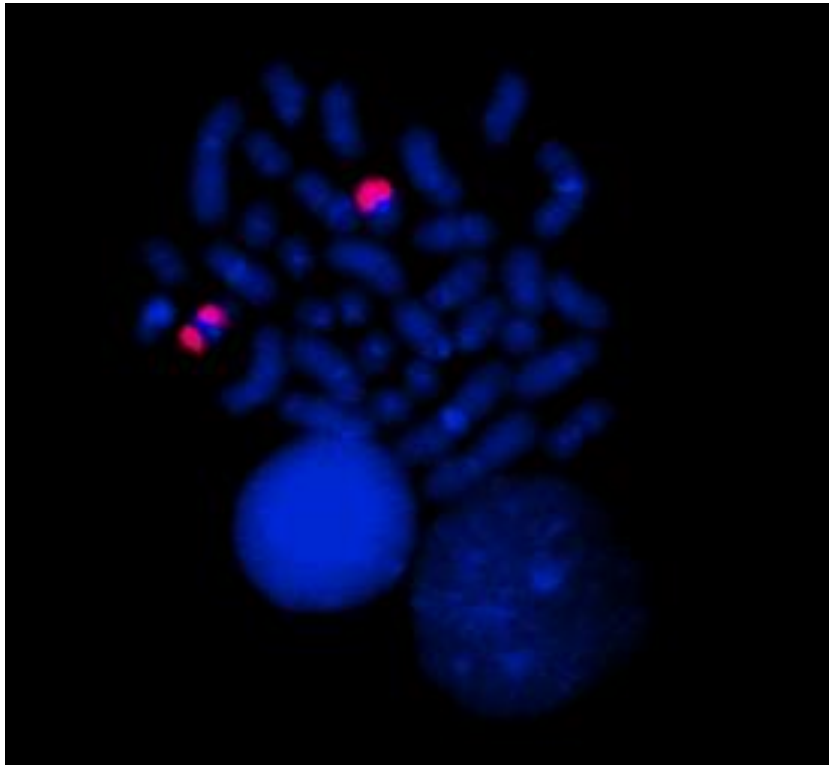


**46,XY,inv(16)(p13q22)**

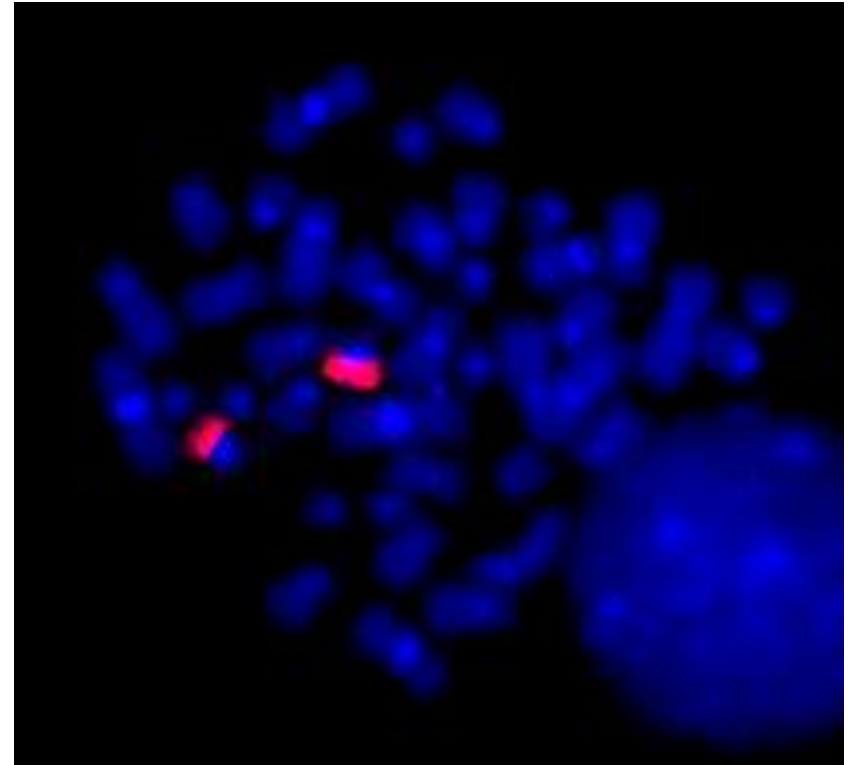
# Leucemia Mieloide Aguda (CBFB/MYH11)



