

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

MESTRADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ANDRYELE ZAFFARI MACHADO

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA  
DA POLIMERASE FLUORESCENTE QUANTITATIVA  
(QF-PCR) PARA DETECÇÃO DE ANEUPLOIDIAS EM  
GESTAÇÕES DE ALTO RISCO, FETOS MORTOS  
SEM DIAGNÓSTICO E MATERIAL DE RESTOS  
PLACENTÁRIOS DE MÚLTIPLAS PERDAS  
GESTACIONAIS**

Porto Alegre

2021

ANDRYELE ZAFFARI MACHADO

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA  
DA POLIMERASE FLUORESCENTE QUANTITATIVA  
(QF-PCR) PARA DETECÇÃO DE ANEUPLOIDIAS EM  
GESTAÇÕES DE ALTO RISCO, FETOS MORTOS  
SEM DIAGNÓSTICO E MATERIAL DE RESTOS  
PLACENTÁRIOS DE MÚLTIPLAS PERDAS  
GESTACIONAIS**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Sandra Leistner-Segal

Coorientador: Dra. Rejane Gus

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Zaffari Machado, Andryele  
APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE FLUORESCENTE QUANTITATIVA (QF-PCR) PARA  
DETECÇÃO DE ANEUPLOIDIAS EM GESTAÇÕES DE ALTO RISCO,  
FETOS MORTOS SEM DIAGNÓSTICO E MATERIAL DE RESTOS  
PLACENTÁRIOS DE MÚLTIPLAS PERDAS GESTACIONAIS /  
Andryele Zaffari Machado. -- 2021.  
45 f.  
Orientadora: Sandra Leistner-Segal.

Coorientadora: Rejane Gus.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,  
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Anomalias Cromossômicas. 2. Diagnóstico  
Molecular. 3. Diagnóstico Pré-Natal. I.  
Leistner-Segal, Sandra, orient. II. Gus, Rejane,  
coorient. III. Título.

**ATA AUTENTICADA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente  
Saúde da Criança e do Adolescente - Mestrado Acadêmico  
Ata de defesa de Dissertação

Aluno: Andryele Zaffari Machado, com ingresso em 01/03/2019

**Título:** Aplicação da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa Fluorescente (QF-PCR) para detecção de aneuploidias em gestações de alto risco, fetos mortos sem diagnóstico e material de restos placentários de múltiplas perdas gestacionais

Data: 20/05/2021

Horário: 09:00

Local: Online

Banca Examinadora	Avaliação	Origem
Ana Carolina Brusius Facchin	Aprovado	UFRGS
Andre Anjos da Silva	Aprovado	UFRGS
Lucas Rosa Fraga	Aprovado	UFRGS

Avaliação Geral da Banca: Aprovado

Data da homologação:

Porto Alegre, 21 de maio de 2021

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente  
Rua Ramiro Barcelos, 2400 sala 220 - Bairro Santa Cecília - Telefone 33085601  
Porto Alegre - RS

Documento gerado sob autenticação nº MZO.224.216.SB3  
Pode ser autenticado, na Internet, pela URL <http://www.ufrgs.br/autenticacao>,  
tendo validade sem carimbo e assinatura.

Ao meu avô, pessoa curiosa que sempre soube que o conhecimento transforma as  
pessoas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Sandra Leistner-Segal pela paciência e disposição.

À minha co-orientadora Rejane Gus por ter me apresentado a cultura celular e o diagnóstico pré-natal. Obrigada por estes 5 anos de aprendizado.

Agradeço aos colegas de pós- graduação pelo apoio científico e emocional ao longo destes mais de dois anos.

Agradeço aos colegas do Serviço de Genética Médica por terem me dado tanto amor e carinho nos momentos em que mais precisei.

Ao meu avô Milton que sempre acreditou que eu seria capaz de conquistar o mundo, se assim o quisesse. Todas as vidas seriam poucas para agradecer tudo o que fez e o que foi para mim.

À minha avó por ter me esperado voltar das aulas com o jantar quentinho.

Aos amigos agradeço as palavras de incentivo e por serem fiéis em todos os momentos de aflição.

Ao meu amor Leonel por ser meu parceiro durante esse ano de medo e incertezas. Obrigada por ser meu lugar de paz.

À todos que me ajudaram a chegar até aqui, diretamente ou indiretamente, o meu muito obrigada.

## RESUMO

**Introdução:** As aneuploidias mais comuns, juntas, representam mais de 80% das anormalidades cromossômicas diagnosticadas no período pré-natal. Cerca de 15-25% das gestações acabam perdidas até o terceiro trimestre, sendo as anormalidades cromossômicas responsáveis por cerca de 50% dos abortamentos espontâneos. Quando encontrados no *screening* pré-natal indícios de aneuploidia a investigação citogenética torna-se fundamental. O uso de técnicas alternativas que possibilitam rapidez diagnóstica associada a alta sensibilidade vem se tornando uma realidade. A técnica de QF-PCR é uma técnica molecular capaz de detectar as principais aneuploidias em tecidos fetais em até 48 horas, não necessitando de cultivo celular para ser realizada. **Objetivo:** verificar a eficiência da metodologia QF-PCR em DNA de diferentes amostras, que não puderam ser analisadas previamente por técnicas citogenéticas, a fim de detectar aneuploidias. **Metodologia:** estudo transversal realizado no período de 2019 à 2020 de 25 amostras de DNA fetal armazenados em biorrepositório (12 eram de biópsia de cordão umbilical, 2 de vilosidades coriônicas de material de aborto, 6 de biópsia de pulmão, 1 de líquido amniótico, 1 de sangue e 3 de outros materiais), utilizando kit comercial para análise dos cromossomos 13,18,21,X e Y. **Resultados:** das 25 amostras analisadas, duas apresentaram razões alélicas indicativas de trissomia do cromossomo 18 e as demais apresentaram resultado normal para os cromossomos analisados. Cinco amostras com diagnóstico de cariótipo já estabelecido foram utilizadas para a padronização do procedimento. **Conclusão:** a técnica aplicada mostrou-se eficaz para análise de diferentes materiais fetais, que não puderam ser analisados anteriormente por técnicas citogenéticas, além de detectar alterações cromossômicas numéricas em diferentes materiais fetais. Entretanto, os cromossomos avaliados se restringem aos marcadores incluídos em cada kit e não permite a análise cromossômica global. Para tal, é necessária a inclusão de kits adicionais não avaliados neste projeto.

