

# Testes genéticos em diagnóstico pré-natal: onde estamos, para onde vamos

Prenatal genetic testing: where we are at, where we are heading to

Isabela Nelly Machado<sup>1</sup>  
Juliana Karina R. Heinrich-Muçouçah<sup>2</sup>  
Ricardo Barini<sup>3</sup>

## Palavras-chave

Diagnóstico pré-natal  
Testes genéticos  
Anormalidades congênitas  
Citogenética  
Biologia molecular

## Keywords

Prenatal diagnosis  
Genetic testing  
Congenital abnormalities  
Cytogenetics  
Molecular biology

## Resumo

Este texto tem como objetivo apresentar uma revisão acerca do estado da arte da citogenética convencional e molecular aplicada ao diagnóstico pré-natal, discutindo as aplicações, vantagens e desvantagens dos diferentes métodos, em suas bases teóricas e históricas. Desde 1960, a citogenética convencional, com a análise microscópica dos cromossomos em divisão, vem sendo utilizada como padrão-ouro. Entretanto, mesmo adotando essa abordagem, para uma significativa parcela de casos não é possível estabelecer diagnóstico sindrômico definitivo em cerca de metade dos pacientes que apresentam cariótipo normal, na presença de malformações. Para esse grupo, as técnicas moleculares que envolvem estudos em nível genômico poderiam permitir a identificação de novos microarranjos cromossômicos possivelmente responsáveis pelo fenótipo anormal, contribuindo para a caracterização molecular e estabelecimento de um diagnóstico mais preciso, uma abordagem perinatal mais adequada e um aconselhamento genético mais detalhado. Destaca-se o advento das técnicas de FISH, SKY, CGH e *array* CGH como promissoras aliadas, de forma complementar ao cariótipo convencional.

## Abstract

This paper aims at presenting a review of the state of the art of conventional and molecular cytogenetics applied to prenatal diagnosis, the applications, pros and cons of different techniques and their historical and theoretical background. Since 1960, conventional cytogenetics, based on the analysis of chromosomes has been used as a gold standard. However, for a significant proportion of cases it is not possible to establish definitive syndromic diagnosis in about half of the patients with normal karyotype in the presence of malformations. For this group, molecular techniques at the genomic level might allow the identification of new chromosomal areas potentially responsible for the abnormal phenotype, contributing to the molecular characterization and establishment of a more accurate diagnosis and the most appropriate perinatal approach, including a more detailed genetic counseling. The advent of FISH techniques, SKY, CGH and *array* CGH will be discussed as promising tools to complement cytogenetic diagnosis based on conventional karyotyping.

Estudo realizado no Programa de Medicina Fetal do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM/UNICAMP) – Campinas (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Mestre e Doutora em Tocoginecologia pela Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – Campinas (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Doutora em Ciências Médicas, Citogeneticista, Supervisora dos Laboratórios Clínicos Especializados do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM) da Unicamp – Campinas (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Professor Livre Docente do Departamento de Tocoginecologia da FCM da Unicamp – Campinas (SP), Brasil.

**Endereço para correspondência:** Isabela Nelly Machado – Rua Alexander Fleming, 101 – Cidade Universitária – Unicamp – CEP 13083-970 – Campinas (SP), Brasil – E-mail: imachado@fcm.unicamp.br

## Introdução

Por que fazer investigação genética?

Define-se como malformação congênita toda anomalia funcional ou estrutural do desenvolvimento do feto decorrente de fator originado antes do nascimento, seja genético, ambiental ou desconhecido, mesmo quando sua manifestação for tardia e não for aparente no recém-nascido<sup>1</sup> (D). Cerca de 2 a 5% dos recém-nascidos vivos apresentam pelo menos uma anomalia congênita identificável ao nascimento, variando desde anomalias discretas até graves defeitos que comprometem a sobrevivência. Dados oriundos de estudos internacionais e do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênicas (ECLAMC) confirmam que a incidência na América Latina não difere, significativamente, daquela encontrada em outras regiões do mundo, apesar de ainda existirem sub-registros<sup>2</sup>.

Desde a introdução do exame ultrasonográfico na assistência pré-natal, sua aplicação tem sofrido profundas transformações e supera em muito a simples verificação do número de fetos, sua vitalidade e datação. Os progressos na tecnologia da ultrasonografia, a maior experiência acumulada pelos serviços especializados e o maior acesso da população aos serviços de ultrasonografia têm contribuído para um aumento significativo da detecção de fetos com malformações. Concomitantemente, o aumento do acesso a estudos citogenéticos levou à procura do conhecimento sobre a correlação entre achados ultrasonográficos e alterações do cariótipo<sup>3</sup> (B). A ultrasonografia na identificação de fetos portadores de cromossomopatias mostrou-se um método com alto valor preditivo negativo, o que corresponde dizer que na ausência de malformações detectadas, a possibilidade de o feto ter uma anomalia cromossômica é baixa<sup>4</sup> (B).