**46,XY,inv(16)(p13q22)**



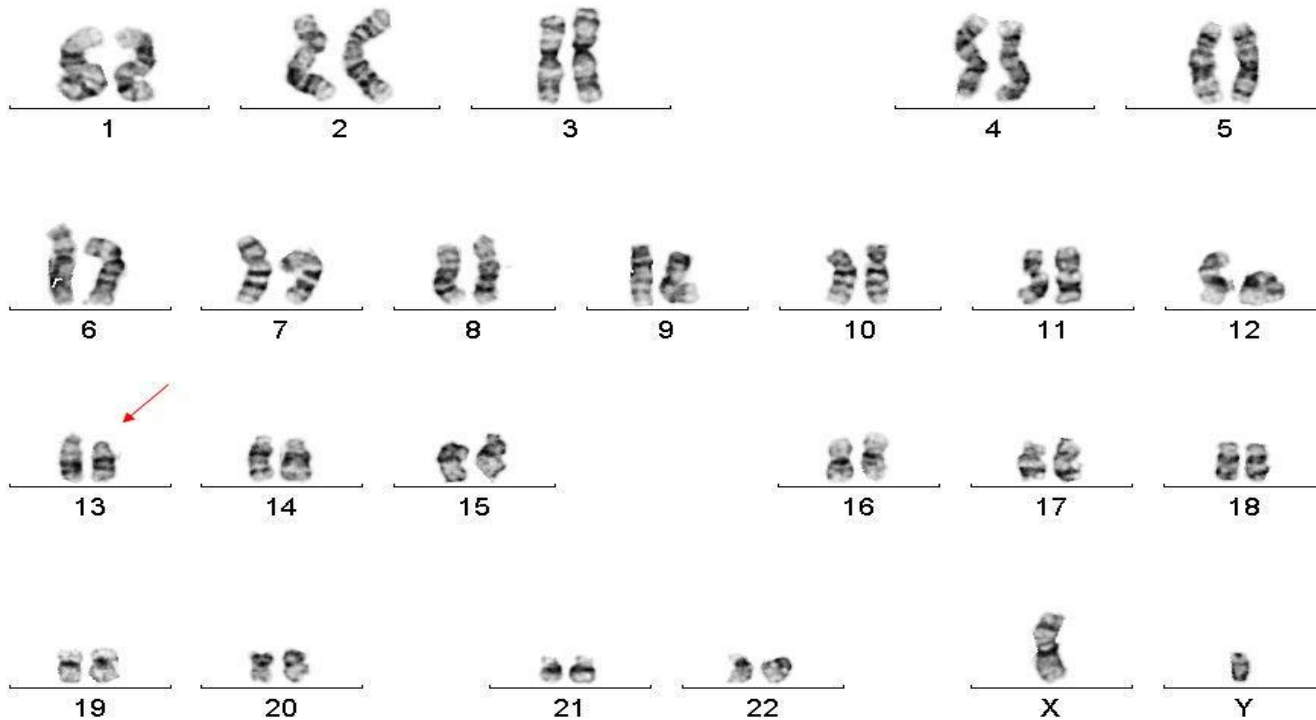
**inv(16)**



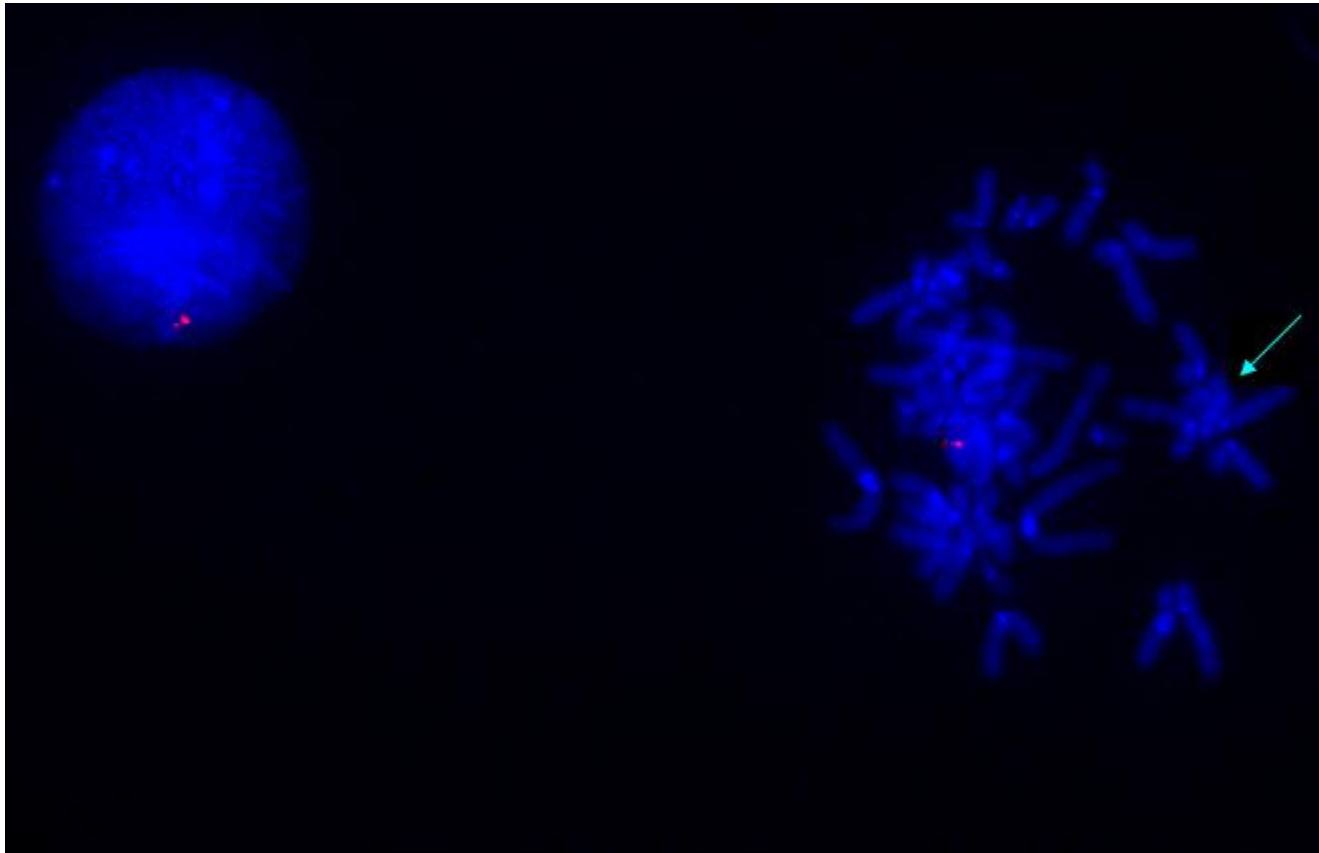
**normal**

## Sonda inv(16)

# Neoplasias de Células B - Leucemia Linfocica crónica Mieloma Múltiplo

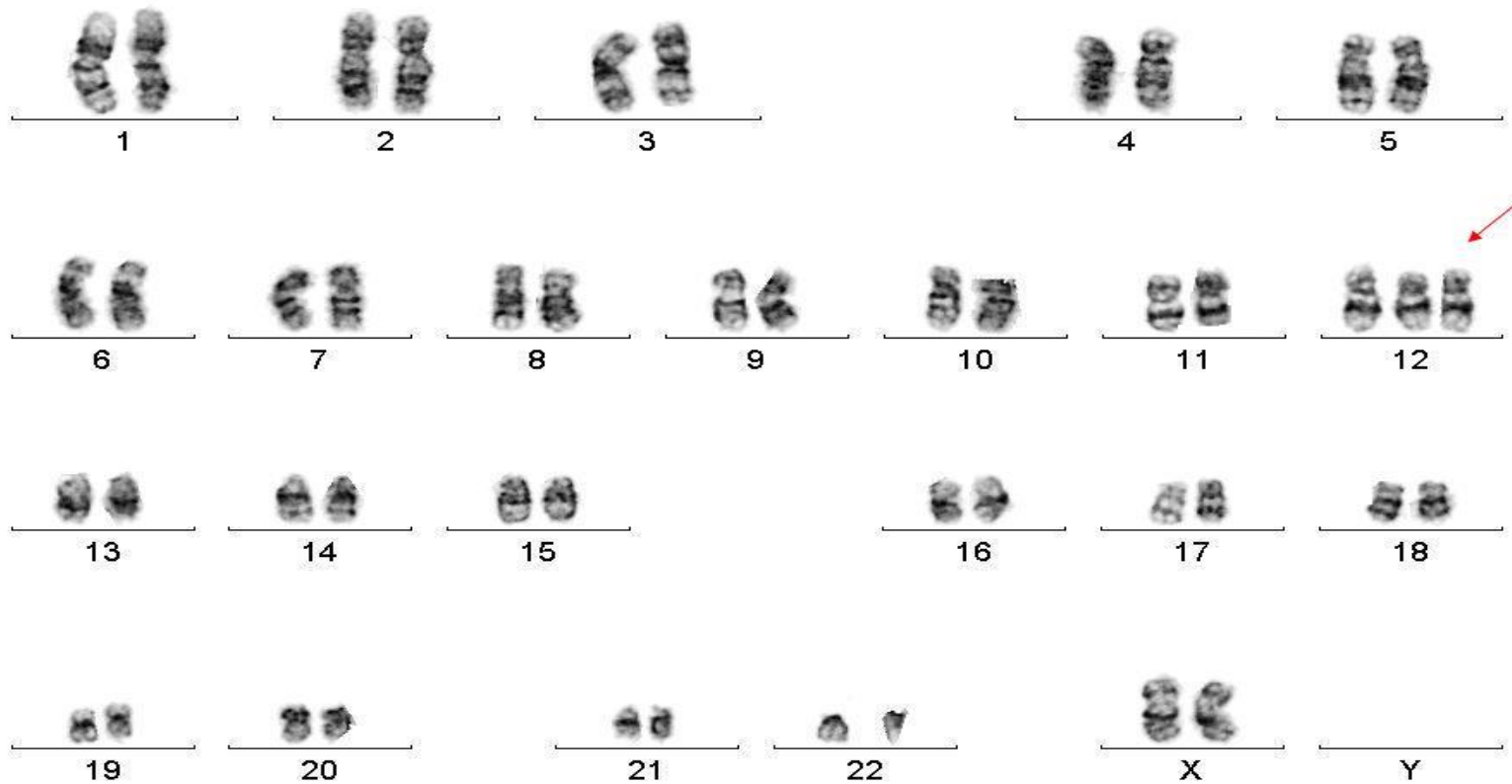