**Palavras chave:** anomalias cromossômicas, diagnóstico molecular, diagnóstico pré-natal

## ABSTRACT

**Background:** the most common aneuploidies together represent more than 80% of the chromosomal abnormalities diagnosed in the prenatal period. About 15-25% of pregnancies are interrupted until the third quarter, being chromosomal abnormalities responsible for about 50% of miscarriages. When evidence of aneuploidy is found in prenatal screening, cytogenetic investigation becomes essential. The use of alternative techniques that enable rapid diagnosis associated with high sensitivity has become a reality. The QF-PCR is a molecular technique capable of detecting the main aneuploidies in fetal tissues in a lower turnaround time not requiring cell culture to be performed. **Objective:** to verify the efficiency of the QF-PCR methodology in DNA from different samples, which could not be previously analyzed by cytogenetic techniques, in order to detect aneuploidies. **Methods:** cross-sectional study conducted in a tertiary hospital in Porto Alegre, Rio Grande do Sul with evaluation of 25 DNA samples of fetal tissue stored in a biorepository (12 were from umbilical cord biopsy, 2 from chorionic villi from, 6 from lung biopsy, 1 from amniotic fluid, 1 from blood and 3 from other materials), using a commercial kit for analysis of chromosomes 13,18, 21,X and Y. **Results:** of the 25 samples analyzed, two presented allelic ratios indicative of trisomy 18 and the others presented normal results. Five samples with karyotype results were used to standardize the procedure. **Conclusion:** The technique used proved to be efficient in detecting numerical chromosomal alterations in several fetal materials, which could not be previously analyzed by cytogenetic techniques, in addition to detecting numerical chromosomal changes in different fetal materials. Nevertheless the chromosomes evaluated are restricted to the markers included in each of the kits used and does not allow global chromosomal analysis. For this purpose, the inclusion of additional kits not evaluated here is necessary.

**Keywords:** chromosome aberrations, molecular diagnostic, prenatal diagnosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação gráfica do eletroferograma .....	19
Figura 2 - Localização dos marcadores moleculares nos cromossomos 13,18,21 e sexuais..	25
Tabela 1 – Localização cromossômica dos marcadores e seus tamanhos em pares de base...	26

### **Ilustrações do artigo**

Figura 1 - Eletroferograma da amostra B06 com marcadores autossômicos e sexuais.....	36
Figura 4 - Eletroferograma da amostra H9 com marcadores autossômicos alterados.....	36
Figura 5 - Eletroferograma da amostra H9 mostrando marcadores sexuais.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Anormalidades Cromossômicas
CGH <i>Array</i>	Hibridização Genômica Comparativa em Microarranjos
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
LA	Líquido Amniótico
MLPA	Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação
QF-PCR	<i>Quantitative Fluorescent Chain Reaction</i>
RDAs	Rápida Detecção de Aneuploidias
SGM	Serviço de Genética Médica
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	14
2.2 PROBLEMAS DE SEGREGAÇÃO .....	14
2.3 REARRANJOS CROMOSSÔMICOS .....	15
2.4 TÉCNICAS MOLECULARES ALTERNATIVAS .....	16
2.5 POLIMERASE FLUORESCENTE QUANTITATIVA (QF-PCR).....	17
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>20</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
5.1 DELINEAMENTO.....	22
5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	22
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	22
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	22
5.5 RISCOS ASSOCIADOS .....	23
5.6 LOGÍSTICA.....	23
5.6.1 Escolha dos casos.....	23
<b>5.6.2 Extração de DNA</b> .....	<b>23</b>
<b>5.6.3 PCR multiplex</b> .....	<b>24</b>
<b>5.6.4 Marcadores</b> .....	<b>24</b>
<b>5.6.5 Outros marcadores</b> .....	<b>26</b>
<b>5.6.6 Eletroforese Capilar</b> .....	<b>27</b>
<b>5.6.7 Interpretação dos resultados</b> .....	<b>27</b>
<b>5.6.8 Aspectos éticos</b> .....	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
6.1 ARTIGO .....	32
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As alterações cromossômicas numéricas (aneuploidias) mais comuns, juntas, representam mais de 80% das anormalidades cromossômicas (AC) diagnosticadas no período pré-natal (FAAS *et al.*, 2011) e estas, são reconhecidas como uma das causas mais frequentes dos defeitos congênitos (KASER, 2018). Quando encontradas alterações bioquímicas e ultrassonográficas no rastreamento combinado do primeiro trimestre gestacional, associadas ou não à idade materna e história pessoal e/ou familiar de AC, a probabilidade de um aneuploidia estar associada é alta e avaliação citogenética torna-se fundamental na investigação da etiologia destes achados. Esta investigação irá definir se os achados são de origem cromossômica, e se forem, indicará qual a melhor conduta a ser tomada no aconselhamento genético destas famílias (ACOG, 2020).

Síndromes cromossômicas ligadas aos cromossomos sexuais podem provocar alterações de crescimento, infertilidade, alterações cognitivas e metabólicas, comumente encontradas em pacientes mulheres com monossomia do X (Síndrome de Turner) (GRAVHOLT *et al.*, 2019) e em pacientes homens XXY (Síndrome de Klinefelter) (BONOMI *et al.*, 2017). A Síndrome de Down (trissomia do 21) é a aneuploidia autossômica mais comumente encontrada, estando associada à desordens intelectuais e a outros achados clínicos (BUUL, 2020). Na literatura, relatos apontam mais de 130 patologias associadas à trissomia do cromossomo 18 (Síndrome de Edwards), sendo o déficit cognitivo uma das características mais graves (ROSA *et al.*, 2013). A trissomia do cromossomo 13 (Patau), dita como a terceira trissomia mais comum, também está associada a problemas do sistema nervoso central e a outras anomalias graves, o que a torna, juntamente com a trissomia do 18, responsável por uma alta taxa de perdas fetais e neonatais (EMER *et al.*, 2015).