As causas genéticas, isoladamente ou em conjunto com causas ambientais, estão envolvidas em, pelo menos, um terço das malformações congênicas. Dentre as causas genéticas, as anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais estão presentes em cerca de 0,9% de uma amostra não selecionada de recém-nascidos<sup>5</sup> (C) e em mais de 10% dos natimortos<sup>6</sup> (C). A frequência geral de anomalias citogenéticas em fetos malformados é de, aproximadamente, 10 a 15%<sup>7</sup> (C). Desses, cerca de 80% são trissomias dos cromossomos 13, 18 ou 21. O restante envolve alterações numéricas nos cromossomos sexuais e rearranjos cromossômicos estruturais<sup>8</sup> (C). Torna-se justificável, portanto, a conduta de se indicar a análise cromossômica de todos os natimortos e neomortos, com ou sem fenótipos dismórficos, e de todos os fetos com malformações, principalmente quando estão presentes mais de uma anomalia ou quando há história familiar de malformações congênicas.

O diagnóstico pré-natal dos fetos portadores de malformações congênicas e cromossômicas justifica-se pela possibilidade de interrupção da gestação, em alguns casos, e pela programação da assistência perinatal. O momento do diagnóstico também se mostra oportuno pela alta incidência de óbito fetal com subsequente maceração fetal, o que poderia dificultar a análise citogenética pós-natal, inviabilizando muitas vezes o diagnóstico.

Além disso, as implicações do diagnóstico genético envolvem desde a referência para especialistas, a intervenção terapêutica para síndromes específicas, até o rastreamento de outras malformações. As implicações também se estendem no sentido da diminuição do número de procedimentos diagnósticos a que o paciente poderia ser submetido. Para a família, o diagnóstico pode diminuir a ansiedade e permitir um adequado aconselhamento de risco e planejamento para a futura prole.

Entretanto, mesmo adotando essa abordagem, uma significativa parcela das anomalias congênicas permanece com etiologia desconhecida. Mesmo após o nascimento, com o exame físico completo e exames complementares diversos, os centros especializados em diagnóstico em dismorfologia não conseguem estabelecer diagnóstico sindrômico definitivo em cerca da metade dos pacientes. Para esse grupo, as técnicas moleculares que envolvem estudos em nível genômico poderiam permitir a identificação de novos microarranjos cromossômicos possivelmente responsáveis pelo fenótipo anormal, contribuindo para a caracterização molecular e estabelecimento de um diagnóstico mais preciso, uma abordagem perinatal mais adequada e um aconselhamento genético mais detalhado.

Este texto teve como objetivo apresentar uma revisão dos testes genéticos disponíveis para o diagnóstico pré-natal, discutindo as aplicações, vantagens e desvantagens dos diferentes métodos, suas bases teóricas e históricas, incluindo as novas técnicas moleculares.

## Diagnóstico das anomalias cromossômicas

### Técnicas atuais

A análise microscópica dos cromossomos tem sido o padrão-ouro para o diagnóstico das anomalias cromossômicas desde o desenvolvimento da técnica do bandamento G, no final da década de 1960. Resumidamente, após o período de crescimento celular, é realizado o bloqueio das células em metáfase. Nessa fase, como a duplicação da molécula de DNA (ADN, em português: *ácido desoxirribonucleico*; ou DNA, em inglês: *deoxyribonucleic acid*) já aconteceu, os cromossomos exibem duas cromátides e o centrômero. A análise é realizada em, pelo menos, 15–20 células, havendo a indicação de um maior número de células para os casos suspeitos de mosaicismos.

As metáfases são documentadas e analisadas manualmente ou com o auxílio de *softwares* de captura e análise de imagens.

Para o diagnóstico pré-natal é comum a obtenção do cariótipo a partir de sangue do cordão umbilical, líquido amniótico e vilosidades coriônicas, dependendo da idade gestacional. No entanto, teoricamente, é possível obter o cariótipo a partir de qualquer tecido que tenha sua viabilidade preservada e possa ser submetido ao cultivo celular para obtenção de metáfases<sup>9</sup> (B). O tempo para a obtenção dos resultados varia de acordo com o material estudado, a viabilidade das células cultivadas, as condições técnicas laboratoriais, os reagentes utilizados e o preparo da amostra, dentre outros fatores. Em média, esse período é de 7 a 15 dias para cultura de vilos corial ou de líquido amniótico, e de 3 a 7 dias para sangue fetal (Figura 1). A preparação direta do vilos corial, sem a cultura das células, permite a obtenção de resultados em até 24 horas, mas a baixa resolução dos cromossomos limita a sua aplicação, impossibilitando, por vezes, a exclusão de anomalias estruturais.

O nível de resolução de uma técnica citogenética é determinado pelo número de bandas cromossômicas visíveis. Quanto maior o número de bandas, maior a resolução do exame e maior o poder de exclusão de pequenas deleções e anomalias estruturais. Em geral, uma resolução de 450–550 bandas é suficiente para a maioria das análises clínicas, incluindo o diagnóstico pré-natal. As técnicas convencionais atuais de cariotipagem por coloração e bandamento de cromossomos, oriundos de células em divisão e sob aumento microscópico de 1000 x, são capazes de detectar anomalias cromossômicas numéricas e estruturais que tenham, pelo menos, de 5 a 10 milhões de pares de base de DNA (5–10 Mb), que corresponde ao poder de resolução do método e contém uma “banda” cromossômica. Classicamente, os laudos de cariótipo devem incluir o padrão de bandas verificado naquela amostra para que seu resultado seja corretamente interpretado.