**46,XY,del(13)(q12q14)**

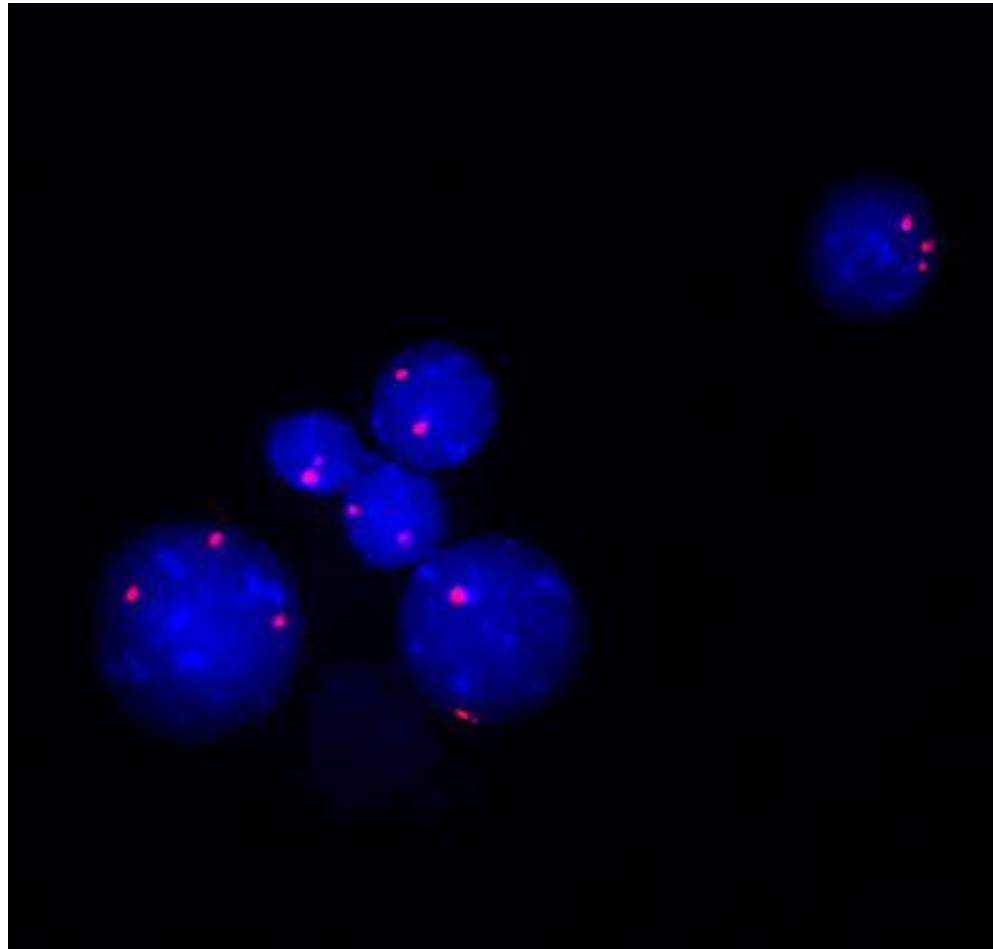


## monossomia parcial do cromossoma 13 / sondaD13S25

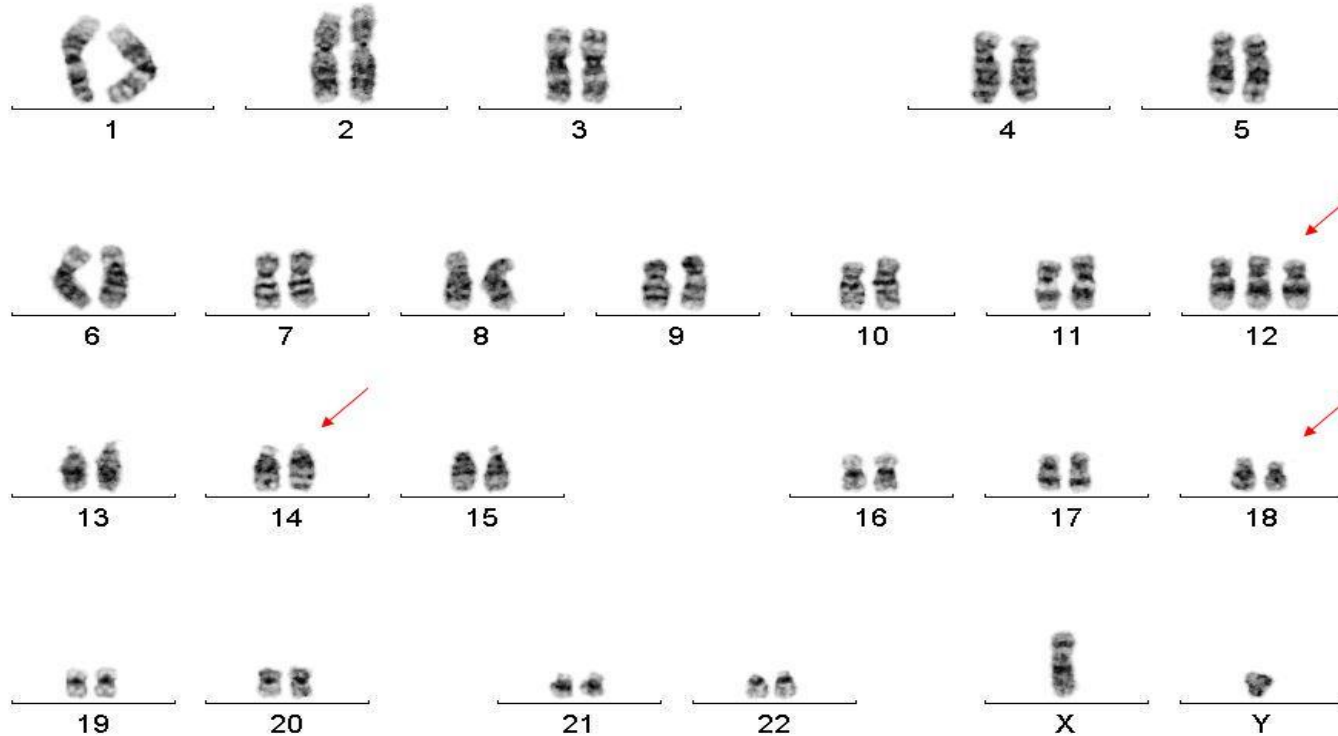
# Neoplasias de Células B; Leucemia Linfocítica Crónica