O diagnóstico precoce proporciona melhor qualidade de vida para estes pacientes, assim como prepara a família para diferentes desfechos pós diagnóstico e para possíveis gestações futuras, se assim for o desejo do casal. Da mesma forma, é importante para um casal cuja gestação foi interrompida sem causa aparente, ter a possibilidade de investigar a etiologia desta perda, sobretudo se já houve outras anteriores. A investigação das mortes perinatais também requer esta investigação, seja para a confirmação de um diagnóstico pré-natal ou para fetos natimortos com múltiplas malformações sem causa definida.

Já há alguns anos, a pesquisa de AC através da técnica que analisa visualmente o conjunto de cromossomos através da metodologia de bandeamento G (cariótipo), tornou-se uma prática rotineira no diagnóstico pré-natal (CARON, 1999), e para tanto é necessário a coleta de material fetal para cultivo celular. Para isso pode-se optar por métodos considerados invasivos, tais como: coleta de líquido amniótico (LA) da gestante (amniocentese) através de aspiração transabdominal, biópsia de vilosidades coriônicas através de punção para retirada de material placentário ou a partir de coleta de sangue retirado do cordão umbilical do feto (cordocentese). Da mesma forma quando há perda fetal ocasionada por aborto espontâneo, é possível realizar o cultivo celular a partir do material de restos ovulares. Para natimortos, o cultivo pode ser realizado através de biópsia de diversos tecidos. Todos os materiais citados possuem células fetais viáveis para o cultivo celular e posterior análise dos cromossomos e/ou extração de DNA (MAGALHÃES, 2001).

O cariótipo apesar de ser considerado exame "padrão ouro" para detecção de alterações citogenéticas (BUI, 2007), possui algumas limitações. Dentre elas, está a constante iminência de uma contaminação por fungos ou bactérias durante o cultivo celular; a dependência de células viáveis para a análise e a dificuldade para obtenção de índice mitótico satisfatório. Contudo, o principal obstáculo é o tempo médio de 10 a 14 dias entre a coleta do material, o cultivo celular e a liberação do resultado da análise cromossômica. Este longo período de espera contribui para o estresse emocional e aumento da ansiedade dos pais (FAAS *et al.*, 2011), além de atrasar decisões e condutas por parte da equipe assistencial, haja vista determinadas síndromes apresentarem condições que requerem intervenção imediata ao nascimento e até mesmo acompanhamento ao longo da vida (BULL, 2020). As técnicas para diagnóstico pré-natal vêm progredindo durante as últimas décadas e métodos alternativos foram sugeridos para a rápida detecção de aneuploidias (RDAs) que não necessitam de cultura celular e, que, conseqüentemente, demandam menor tempo na liberação dos resultados. Uma das técnicas utilizadas por diversos centros médicos mundialmente é a PCR quantitativa fluorescente (*QF-PCR*). Sua maior vantagem é a detecção direta das principais aneuploidias sem a necessidade de células viáveis e em divisão celular, propiciando resultados em até 48 horas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Para o devido desenvolvimento do feto é necessário que haja estabilidade na estrutura e no número dos cromossomos, uma vez que qualquer desequilíbrio pode alterar a expressão gênica e acarretar em indivíduos fenotipicamente anormais ou até mesmo em incompatibilidade com a vida. Os genes estão dispostos nos cromossomos de maneira ordenada, ou seja, uma alteração numérica pode aumentar ou diminuir as cópias dos genes presentes no cromossomo envolvido, podendo trazer graves consequências fenotípicas ao portador (MALUF *et al.*, 2011).

Estas alterações estão classificadas em dois grupos: as numéricas, mais comuns, encontradas nos cromossomos autossômicos 13, 18 e 21 e sexuais X e Y; e as estruturais, que podem afetar um ou mais cromossomos, sejam eles autossômicos ou sexuais.

As alterações numéricas são classificadas em dois tipos: euploidias e aneuploidias. Quando há o envolvimento de todo o genoma, originando um conjunto haplóide a mais nas células, além do conjunto normal de cromossomos, chamamos de euploidia. Esta condição é incompatível com a vida na espécie humana. Já quando o número de cromossomos a mais não é um múltiplo exato dos números haplóides, ou seja, envolve apenas uma parte dos cromossomos, chamamos de aneuploidia (MALUF *et al.*, 2011).

Um erro durante a meiose pode ocasionar em um número alterado de cromossomos no oócito ou espermatozóide, fazendo com que o embrião ganhe um cromossomo extra (trissomia) ou perca um cromossomo (monossomia) (KHANDEKAR *et al.*, 2013). A aneuploidia é a AC mais encontrada em nossa espécie (MALUF *et al.*, 2011), ameaçando a saúde humana pela grave malformação de órgãos e tecidos, e déficit cognitivo (SUN *et al.*, 2017).

### 2.2 PROBLEMAS DE SEGREGAÇÃO

A etiologia das AC não é bem definida, podendo ser originada a partir de problemas na divisão celular, ser influenciada por características do meio ambiente e por fatores genéticos (KHANDEKAR *et al.*, 2013; CAPALBO *et al.*, 2017). Com o advento da análise de polimorfismos, introduzida no final da década de 80, foi possível investigar a possível origem

das aneuploidias. Permitindo assim, identificar que apesar das aneuploidias sexuais tipicamente derivarem da perda ou ganho de um cromossomo paterno, a maioria das trissomias autossômicas são provenientes de erros não disjuncionais ocorridos na meiose I materna (HAAL *et al.*, 2006).