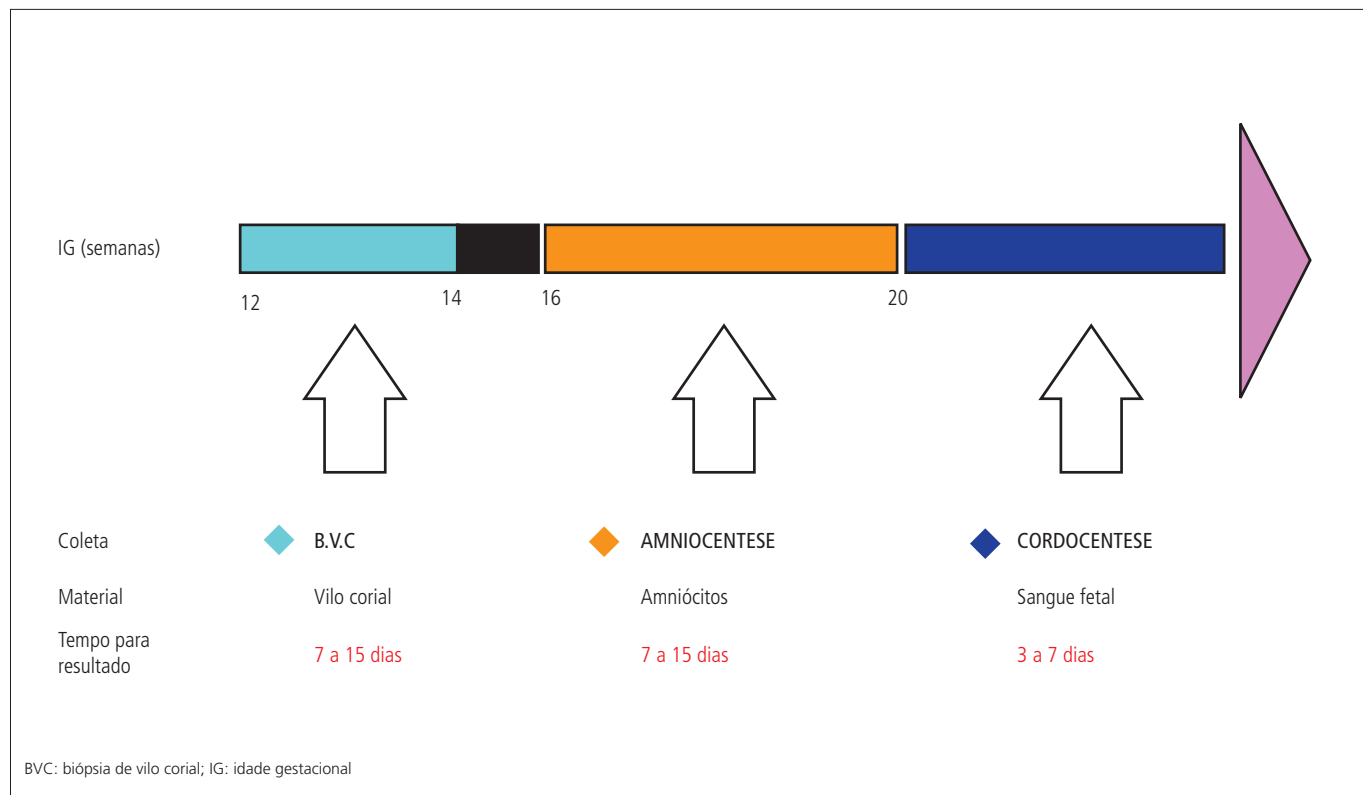
Em situações especiais, pode-se indicar o bandamento de alta resolução, em que são analisados os cromossomos durante a prófase, prometáfase ou estágios precoces da placa metafásica ou, ainda, cromossomos metafásicos tratados com reagentes específicos. Essas técnicas propiciam cromossomos mais estendidos que os cromossomos observados em metáfase convencional, permitindo a observação de um número maior de bandas e a detecção de anomalias menores e que exijam um padrão de resolução melhor para sua visualização, como quando há pequenas bandas ou bandas claras envolvidas (Figura 2). Dentre as anomalias que podem exigir um padrão diferenciado de resolução, pode-se citar as deleções mais frequentes em 22q (di Georgi), 5p (Cri du Chat), 17p (Smith-Magenis) e 15q (Prader-Willi/Angelman).

Embora muito confiável e ainda considerada o padrão-ouro para a investigação de anomalias relacionadas aos cromossomos, a análise citogenética convencional apresenta algumas limitações, como falhas de cultivo celular e a necessidade de profissional experiente para a leitura e interpretação dos resultados de forma confiável. No diagnóstico pré-natal, outras limitações importantes estão relacionadas à baixa qualidade das preparações cromossômicas, obtidas em uma parcela significativa das vezes, e que impossibilita a detecção de anomalias estruturais e microarranjos cromossômicos menores que 5–10 Mb. Além disso, a necessidade de cultivo celular de longa duração acaba por impactar significativamente no tempo relativamente longo para a liberação de resultados.