**47,XX,+12**



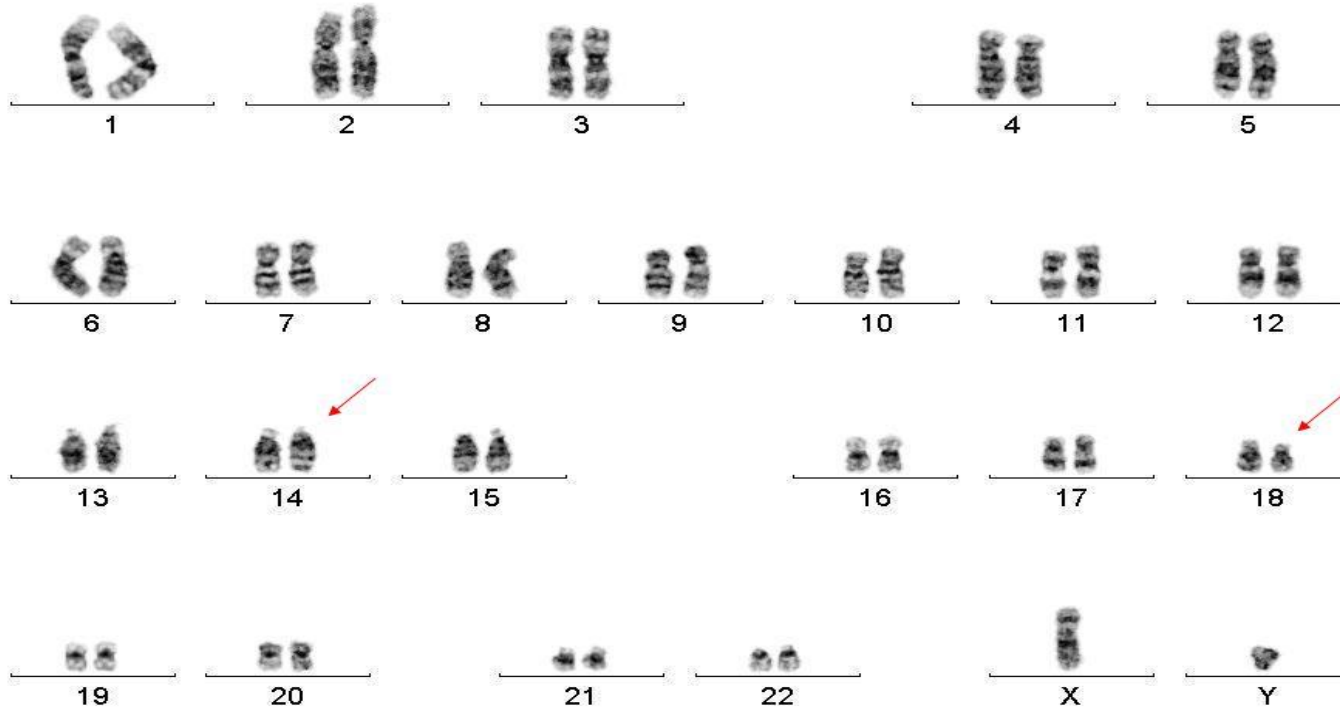
## trissomia 12 / sonda D12Z3



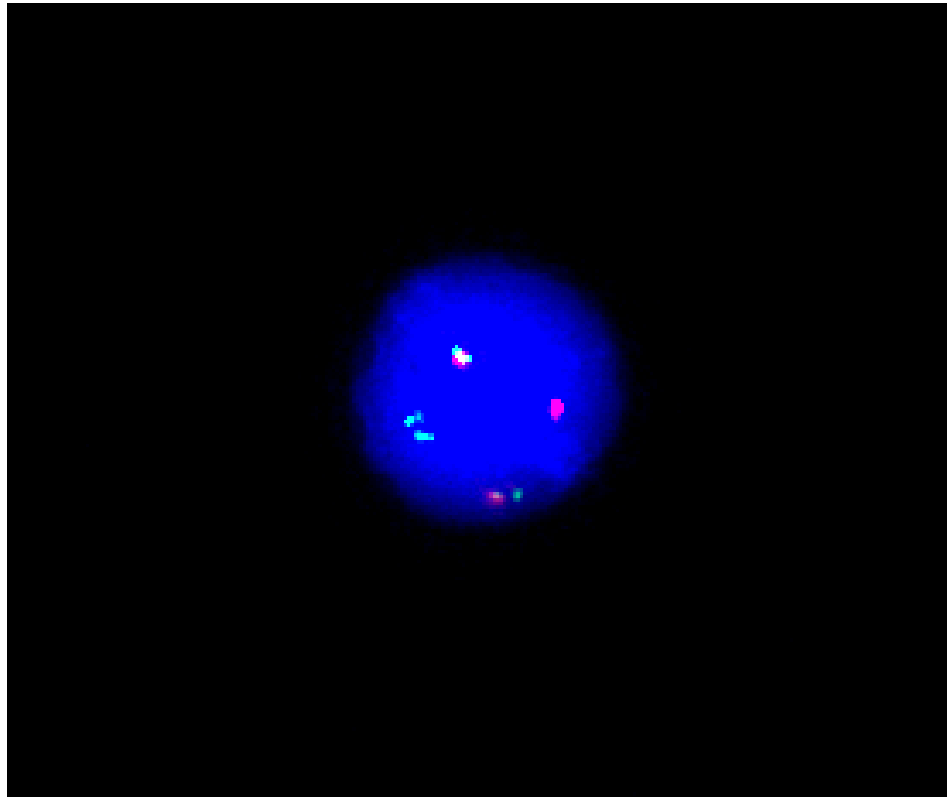
**47,XY,+12,t(14;18)(q32;q21)**

# Neoplasias de Células B – Linfoma Folicular

## Linfoma Difuso de grandes células B



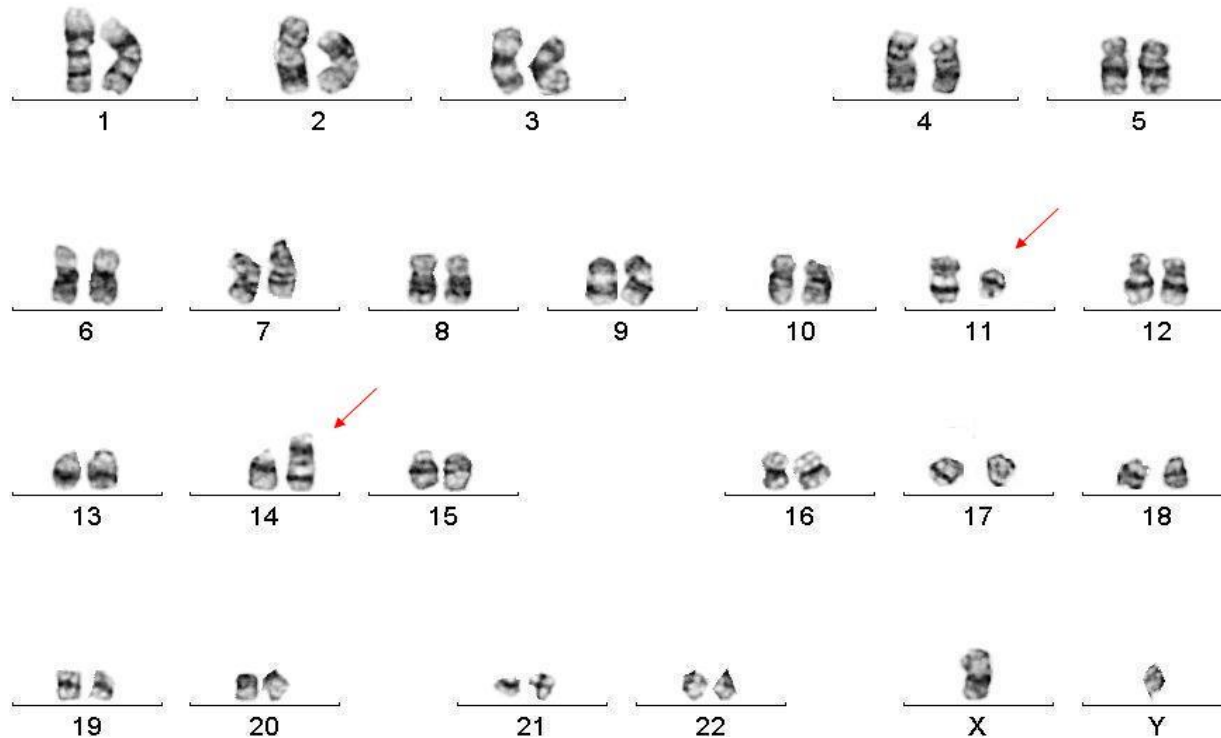
**46,XY,t(14;18)(q32;q24)**  
**(IGH/BCL2)**