É na meiose onde os gametas haploides são gerados a partir de um complexo processo que constitui em replicação do DNA e duas divisões celulares ocorridas em 4 fases (prófase, metáfase, anáfase e telófase), tendo como produto final quatro novas células haplóides na espermatogênese e uma célula haplóide mais um corpúsculo polar na oogênese (STRACHAN *et al.*, 2002).

Problemas de não disjunção dos cromossomos no momento da segregação para os pólos são muito frequentes na oogênese e a idade materna avançada está diretamente relacionada a este evento (HASSOLD, 2001).

Diversos estudos apontam que os problemas de não disjunção estão diretamente relacionados ao processo de recombinação (*crossing-over*) dos cromossomos. O *crossing-over* além de aumentar a variabilidade genética entre os indivíduos fortalece as conexões físicas que mantêm os cromossomos homólogos unidos com a formação dos quiasmas. (MACLENNAN *et al.*, 2015).

A má segregação pode levar a problemas de ganho ou perda de algum cromossomo. Embora todos os cromossomos possam sofrer problemas de não disjunção, alguns pares parecem ter maior propensão para que isso ocorra. Cromossomos com recombinação reduzida ou aqueles em que os quiasmas são distais parecem estar propensos a má segregação (GABRIEL *et al.*, 2010). Casos de trissomia do cromossomo 21 e dissomia do X de origem paterna, e casos de trissomia dos cromossomos 15,16,18,21 e trissomia dos cromossomos sexuais, de origem materna, parecem sofrer maior impacto com reduções significativas de recombinação. No entanto, isso parece ser uma característica pertencente a todos os casos de trissomia derivados da meiose I (HASSOLD, 2001).

### 2.3 REARRANJOS CROMOSSÔMICOS

Alterações cromossômicas estruturais geram rearranjos cromossômicos que envolvem a constituição inata dos cromossomos. Geralmente esses eventos ocorrem quando há a quebra de um cromossomo em dois locais diferentes seguidos de uma

recombinação das partes quebradas, diferente da ordem original. Essas mudanças constitucionais podem causar deleções, duplicações, inversões e translocações nos cromossomos.

Os rearranjos podem ser definidos como balanceados, quando não há alteração na quantidade de material genético, e como não balanceados, quando há a adição ou perda de material genético. Os portadores de rearranjos balanceados geralmente não sofrem algum tipo de dano, porém possuem alto risco de gerar gametas com translocações não balanceadas e conseqüentemente prole com filhos afetados (NUSSBAUM *et al.*, 2007). As translocações balanceadas são comumente encontradas em casais com eventos de abortamento de repetição e em homens inférteis (BONET *et al.*, 2002).

Abortos espontâneos ocorridos antes da vigésima semana gestacional ocorrem em cerca de 15 a 25% dos casos. Estima-se que 5% das mulheres terão dois abortos consecutivos e 1% terão três ou mais (KASER, 2018). As AC, sendo as trissomias as mais comuns, são encontradas em cerca de 65% a 75% dos abortos espontâneos, e dentre essas, as trissomias dos cromossomos 15,16, 18, 21 e 22 são as mais frequentes (MENASHA *et al.*, 2005).

## 2.4 TÉCNICAS MOLECULARES ALTERNATIVAS

O *screening* pré-natal é focado no rastreamento de anomalias cromossômicas pelo fato de a maioria dos casos de mortalidade e morbidade ocorrerem neste período. A pesquisa de AC por cariótipo tornou-se rotineira para a pesquisa de aneuploidias, permitindo um diagnóstico definitivo antes da vigésima semana gestacional (HUI, 2019). E para tanto exames invasivos como a amniocentese, coleta de vilosidades coriônicas e cordocentese são necessários. Estes exames possuem risco de perda gestacional de 0,5%, 1% e 1,5% respectivamente (MAGALHÃES, 2001).

As técnicas moleculares vêm ganhando espaço nas últimas décadas para RDAs, otimizando trabalho e tempo. As técnicas moleculares amplamente utilizadas no diagnóstico pré-natal se dividem em duas categorias: as que estudam o genoma completo e as que estudam regiões cromossômicas específicas (WU *et al.*, 2019).

A técnica molecular mais difundida é a de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Esta utiliza sondas de DNA marcadas com fluorescência para detecção de síndromes de microdeleção/microduplicação e desordens genéticas. Por ser locus específica há a

necessidade do conhecimento prévio da sequência de DNA de interesse para que as sondas sejam escolhidas de maneira adequada (MACHADO *et al.*, 2012). Apesar de amplamente utilizada no diagnóstico pré-natal é altamente trabalhosa por necessitar de vários processos manuais (RIEGEL, 2014), o que por sua vez torna sua aplicabilidade inviável para um grande número de amostras.

A Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA) é capaz de determinar mais de 60 sequências de DNA genômico em um único ensaio multiplex. Ao contrário da PCR tradicional, esta técnica não amplifica cópias de DNA, mas sim as sondas que se hibridizam ao DNA alvo. Para a detecção das principais aneuploidias pode-se usar o kit SALSA P095, que contém oito sondas para cada cromossomo a ser analisado. Apesar de simples e rápida esta técnica não é capaz de detectar mosaicismos de baixo grau, triploidias femininas, translocações e inversões (SCHOUTEN *et al.*, 2019), além disso, o desempenho da técnica pode ser afetado pela falta ou excesso de material, presença de impurezas no DNA e problemas de normalização dos dados (SILVA *et al.*, 2019).

Atualmente a Hibridização Genômica Comparativa em Microarranjos (CGH-Array) é um dos métodos mais poderosos para a detecção de anormalidades cromossômicas estruturais especialmente duplicações, deleções ou triplicações em qualquer região do cromossomo. Apesar de permitir a triagem de todo o genoma para variações de números de cópias em um único experimento, necessita de profissionais altamente treinados e protocolo laboratorial muito específico (RICKMAN *et al.*, 2005).