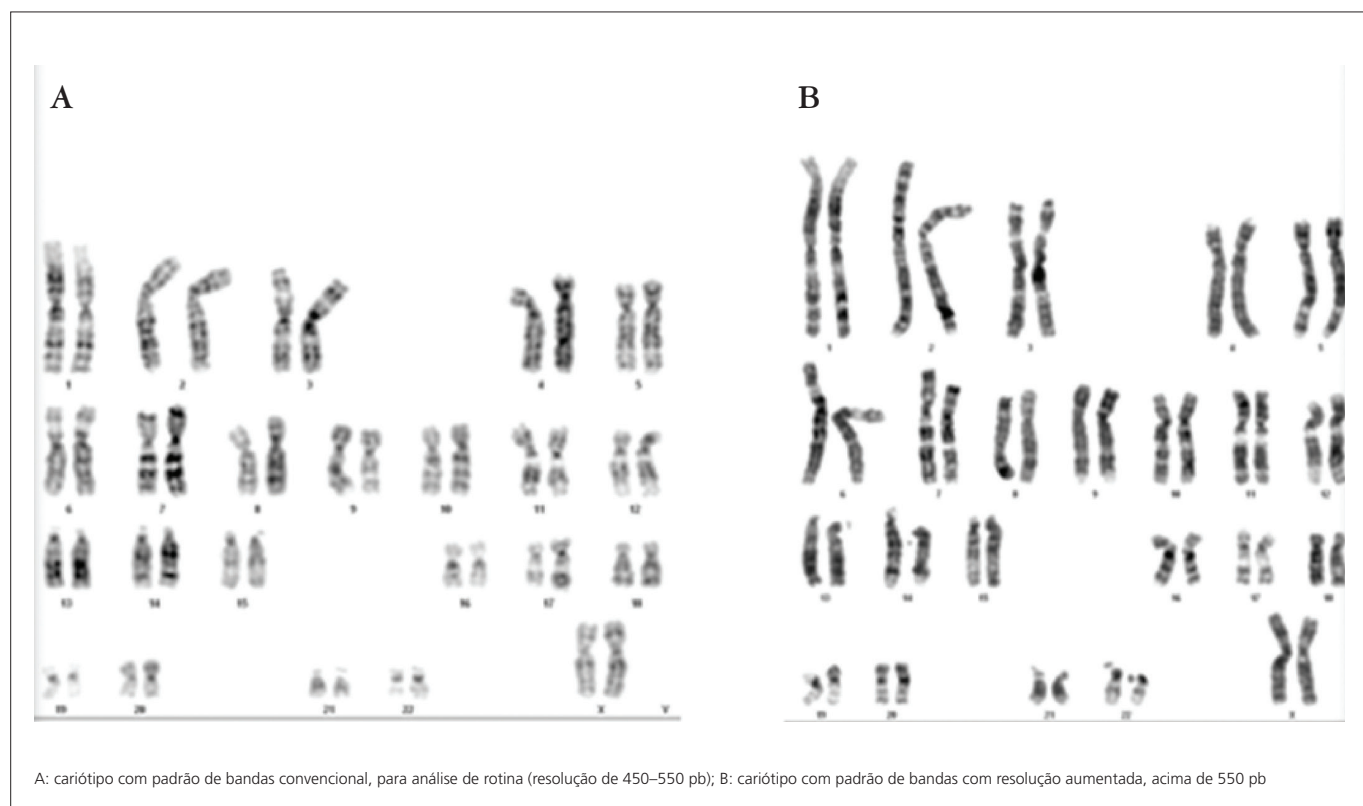
Nas últimas décadas, a citogenética clínica assistiu a um extraordinário avanço das técnicas de biologia molecular. A confluência dos enfoques molecular e citogenético – a citogenética molecular – revolucionou as possibilidades e a precisão diagnóstica. O sequenciamento do genoma humano tem contribuído neste sentido, permitindo um rastreamento de maior resolução para anomalias cromossômicas. Essas alterações genômicas constituem cerca de 15% de todas as mutações que envolvem as doenças monogênicas em humanos<sup>10</sup> (C). As limitações de resolução do bandamento convencional podem ser, em grande parte, superadas pelas novas técnicas moleculares, com aplicações clínicas evidentes no diagnóstico de microdeleção, rearranjos subteloméricos, cromossomos marcadores e derivados, e rearranjos gênicos.

A técnica molecular mais difundida é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH – *Fluorescent In Situ Hybridization*). Consiste na hibridização (ligação específica) de um DNA-molde (sonda) a seu alvo complementar em um cromossomo ou núcleo interfásico, avaliando-se a presença ou ausência de uma sequência específica de DNA ou região cromossômica. Portanto, a técnica de FISH é *locus*-específica e exige que se conheça a sequência de DNA de interesse para a escolha adequada da sonda a ser utilizada. Em Medicina Fetal, é empregada para a detecção precoce de trisomias em células não cultivadas, analisando simultaneamente cinco sondas para os cromossomos envolvidos nas aneuploidias mais frequentes (13, 18, 21, X e Y) e para a confirmação de síndromes de microdeleções ou microduplicações. A grande vantagem em relação às técnicas convencionais é o curto tempo para obtenção do resultado, sendo possível a obtenção de um resultado em pelo menos duas horas.