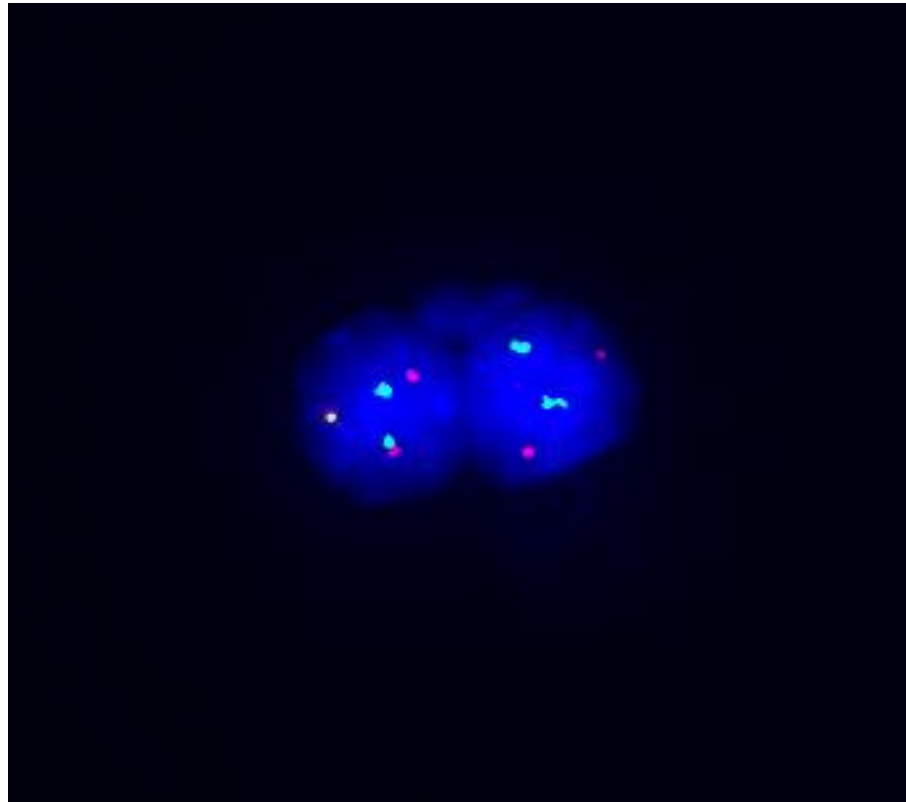
**t(14;18)(q32;q24)**

**Sondas específicas para os genes *BCL2* e *IGH***

# Neoplasias de Células B – Linfoma Manto



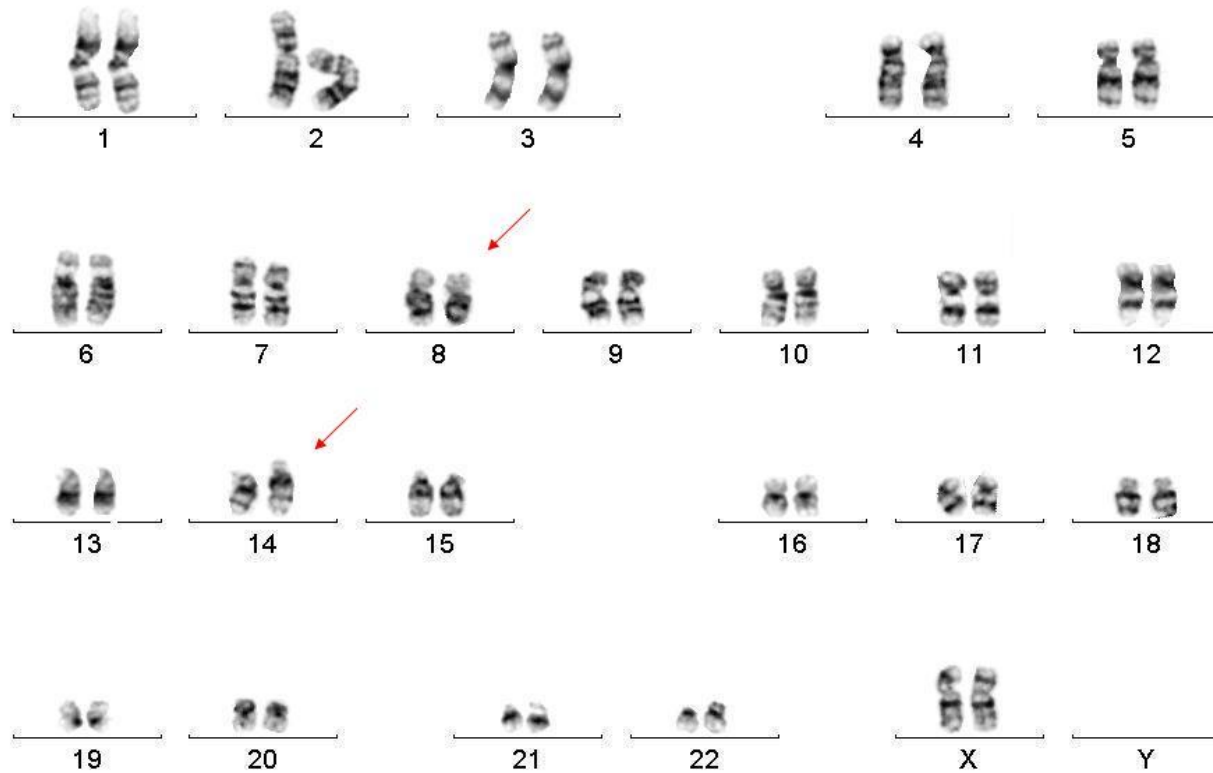
**46,XY,t(11;14)(q11;q32)**  
**(CCND1/IGH)**



**t(11;14)(q13;q32)**

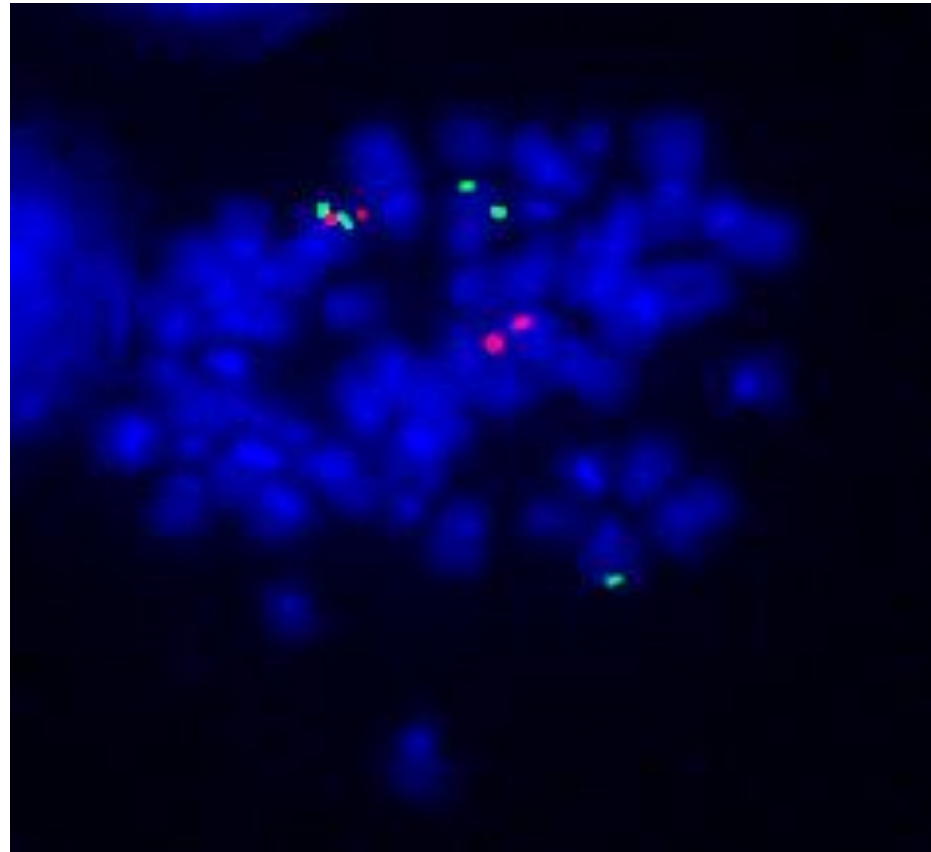
**Sondas específicas para os genes *CCND1* e *IGH***