Outra técnica molecular amplamente utilizada no diagnóstico de aneuploidias é a Polimerase Fluorescente Quantitativa (QF-PCR), cerne desta pesquisa.

## 2.5 POLIMERASE FLUORESCENTE QUANTITATIVA (QF-PCR)

O uso da técnica de QF-PCR para detecção de aneuploidias foi introduzido no início dos anos 90 e, desde então, vem sendo utilizada por grandes centros em diversos países (MORAES *et al.*, 2018). Esta técnica é capaz de amplificar curtas regiões com sequências repetidas de DNA altamente polimórficas, chamadas *short tandem repeats* (STR) em até 48 horas, utilizando protocolo simples e de fácil implementação.

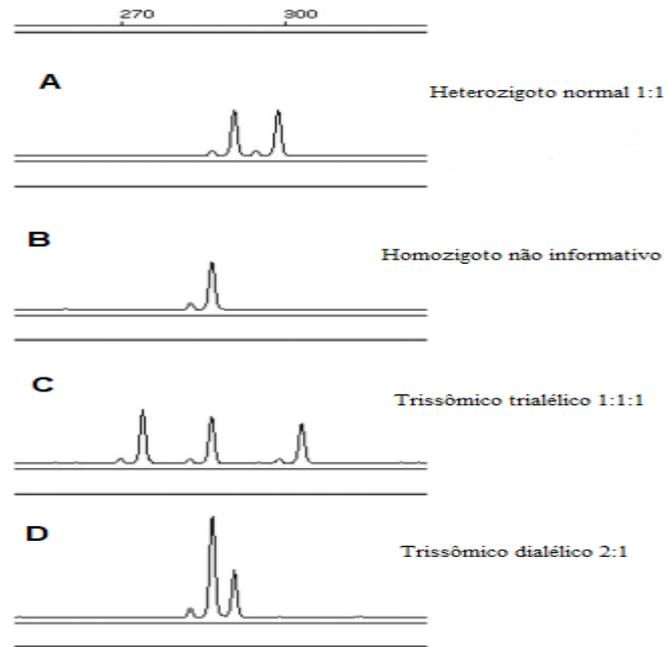
*Short tandem repeats* ou microssatélites são sequências de unidades repetidas de até 6 pares de base em repetições consecutivas de até 150 pares de base. Esses polimorfismos possivelmente foram originados por um mecanismo de "retro deslizamento" de uma fita

filha sobre a fita molde durante o processo de replicação do DNA, de modo que a mesma sequência foi duplicada. Estudos de hibridização *in situ* localizaram os microssatélites em regiões específicas dos cromossomos. Boa parte se localiza próximo aos centrômeros, porém também podem ser encontradas nas extremidades cromossômicas (telômeros) (LODISH *et al.*, 2005).

Os STR encontrados nos cromossomos 13, 18, 21, X e Y são amplificados, em um único ensaio de PCR multiplex, por iniciadores (*primers*) marcados com fluorocromos capazes de se hibridizar a cadeia de DNA molde no início (5' ou *forward*) e no fim (3' ou *reverse*) do fragmento de DNA a ser amplificado. Após a amplificação os produtos da PCR são submetidos a eletroforese capilar em analisador automático gerando bandas de diferentes cores e tamanhos, representadas por picos, quando lidas por um software apropriado. Este padrão refletirá o status genético da amostra.

Para uma amostra normal diplóide, são observadas duas bandas de mesma intensidade representadas por dois picos de tamanhos iguais na razão 1:1 representativas dos dois alelos respectivos ao cromossomo estudado; para uma amostra homozigótica, ambos os alelos terão o mesmo tamanho representado somente por um pico não informativo. Quando houver três bandas com a mesma intensidade (1:1:1) ou (2:1) significa que há a presença de um cromossomo extra (Fig.1). Dessa maneira é possível detectar por este método as trissomias autossômicas mais comuns: trissomia do 21 (Síndrome de Down), trissomia do 18 (Síndrome de Edwards) e trissomia do 13 (Síndrome de Patau); com este kit também é possível detectar aneuploidias dos cromossomos sexuais X e Y, tais como Síndrome de Klinefelter (XXY) e Síndrome de Turner (X0).

A QF-PCR é um método quantitativo, ou seja, pode-se determinar o número relativo a cada alelo calculando a razão entre a área e/ou altura dos picos.



**Figura 1.** Representação gráfica do eletroferograma.

Fonte: adaptado de FAAS *et al.*, 2011.

### 3 JUSTIFICATIVA

A incidência de AC é cerca de 1 a cada 200 recém-nascidos, sendo que a maioria dos fetos com alguma AC não sobrevive. 50% dos abortos espontâneos ocorridos durante o primeiro trimestre da gestação estão relacionados com alguma AC (KHANDEKAR *et al.*, 2013). Portanto, a investigação rápida e eficiente no período pré-natal torna-se essencial para a investigação desses achados e para que a devida conduta seja tomada. Nem sempre essa investigação pode ser realizada pelo método citogenético convencional, devido às dificuldades que permeiam o cultivo celular. Sem essas informações o aconselhamento genético apropriado torna-se complexo e a família permanece sem conhecimento sobre as condições do feto ou sobre a probabilidade de sofrer o mesmo problema em uma gestação futura.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar a eficiência da metodologia QF-PCR em DNA de diferentes amostras fetais, que não puderam ser analisadas previamente por técnicas citogenéticas, a fim de detectar aneuploidias.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Padronizar a técnica de QF-PCR utilizando DNA existente em biorrepositório de pacientes cuja análise citogenética tenha sido concluída em material cultivado.
2. Aplicar esta metodologia (QF-PCR) em DNA extraído de diferentes tecidos fetais de pacientes para os quais a análise citogenética não tenha sido concluída devido a falhas no cultivo celular.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 DELINEAMENTO

Estudo transversal.