Várias outras técnicas surgiram baseadas no método de FISH original. Usando sondas fluorescentes cromossomo-específicas e hibridização de um “coquetel” de 24 sondas, gerado a partir da combinação de cinco fluorocromos, as



**Figura 1** - Estudo do cariótipo fetal.



**Figura 2** - Imagem digitalizada, análise por software, dos cromossomos de uma célula feminina normal (46,XX) em dois diferentes padrões de bandas.

técnicas de FISH multicolor (M-FISH) e cariótipo espectral (*Spectral Karyotyping* – SKY) identificam cada cromossomo pela emissão específica de *pixels* através de um programa de computador, com a visualização de todos os cromossomos em um único experimento. Cada cromossomo assume uma “assinatura” espectral, possibilitando a identificação de rearranjos complexos que envolvem mais de dois cromossomos, bem como a origem e o conteúdo de cromossomos marcadores, com uma resolução de 1–5 Mb para o M-FISH<sup>11</sup> (B) e 1–2 Mb para o SKY<sup>12</sup> (B).

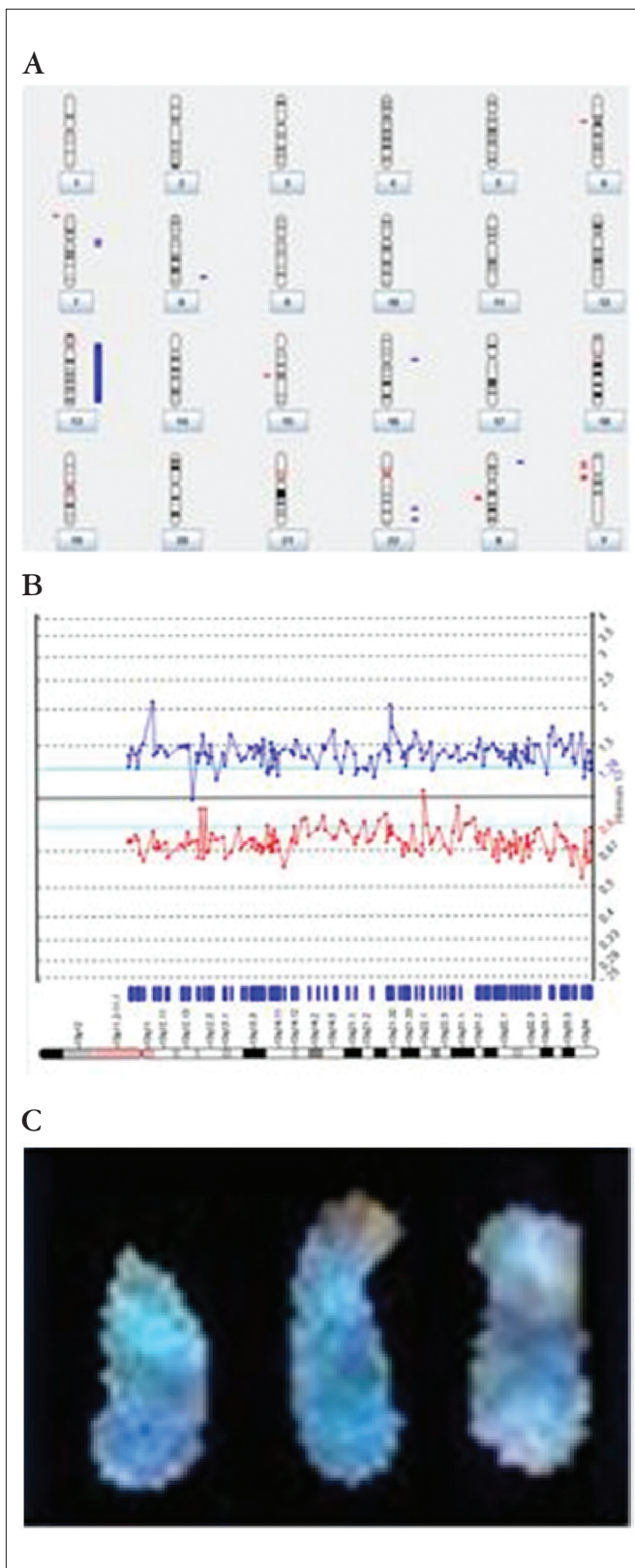
A abordagem da citogenética convencional associada às técnicas moleculares no estudo das dismorfologias tem permitido uma maior correlação entre genótipo e fenótipo, com o diagnóstico de um número crescente de “síndromes de microarranjos” ou “instabilidade genômica”. Esse termo “instabilidade genômica” tem sido amplamente utilizado para descrever um fenômeno que resulta no acúmulo de múltiplas modificações, que levam a conversão de um genoma de uma célula normal a um genoma instável<sup>13</sup> (B). Esses rearranjos cromossômicos não balanceados respondem por 1 a 2% das anormalidades em amostras pré-natais, e podem levar a sérias consequências fenotípicas<sup>14</sup> (B). A maior limitação das técnicas moleculares descritas até aqui é que essas técnicas não detectam essas “instabilidades genômicas”.

### Introduzindo novas técnicas

#### Estudo genômico e microarranjos

O desenvolvimento da tecnologia de microarranjos no início da década de 1990, na Universidade de Stanford<sup>15</sup>, baseou-se fortemente em seis principais disciplinas: Biologia, Química, Física, Engenharia, Matemática e Ciência da Computação. A alta complexidade tecnológica envolvida, combinando a experiência de tantas disciplinas diferentes, permitiu uma visão quantitativa e sistemática do sistema biológico. Essa ciência nova e revolucionária usa matrizes de vidro microscópicas (microarranjos) para análise quantitativa de genes (ou parte deles) e produtos de genes. Tem a sua raiz em avanços entre a descoberta do DNA em 1950 e do Projeto Genoma Humano, em 1990.