# Neoplasias de Células B – Linfoma Difuso de grandes células B



**46,XX,t(8;14)(q24;q32)**

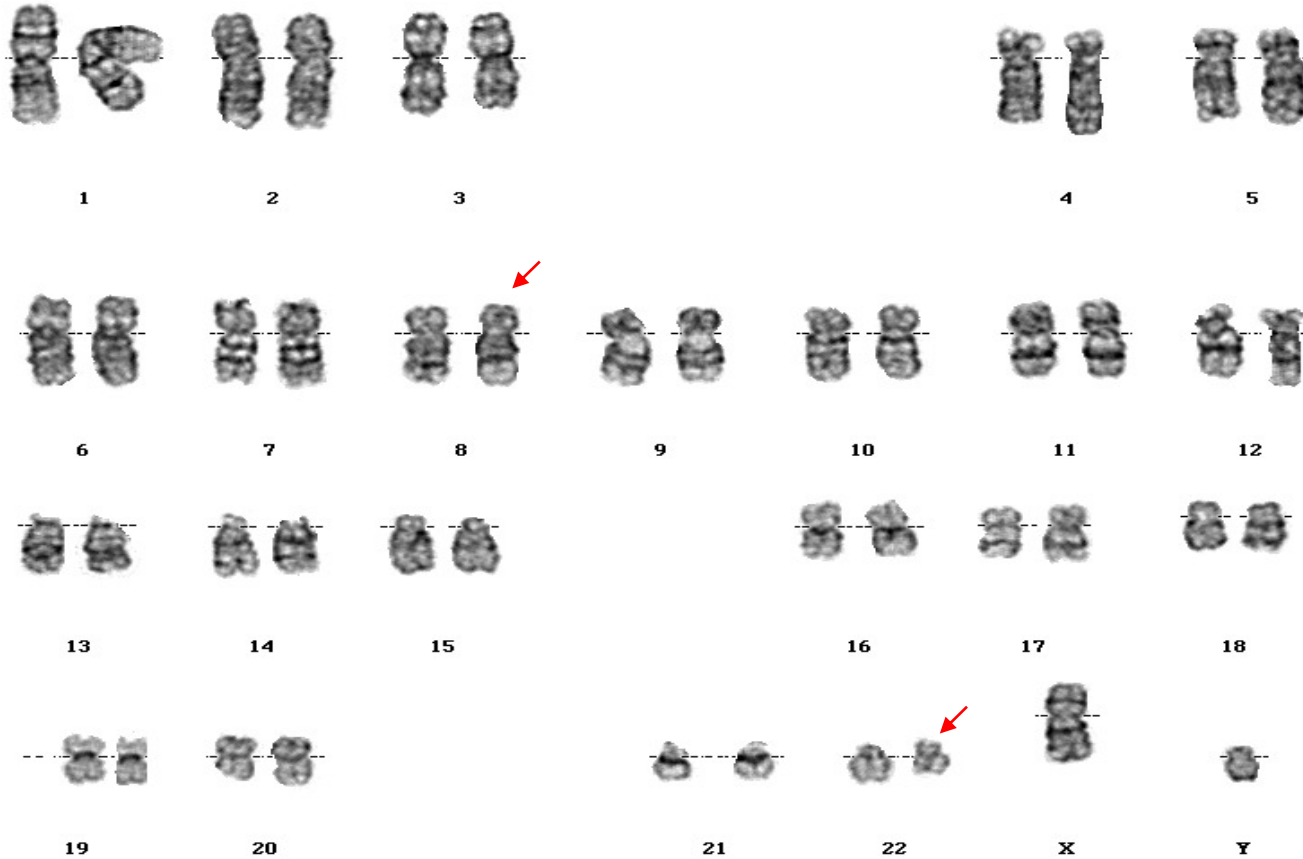
**(C-MYC/IGH)**



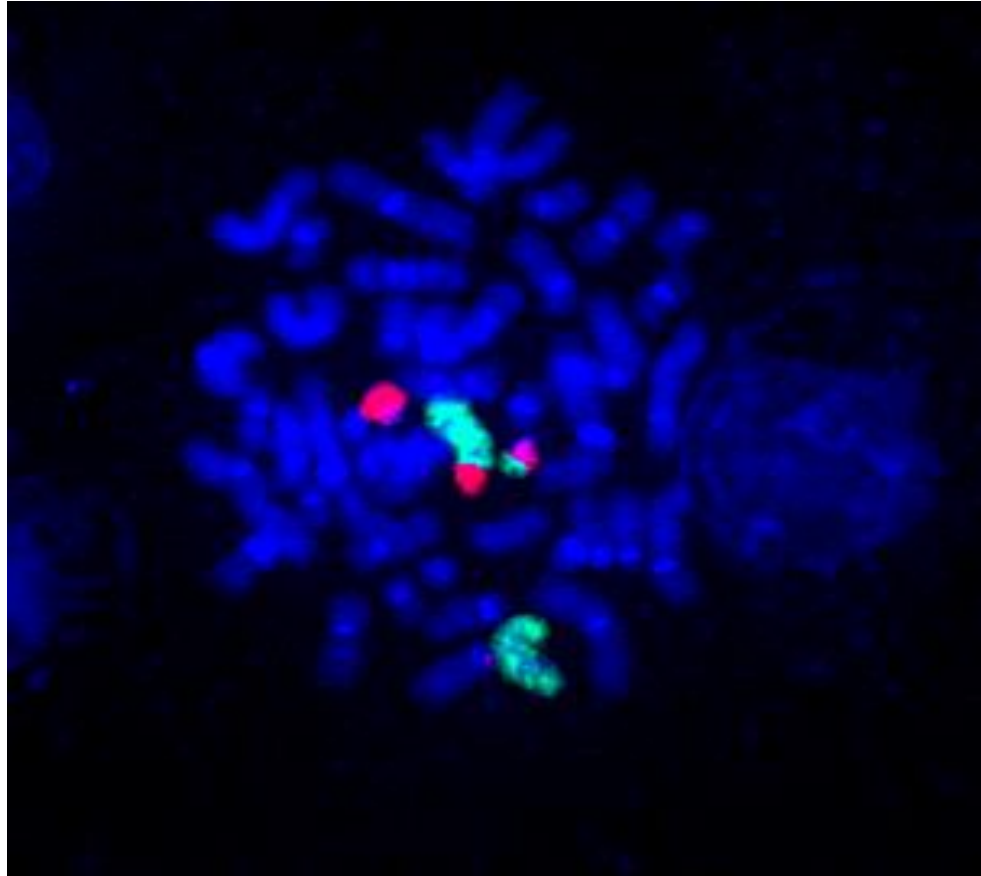
**t(8;14)(q24;q32)**

Sondas específicas para os genes *cMYC* e *IGH*

# Neoplasias de Células B – Linfoma Burkitt

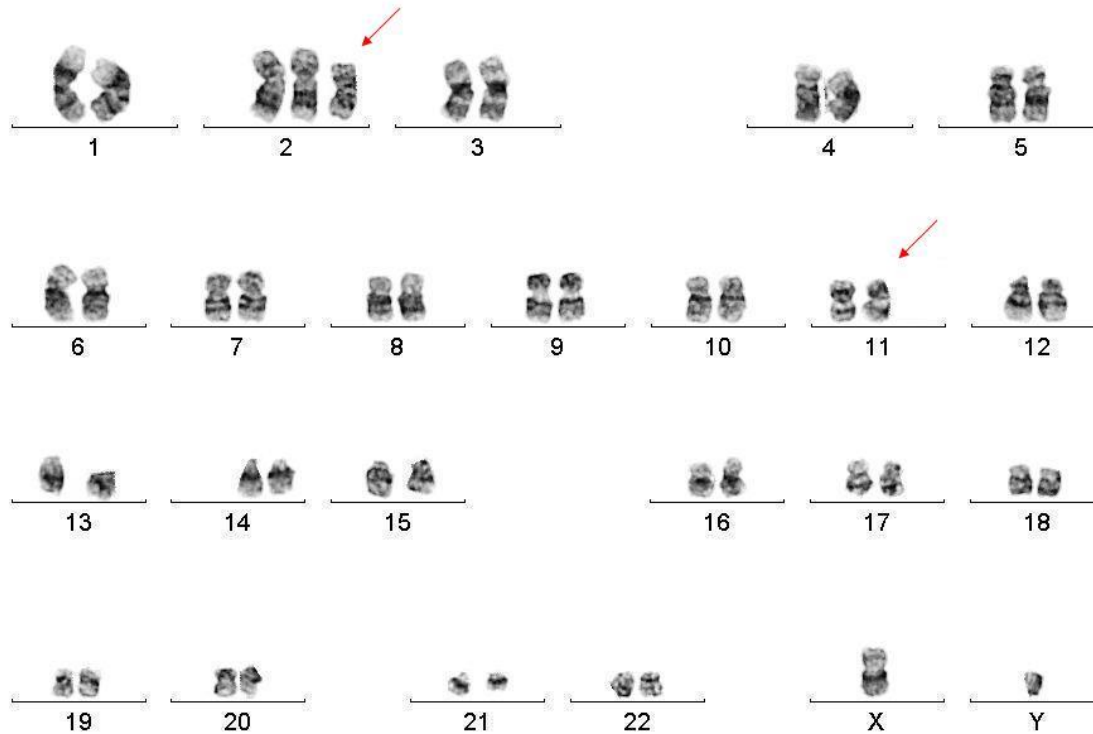


**46,XY,t(8;22)(q24;q11)**

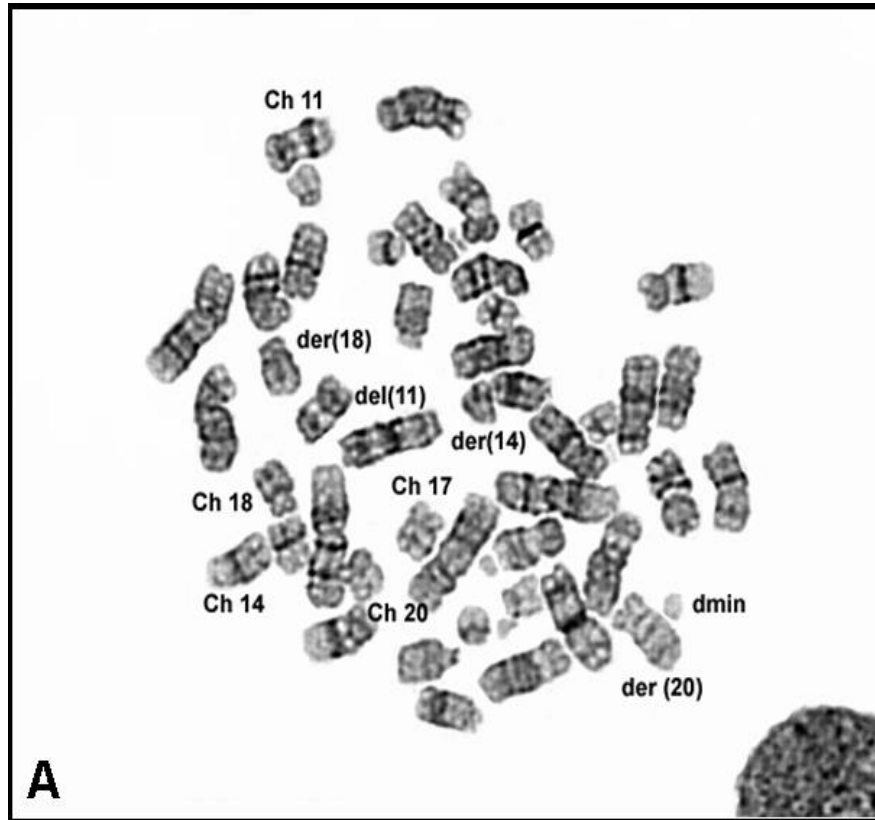


**t(8;22)(q24;q11)**  
**wcp dos cromossomas 8 e 22**

## • Outras anomalias e cariótipos complexos

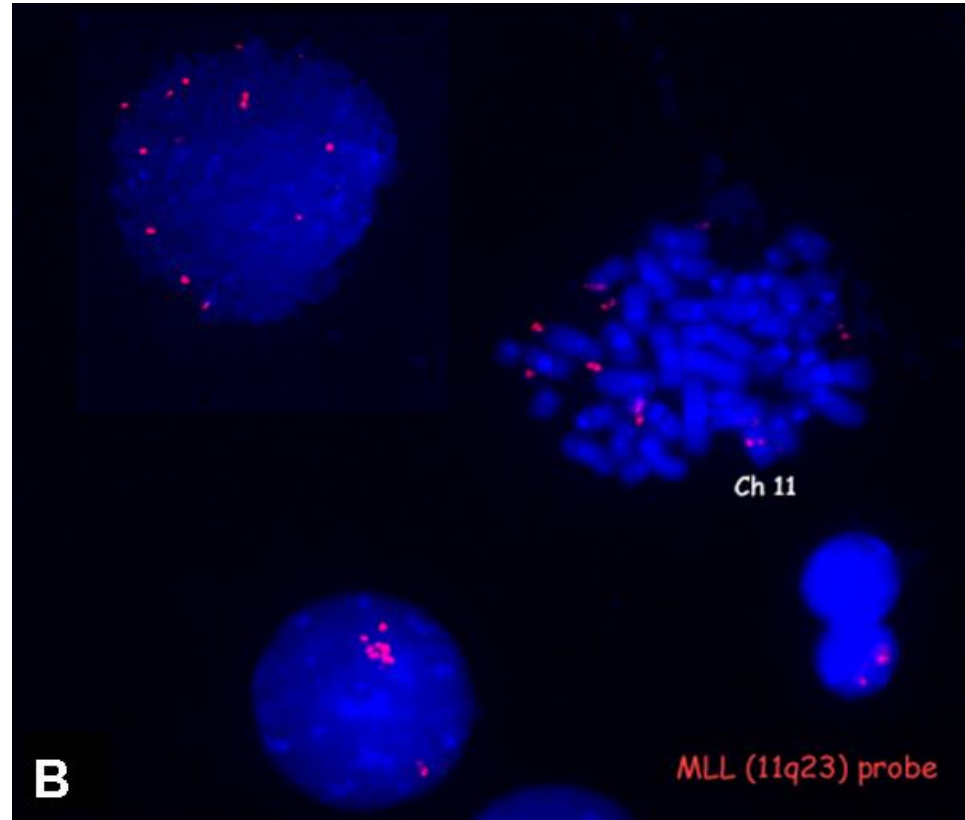