### 5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

As amostras utilizadas neste estudo consistiram de alíquotas de DNA extraídas de material para diagnóstico pré-natal, (amniócitos cultivados a partir de punção de líquido amniótico); e materiais para diagnóstico pós-natal, (vilosidades coriônicas obtidas através de material de aborto e biópsia de tecido de feto morto (cordão umbilical, tecido pulmonar e sanguíneo). Todas as amostras tiveram indicação de análise citogenética e eram provenientes do Ambulatório de Diagnóstico Pré-natal do Serviço de Genética Médica (SGM) e Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O número de amostras utilizadas (n=25) foi baseado em uma amostra de conveniência a partir da disponibilidade de alíquotas de DNA armazenadas em biorrepositório.

### 5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas neste estudo amostras de DNA extraídas de líquido amniótico, provenientes de mulheres com gestação de alto risco e presença de malformações fetais em ultrassonografia, histórico de filho anterior com cromossomopatias e/ou casais com translocação balanceada. Para amostras de DNA extraídas a partir de vilosidades coriônicas provindas de material de aborto foram selecionadas aquelas cuja paciente tinha histórico de mais de dois abortos espontâneos e para biópsia de natimorto, foram incluídas aquelas onde houve feto morto sem causa aparente e com múltiplas malformações.

### 5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Amostras fetais que não possuíam indicação de investigação de cromossomopatias.

## 5.5 RISCOS ASSOCIADOS

Não houve riscos associados ao estudo, uma vez que o material biológico utilizado já estava armazenado e disponível para pesquisa. Houve, entretanto, o risco de quebra de confidencialidade pela necessidade de acesso aos dados de prontuário dos pacientes.

## 5.6 LOGÍSTICA

### 5.6.1 Escolha dos casos

Foi realizada uma busca nos registros dos últimos 10 anos (2010 a 2020) do Laboratório de Diagnóstico Pré-Natal, a fim de identificar casos onde o exame de cariótipo não foi realizado pela falta de sucesso no andamento do cultivo celular das amostras. Após a seleção dos casos elegíveis para o estudo, uma busca no banco de DNA do Laboratório de Genética Molecular foi realizada a fim de encontrar as alíquotas de DNA das amostras de interesse armazenadas em biorrepositório. 25 casos foram selecionados como elegíveis para o estudo. Cinco amostras com resultado de cariótipo estabelecido foram selecionadas para a padronização da técnica. Dentre elas havia: trissomia do 18; trissomia do 13; 45,X; 47,XXY e duas amostras 46,XY. As amostras eram previamente conhecidas e seus resultados não foram cegados.

### 5.6.2 Extração de DNA

As amostras de DNA foram extraídas no Laboratório de Genética Molecular utilizando o kit QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen). O DNA foi eluído em um volume final de 50-200 µl de tampão TE. A concentração e pureza foram medidas através do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e armazenadas a -20°C.

### 5.6.3 PCR multiplex

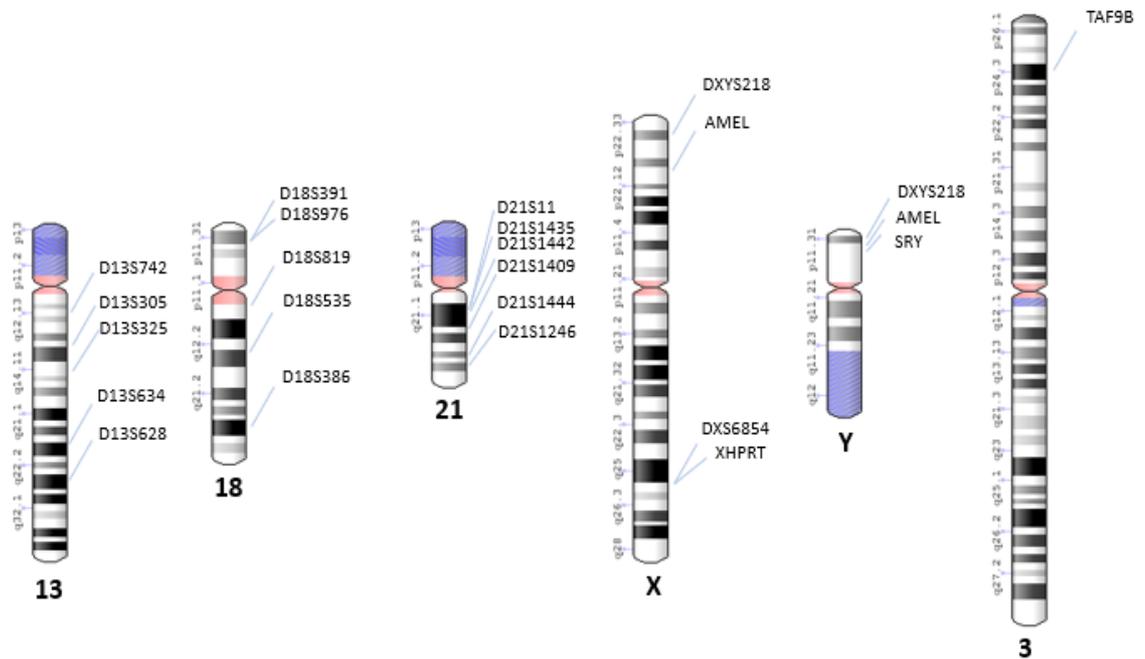
Foi utilizado o kit ChromoQuant® Star Optima 1 (Cybergene AB) conforme recomendações do fabricante. Para a preparação do mix foram adicionados 4,8 µl do Reaction mix 1 e 1,2 µl do Activator mix. Em seguida foram adicionados 4 µl de DNA com uma concentração entre 6-12 ng, totalizando um volume final de 10 µl para cada reação. O material a ser amplificado foi submetido a 28 ciclos a uma temperatura de anelamento de 95°C.

Ao longo do estudo foram realizados 3 ensaios de PCR multiplex com diferentes concentrações finais de DNA, a fim de encontrar a concentração ideal para a adequada quantificação dos picos. Foi adotada a concentração final de 1,5 ng de DNA como ideal. Os ensaios não foram feitos em duplicata.