A hibridização genômica comparativa (*comparative genomic hybridization* – CGH) foi pioneira e desenvolvida como método de rastreamento genômico na tentativa de se identificar desequilíbrios no número de cópias do DNA, ou seja, as instabilidades genômicas. A técnica de CGH consiste na hibridização competitiva de DNA teste e DNA normal, marcados com fluorocromos diferentes<sup>16</sup> (B). Originalmente, utilizavam-se



A: representação gráfica dos cromossomos da célula (ideograma), evidenciando uma completa duplicação do cromossomo 13, pela técnica de array CGH; B: gráfico do cromossomo 13, mostrando duplicação de todas as regiões estudadas, pela técnica de array CGH; C: representação digitalizada dos 3 pares do cromossomo 13 pela técnica de SKY

**Figura 3** - Formas de apresentação de um resultado de array CGH e SKY de uma célula com trissomia do cromossomo 13.

metáfases normais fixadas em lâmina e foi conhecida como CGH metafásico, cromossômico ou convencional.

A técnica de CGH metafásico teve sua principal aplicabilidade na área de genética do câncer<sup>17</sup> (B). Outras aplicações clínicas como em dismorfologias, distúrbios mentais e de aprendizagem também foram testadas, evidenciando um aumento no diagnóstico de deleções ou duplicações não identificadas pelo bandamento G<sup>18,19</sup> (B). Para o diagnóstico pré-natal, a técnica foi validada estudando-se retrospectivamente fetos sabidamente portadores de aneuploidias totais ou parciais<sup>20-23</sup> (C), mostrando-se equivalente às técnicas citogenéticas de alta resolução, porém com a vantagem de não necessitar de cultivo celular. Sua utilidade como ferramenta complementar ao cariótipo convencional também já foi testada no diagnóstico pré-natal<sup>24</sup> (C). Entretanto, o delineamento de bandas e regiões específicas na técnica de CGH convencional é limitado pela resolução dos cromossomos metafásicos e estima-se que seja de 3–10 Mb<sup>16,20,25</sup> (C), e nela encontra-se sua maior limitação.

Mantendo o mesmo princípio de comparação entre DNA teste (amostra) e DNA normal (referência) e acoplado-se à tecnologia de microarranjos (*microarrays* ou *arrays*)<sup>26</sup> (C), desenvolveu-se uma nova técnica de análise genômica comparativa, agora baseada em microarranjos, conhecida como *array* CGH. Basicamente, a técnica utiliza vários fragmentos pré-selecionados de DNA anexados, de forma *locus*-específica em uma superfície de vidro (lâmina de microscopia). O DNA anexado pode ser fragmentos de DNA clonados a partir de bactérias (BAC – *Bacterial Artificial Chromosomes*) ou de P1 (PAC – *P1 Artificial Chromosomes*)<sup>27</sup> (C), cDNA<sup>28</sup> (C), oligonucleotídeos sintéticos<sup>29</sup> (C) ou fragmentos de PCR<sup>30</sup> (C).

O tipo de DNA utilizado e a quantidade de regiões pesquisadas variam entre protocolos distintos ou plataformas disponíveis. A escolha das regiões incluídas na pesquisa define sua classificação em dois tipos: o *array* CGH representativo do genoma inteiro e o direcionado para regiões específicas, geralmente envolvidas em arranjos cromossômicos já descritos. A resolução obtida pelos diferentes tipos de *array* CGH depende do número e da dimensão de clones pesquisados e da distância entre clones consecutivos. Os *arrays* construídos, a partir de BAC clones, têm a resolução de 50–150 kb e os *arrays* de oligonucleotídeos podem chegar de 25–85 pb de resolução.

Técnicamente, quantidades idênticas de DNA teste e DNA de referência são marcadas com fluorocromos, e após serem co-hibridizadas, a diferença das intensidades emitidas para cada região pesquisada é aferida. Quando a intensidade de fluorescência é menor na amostra testada em relação à amostra de referência, infere-se que há perda genômica na respectiva região (“deleção” ou “perda”) e, na situação contrária, infere-se ganho genômico (“duplicação” ou “ganho”).

A técnica de *array* CGH oferece importantes vantagens sobre os demais métodos de diagnóstico citogenético. Primeiramente, por não ser necessária a obtenção de metáfases e por permitir a análise do DNA extraído de diferentes tipos de tecidos, até mesmo de tecidos incluídos em parafina. Outras vantagens incluem a capacidade de investigar milhares de regiões cromossômicas em uma única análise, em um curto período de tempo e com alta resolução, superando as limitações do cariótipo convencional e do CGH metafásico. A Figura 3 mostra um exemplo de resultado de uma análise de *array* CGH.

Sua limitação inerente aos princípios da técnica encontra-se no fato de não ser capaz de identificar anomalias cromossômicas que não levam à alteração do número total de cópias de um segmento de DNA dentro do genoma, como as translocações balanceadas e inversões. Também, a normalização da intensidade de fluorescência duplicada gerada nas euploidias dificulta sua identificação. A técnica também encontra emprego limitado em casos de mosaicismos. Essa última limitação vem sendo superada com o aumento na experiência da interpretação dos resultados<sup>31</sup> (C).