**47,XY,+i(2)(p10),del(11)(q13q21)**



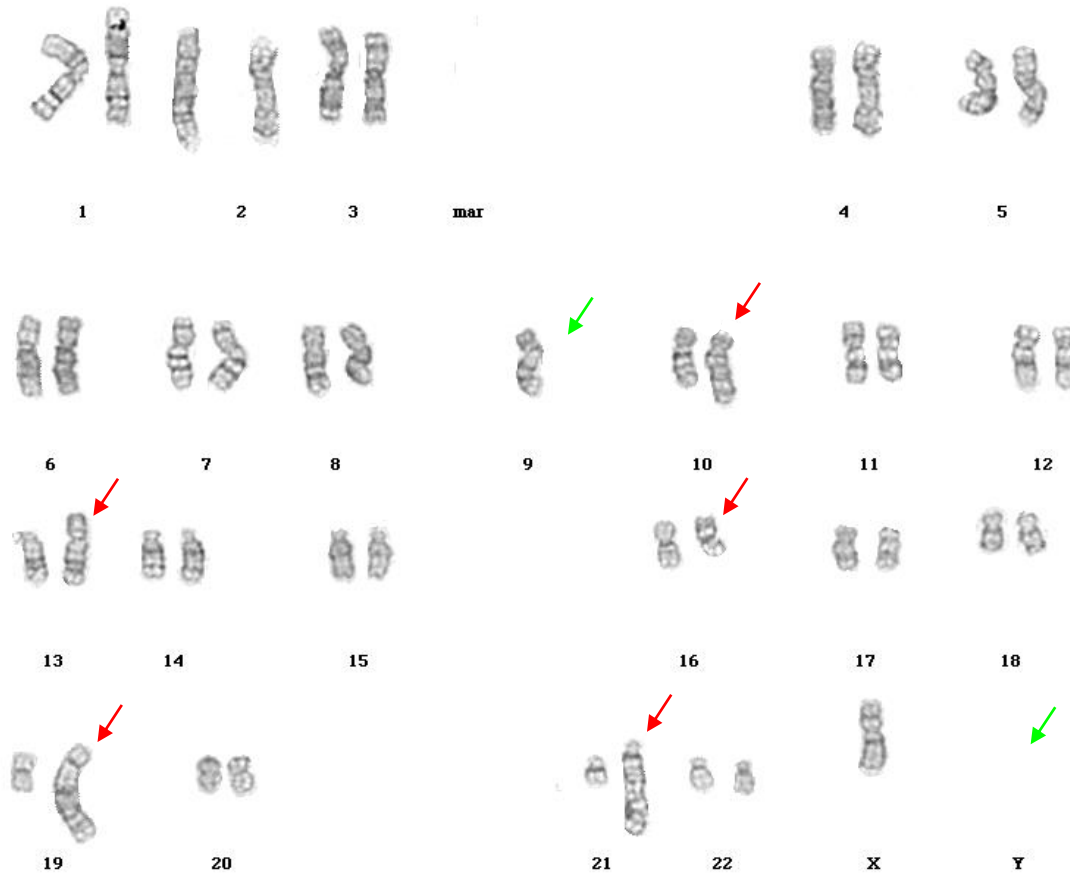
**A**

**Metafase com del(11) e dmin**

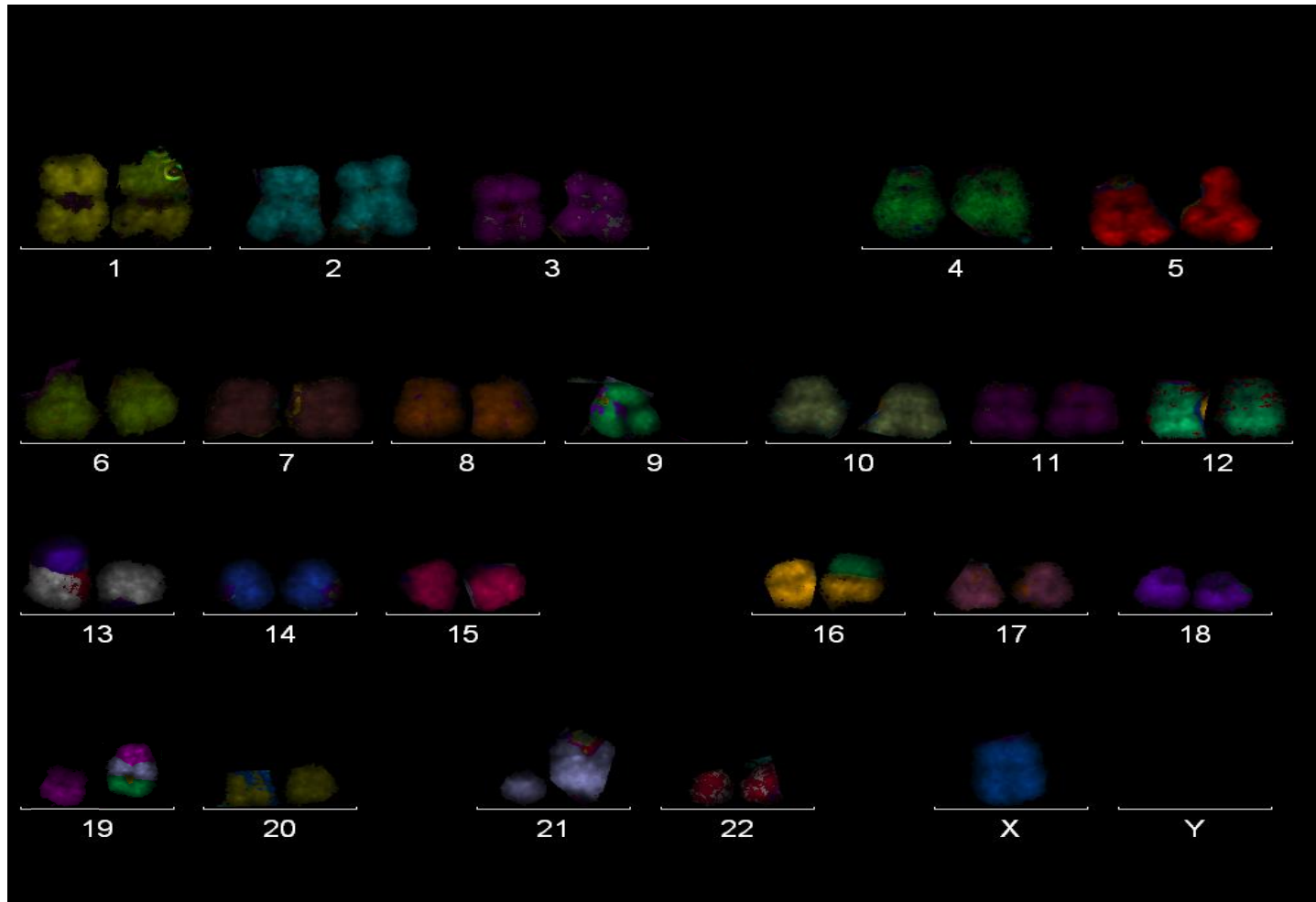


**B**

**Sonda MLL(11q23) específica para o gene MLL**



**44,X,-Y,-9,add(10)(q24),add(13)(p11.2),add(16)(p11.2),add(19)(q13.3),add(21)(q22)**



## Multi-Color chromosome painting (M-FISH)

# Conclusão

- **As diferentes técnicas se complementam.**
- **Deverão ser realizadas mediante o objetivo e o tipo de anomalias a encontrar.**
  - Exemplo de uma LLC (FISH/*microarray*)
- **Permitem a confirmação ou não da hipótese de diagnóstico.**
- **Os resultados poderão influenciar a terapêutica a seguir.**
- **Re-avaliação mostrando um agravamento ou não da doença e indicando o valor de prognóstico assim como a estratificação do risco.**

# INSA - DG - UCI

## Coordenador

**Hildeberto Correia**

E-mail: [hildeberto.correia@insa.min-saude.pt](mailto:hildeberto.correia@insa.min-saude.pt)

Bárbara Marques  
Cristina Alves  
Cristina Ferreira  
**Filomena Brito**  
Sónia Pedro  
Laurentino Simão  
**Maria do Céu Geraldes**  
Paula Ambrósio

Marisa Silva  
Sílvia Serafim  
Neuza Bacalhau  
Mónica Viegas  
Ana Rita Tarelho  
Sara Rangel  
José Furtado