### 5.6.4 Marcadores

O kit ChromoQuant® Star Optima 1 contém 22 *primers* fluorescentes (marcadores) em um único tubo, capazes de se ligar a regiões específicas dos cromossomos (STR) (Fig.2), tornando a fluorescência diretamente proporcional a quantidade de cópias alvo. Em apenas um ensaio multiplex é possível investigar as aneuploidias dos cromossomos autossômicos 13, 18,21 e dos cromossomos sexuais X e Y, uma vez que o número de cópias amplificadas de STR é indicativo do número de cópias dos cromossomos de interesse.

Dentre os 22 marcadores, cinco foram usados na investigação de trissomia do cromossomo 13, cinco do cromossomo 18 e seis do cromossomo 21. Para investigação de aneuploidias sexuais seis marcadores foram utilizados e destes, dois amplificavam sequências apenas no cromossomo X (para presença do cromossomo X), dois coamplificavam sequências nos cromossomos X e Y (para presença de X e Y em amostras masculinas e X para amostras femininas), um marcador no cromossomo Y (SRY) para determinação do sexo masculino e 1 (TAF9B) coamplificava sequências nos cromossomos 3 e X (para presença do cromossomo X). A tabela 1 mostra a localização e tamanho de pares de base (pb) respectivo a cada marcador. Para que o resultado de uma amostra seja interpretado como citogeneticamente normal ou anormal, é necessário que haja pelo menos três marcadores com no mínimo dois picos informativos em cada cromossomo.



**Figura 2.** Localização dos marcadores moleculares nos cromossomos 13,18,21 e sexuais

Fonte: imagem adaptada de Genome Decoration Page

**Tabela 1.** Localização cromossômica dos marcadores e seus tamanhos em pares de base.

<b>Marcadores</b>	<b>Localização</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Tamanho pb</b>
D13S305	13q13.1	13	425-470
D13S325	13q14.11	13	145-183
D13S628	13q31.1	13	420-475
D13S634	13q21.33	13	380-445
D13S742	13q12.13	13	230-326
D18S391	18p11.31	18	135-185
D18S535	18q12.3	18	450-505
D18S819	18q11.2	18	416-461
D18S976	18p11.31	18	166-201
D21S1246	21q22.2	21	282-336
D21S1409	21q21.2	21	294-324
D21S1435	21q21.1	21	150-210
D21S1442	21q21.1	21	232-269
D21S1444	21q21.1	21	226-267
DXS6854	21q22.13	21	226-267
XHPRT	Xq26.1	X	91-119
DXYS218	Xq26.1	X	358-401
	Xp22.32	X	310-350
AMEL	Yp11.3	Y	
	Xp22.31-Xp22.1	X	104 (cromossomo X)
TAF9B	Yp11.2	Y	112 (cromossomo Y)
	3p24.2	3	205 (cromossomo 3)
SRY	Xq13.1-q21.1	X	210 (cromossomo X)
	Yp.11.31	Y	202-207

### 5.6.5 Outros marcadores

Para as amostras com indicação para investigação de abortamento de repetição foi utilizado o kit ChromoQuant® Optima Plus contendo quatro marcadores para o cromossomo 15 (D15S659, D15S652, D15S822, D15S195), quatro para o cromossomo 16 (D16S2616, D16S7548, D16S2621, D16S539) e quatro para o cromossomo 22 (D22S1045, D22S689, D22S532, D22S686). O uso de marcadores nestes pares cromossômicos é indicado uma vez que alterações nestes locais são encontradas com maior frequência nos casos de abortos de repetição (MARQUI, 2018).

### **5.6.6 Eletroforese Capilar**

Os produtos amplificados pela QF-PCR foram analisados quantitativamente através de eletroforese capilar no equipamento Genetic Analyzer (ABI 3500) no intuito de determinar o número de cópias dos STR nos cromossomos de interesse. A matriz de calibração espectral utilizada foi a HS-5 DYE com padrões de matriz para os corantes 6-FAM (azul), HEX (verde), Atto550 (amarelo/preto), Atto565 (vermelho) e Atto663(laranja). O padrão de tamanho molecular utilizado foi o GS500.

### **5.6.7 Interpretação dos resultados**

Foi utilizado o software GeneMarker V2.6.3 para interpretação dos resultados. Por se tratar de um método quantitativo foi possível determinar o número relativo a cada alelo calculando a razão entre a área e/ou altura dos picos, uma vez que as áreas são representativas da quantidade final do produto da PCR e as alturas máximas dadas também como parâmetro de atividade fluorescente. A razão de um pico normal deveria encontrar-se entre 0,8 e 1,4; uma razão maior que 1,4 ou menor que 0,8 era indicativa de trissomia. Resultados entre 0,65 e 0,80 ou 1,4 e 1,8 foram considerados inconclusivos.

Cada marcador genético gera um padrão em uma área definida com uma cor prevista (azul, verde, amarelo/preto ou vermelho). Em indivíduos heterozigotos citogeneticamente normais para os STR analisados, esperou-se encontrar a mesma intensidade de fluorescência para os dois alelos, gerando uma razão de pico de 1:1; para uma amostra homozigótica, ambos os alelos teriam o mesmo tamanho representado somente por um pico não informativo. Quando houvesse três bandas com a mesma intensidade (1:1:1 ou 2:1) significou a presença de um cromossomo extra.

### **5.6.8 Aspectos éticos**

Foi solicitada a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), uma vez que as pacientes consentiram na coleta de material biológico de seus fetos para análise citogenética e para uma futura análise molecular durante atendimento assistencial de rotina. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 13966919.1.0000.5327. O estudo foi financiado pela Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## REFERÊNCIAS

BONET M.O. *et al.* Aneuploid unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 10, p. 958–963, 2002.

BONOMI M. *et al.* Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 40, n. 2, p. 123-134, 2017.

BUI T.H. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 30, n.3, p. 247-251. 2007.

BULL M.J. Down Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 24, p. 2344-2352, 2020.