O aumento na cobertura das regiões genômicas nas plataformas de *array* CGH representativo do genoma inteiro é responsável por uma taxa adicional de 5% na detecção de microarranjos cromossômicos em comparação às plataformas de *array* CGH direcionado para regiões específicas (*target arrays*)<sup>32</sup> (B). Entretanto, ao mesmo tempo em que as análises de alta resolução são capazes de identificar anomalias patológicas, elas incorrem na problemática da identificação de ganhos e perdas genômicas em regiões com significado clínico desconhecido. Uma adequada discriminação entre as variações inofensivas e as verdadeiras aberrações é essencial para um aconselhamento adequado.

As variações do número de cópias – *copy number variantion* (CNVs) podem ser de difícil avaliação e interpretação. A variedade metodológica usada na geração das informações que formam os bancos de dados de pesquisa de CNVs disponíveis eletronicamente torna difícil discernir a exata extensão de cada provável CNV encontrada. Essa falta de uniformidade metodológica pode confundir a correta interpretação de um achado cromossômico anormal presente em um indivíduo “fenotipicamente” anormal, mas sobreposta total ou parcialmente a uma região com CVN descrita. Outro problema é o achado de um ganho em uma região onde está descrita uma deleção como CNV e vice-versa. Nessas situações, não há como inferir que o rearranjo também seja um achado benigno.

A identificação de CNVs também pode variar de acordo com a plataforma de *array* CGH empregada. Um estudo recente, testando os mesmos 20 pacientes, mostrou que o número encontrado de CNVs, utilizando-se a técnica de *array* CGH contendo

BAC clones, foi maior quando comparado com os encontrados quando se aplicou *array* CGH de oligonucleotídeos<sup>33</sup> (C). Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que os clones gerados de bactérias (BAC) são fragmentos maiores que as sondas de oligonucleotídeos, com a conseqüente sobreposição de regiões. Além disso, os BAC clones podem englobar regiões de DNA repetitivo, sabidamente associadas às CNVs.

Com o aumento da experiência clínica com essa técnica diagnóstica e com o desenvolvimento dos bancos de dados de CNVs, tanto para indivíduos afetados quanto para não afetados, espera-se alcançar uma redução dos achados de CNVs de significado clínico indeterminado, tornando os *arrays* de genoma inteiro mais útil na prática clínica.

### Array CGH no diagnóstico pré-natal

O uso da técnica de *array* CGH na Medicina Materno Fetal tem sido recentemente testado. Os primeiros estudos observaram um aumento na taxa de detecção de alterações cromossômicas não identificadas pela técnica convencional de 10 a 16% em tecidos fetais congelados e material de aborto<sup>34,35</sup> (C). Após os estudos iniciais retrospectivos que introduziram a validação da técnica de *array* CGH para diagnóstico pré-natal, começaram a surgir os primeiros estudos prospectivos. No primeiro estudo prospectivo em diagnóstico pré-natal foi encontrada uma taxa de detecção de anormalidades cromossômicas de 43% dos 98 fetos estudados<sup>36</sup> (B). Estudos subsequentes encontraram diferentes taxas de detecção (Tabela 1). Essas diferentes taxas refletem a heterogeneidade dos trabalhos. Isso porque, apesar de as técnicas de *array* CGH terem um princípio teórico e molecular comum, os estudos publicados apresentam diferentes metodologias na seleção de fetos, desenho do estudo, plataformas de *array* CGH, análises de bioinformática, e interpretação dos resultados, fazendo com que a comparação entre os diversos trabalhos não seja totalmente isenta de erros.

É interessante notar que a presença de uma deleção ou duplicação por si só não significa necessariamente que a alteração genômica é causa do fenótipo observado. Não se pode também assegurar que um determinado desequilíbrio no número de cópias é patogênico com base apenas na sua associação com uma determinada malformação fetal identificada por ecografia. No entanto, o feto que apresenta uma anomalia estrutural significativa tem, *a priori*, um alto risco de ter anormalidade genética e, como é verdadeiro para qualquer teste, é mais provável que o desequilíbrio no número de cópias encontrado seja um verdadeiro-positivo.

A aplicabilidade clínica da técnica de *array* CGH no diagnóstico pré-natal, até o momento, parece bem estabelecida para o refinamento do diagnóstico em casos suspeitos ou com diagnóstico inconclusivo de mudanças estruturais cromossômicas. Na literatura recente, foi encontrado um número crescente de publicações que reforçam essa aplicabilidade clínica pré-natal<sup>37,38</sup> (C). Outras situações, por exemplo, incluem o estudo de translocações supostamente equilibradas por cariótipo convencional, mas que revelaram padrão de desequilíbrio no *array* CGH<sup>39</sup> (C), e para o dimensionamento e a localização exata das anormalidades cromossômicas estruturais.