CAPALBO A. *et al.* Human female meiosis: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics an time-lapse imaging. **Human Reproduction Update**, v.23, n. 6, p. 706–722, 2017.

CARON L., TIHY F., DALLAIRE L. Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: over 20 years of cytogenetic analysis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 82, n.2, p. 149-154, 1999.

EMER C.S.C. *et al.* Prevalência das malformações congênitas identificadas em fetos com trissomia dos cromossomos 13,18 e 21. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n.7, p. 333-8, 2015.

FAAS B.H.W., CIRIGLIANO V., BUI T.H. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 16, n.2, p. 81-87, 2011.

GABRIEL A.S. *et al.* An algorithm for determining the origin of trisomy and the positions of chiasmata from SNP genotype data. **Chromosome Research**, v. 19, n. 2, p. 155–163, 2011.

GRAVHOLT C.H. *et al.* Turner syndrome:mechanisms and management. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n.10, p.601-614, 2019.

HASSOLD T., HUNT P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 4, p. 280-91, 2001.

HUI L. Noninvasive approaches to prenatal diagnosis: historical perspective and future directions. **Methods in Molecular Biology**, p. 45-58, 2019.

KHANDEKAR S., DIVE A., MUNDE P. Chromosomal abnormalities - a review. **Central India Journal of Dental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 35-40, 2013.

KASER D. The status of genetic screening in recurrent pregnancy loss. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 45, n. 1, p. 143–154, 2018.

LODISH H. *et al.* Biologia celular e molecular. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MACHADO I.N., MUÇOUÇAH J.K.R.H., BARINI R. Testes genéticos em diagnóstico pré-natal: onde estamos, para onde vamos. **FEMINA**, v. 40, n. 2, p. 87-96. 2012.

MACLEENAN M., CRICHTON J.H., PLAYFOOT C.J., ADAMS I.R. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, p. 68-76, 2015.

MAGALHÃES J.A.A., MAGALHÃES O.A. Medicina Fetal. In: Rotinas em Obstetrícia, 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. cap 3, p.46-57.

MALUF S., RIEGEL M. *et al.* Citogenética Humana. Artes Médicas, Porto Alegre, 2011 336 pp.

MARQUI A.B.T. Anormalidades cromossômicas em abortos recorrentes por análise de cariótipo convencional. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.18, n.2, p. 277-288, 2018.

MENACHA J., LEVY B., HIRSCHHORN K., KARDON N. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from 12-year study. **Genetics in Medicine**, v.7, n. 4, p. 251-263, 2005.

MORAES R.W. *et al.* Validation of QF-PCR for prenatal diagnoses in a Brazilian population. **CLINICS**, v. 72, n. 7, p. 400-404, 2017.

ROSA R.F.M. *et al.* Trissomia 18: revisão dos aspectos clínicos, etiológicos, prognósticos e éticos. **Revista Paulista de Pediatria**, v.31, n.1, p. 111-120, 2013.

RIEGEL M. Human molecular cytogenetics:From cells to nucleotides. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 194-209, 2014.

RICKMAN L., FIEGLER H., CARTER N.P., BROBOW M. Prenatal diagnosis by Array-CGH. **European Journal of Medical Genetics**, p. 232–240, 2005.

SILVA M. *et al.* European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. **European Journal of Human Genetics**, v.27, n.1, p. 1-16, 2019.

STRACHAN T., READ A.P. Genética molecular humana. 2 ed. Porto Alegre:Artmed Editora,2002.

SCHOUTEN J., VUGHT P.V., GALJAARD R.J. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for prenatal diagnosis of common aneuploidies. **Methods in Molecular Biology**, p.161-170, 2019.

SUN L. *et al.* Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy for chromosomes 21, 18, 13, X, and Y using segmental duplication quantitative fluorescent PCR (SD- QF-PCR). **Gene**, p. 72–78, 2017.

WU T. *et al.* Evaluation of two aneuploidy screening tests for chorionic villus samples: Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization. **Molecular and Cellular Probes**, p 1- 5, 2019.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 ARTIGO**

O artigo abaixo é resultado da pesquisa realizada durante o mestrado acadêmico da aluna Andryele Zaffari Machado sob orientação de Sandra Leistner-Segal e será submetido à Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.

#### **Aplicação da técnica de reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa (QF-PCR) para detecção de aneuploidias em diferentes tecidos fetais**

Andryele Zaffari Machado<sup>1</sup>

Sandra Leistner-Segal<sup>2</sup>

Rejane Gus<sup>2</sup>

Maria Teresa Vieira Sanseverino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (PPGSCA) – UFRGS

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica – HCPA























## 7 CONCLUSÃO

Este método mostrou-se aplicável em nossas amostras, porém para que pudéssemos avaliar sua eficácia um número amostral de maior impacto seria necessário. Além disto, pelo fato de alíquotas de DNA extraídas estarem congeladas não é possível saber as condições das amostras, principalmente quanto a presença de sangue nas amostras de líquido amniótico e quanto a contaminação por células maternas nas amostras de vilosidades coriônicas provindas de material de aborto. Entretanto, levando em consideração que muitas destas amostras não seriam analisadas devido a falha/contaminação nas culturas, torna-se atrativa nestes casos e agregam qualidade ao diagnóstico genético, sendo uma alternativa de fácil realização em qualquer tipo de material biológico.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A utilização da técnica de QF-PCR apesar de difundida em diversos países desenvolvidos parece sofrer resistência dos centros de saúde em usá-la como método único de diagnóstico, sendo utilizada em sua maioria concomitantemente ao cariótipo. Muitas são as dificuldades que temos que enfrentar para que o Diagnóstico Pré-Natal tenha o suporte necessário para se atualizar e buscar novos métodos que melhorariam os desfechos diagnósticos. Muitos ainda são os obstáculos que temos que desviar para alavancar essa área, entretanto com esse trabalho demonstramos que a parte técnica é viável e possível em vários tecidos fetais, e com isso podemos aconselhar muitos casais cuja gestação é altamente ansiogênica.