Fetos com o defeito congênito específico também parecem beneficiar-se com a técnica de CGH, como demonstrado para a caracterização molecular dos fetos com holoprosencefalia<sup>40</sup> (C) e hérnia diafragmática congênita<sup>41</sup> (C). O *array* CGH nesses casos poderia contribuir para o conhecimento da caracterização da instabilidade genômica submicroscópica presente na anomalia congênita em questão, indicando alterações em regiões cromossômicas recorrentes em fetos com o mesmo fenótipo. Dessa forma, poderia identificar alguns clones e regiões cromossômicas de interesse clínico para avaliação molecular mais detalhada para aquele fenótipo. Pesquisas adicionais e confirmação são necessárias para melhor esta-

**Tabela 1** - Número de fetos com alterações do número de cópias e variações do número de cópias em recentes estudos com *array* CGH em amostras pré-natais

Estudo	n	Fetos com alterações do número de cópias	Fetos com variações do número de cópias
Le Caignec et al. <sup>35</sup>	49	8 (16%)	NL
Sahoo et al. <sup>36</sup>	98	42 (43%)	30 (71%)
Shaffer et al. <sup>46</sup>	151*	15 (10%)	12 (80%)
Kleeman et al. <sup>47</sup>	50	4 (8%)	3 (75%)
Vialard et al. <sup>48</sup>	37**	4 (10%)	NL
Van den Veyver et al. <sup>49</sup>	300	58 (19%)	40 (69%)
Machado et al. <sup>50</sup>	48	45 (94%)	39 (87%)

NL: não listado; n: número de fetos incluídos.

\*Considerando apenas as amostras pré-natais

\*\*Considerando apenas os fetos com cariótipo normal

belecer o papel dos genes dessas regiões cromossômicas na patogênese de cada defeito congênito específico

Um problema a ser superado é a identificação de CNVs, que pode complicar muito a interpretação dos resultados das técnicas de *array* CGH. Essa questão é particularmente crítica para o diagnóstico pré-natal, onde o resultado “normal” ou não define a abordagem perinatal. Uma discriminação adequada entre as variações inofensivas e as aberrações reais é essencial para o aconselhamento adequado.

Considerando o exposto e com base na recomendação publicada pelo *American College of Obstetrics and Gynecology*, em 2009<sup>42</sup> (D), a utilidade do *array* CGH como uma ferramenta de primeira linha na detecção de anormalidades cromossômicas em todas as amostras de amniocentese ou biópsia do viló corial é ainda desconhecido, e portanto, o *array* CGH não pode substituir a citogenética clássica no diagnóstico pré-natal. A taxa de detecção adicional de anormalidades cromossômicas usando *array* CGH, em comparação com cariótipo convencional para análise cromossômica fetal de rotina, aguarda mais estudos, de base populacional (Quadro 1).

Um grupo internacional de especialistas na área de *array* CGH, *The International Standard Cytogenomic Array* (ISCA) Consortium, realizou dois *workshops* internacionais e efetuou uma revisão de literatura de 33 estudos, incluindo 21.698 pacientes testados por *microarray*. Eles forneceram um relatório baseado em evidências de testes de citogenética clínica comparando *array* CGH e cariótipo com bandamento G convencional, em relação às vantagens técnicas e limitações, rendimento

**Quadro 1** - Recomendações do Colégio Americano de Ginecologistas e Obstetras (*American Society of Obstetrics and Gynecologists*) para *array* CGH em diagnóstico pré-natal<sup>42</sup> (D)

O cariótipo convencional permanece como principal ferramenta para o diagnóstico citogenético pré-natal.

A técnica de *array* CGH direcionado para regiões específicas (“target”), em conjunto com o aconselhamento genético, pode ser oferecida como uma ferramenta adicional em casos de fetos com malformações e cariótipo convencional normal, bem como para casos de fetos com malformações que evoluírem para óbito na impossibilidade de obtenção de material para estudo citogenético convencional.

Os casais que optarem pela realização do *array* CGH direcionado para regiões específicas (“target”) devem receber aconselhamento genético pré- e pós-teste. Acompanhamento genético é necessário para a interpretação dos resultados do *array* CGH. Os casais devem estar cientes de que a técnica de *array* CGH não permite a identificação de todas as patologias genéticas e que os seus resultados podem ser de difícil interpretação.

A técnica de *array* CGH direcionado para regiões específicas (“target”) pode ser útil como ferramenta de rastreamento; entretanto, estudos subsequentes são necessários para uma completa determinação de sua utilidade e limitações.

diagnóstico para vários tipos de aberrações cromossômicas, e as questões que afetam a interpretação do teste. Eles concluíram que as evidências disponíveis apoiam fortemente o uso do *array* CGH no lugar do cariótipo convencional como teste de primeira linha para o diagnóstico em pacientes com atraso no desenvolvimento/deficiência mental, transtornos do espectro do autismo ou anomalias congênitas múltiplas. No entanto, o consórcio ISCA reconhece que a evidência atual não é suficiente para permitir recomendações para o diagnóstico pré-natal, e que, os métodos de citogenética tradicional, tais como o cariótipo por bandamento G e a hibridização FISH ainda devem ser considerados como métodos diagnósticos padrão para o diagnóstico pré-natal<sup>43</sup> (A).

## Conclusões e desafios atuais

É reconhecido que *array* CGH pode detectar alterações submicroscópicas que podem não ser detectadas na análise cromossômica de rotina, especialmente em amostras de pré-natal, onde a resolução da banda pode ser comprometida. No entanto, o papel exato do *array* CGH no fluxograma de diagnóstico pré-natal não foi estabelecido. Estudos multicêntricos são necessários para uma comparação direta do desempenho da técnica de *array* CGH para análise citogenética convencional em um ambiente pré-natal. Até o momento, não há evidências de que ela possa substituir a análise do cariótipo convencional, entretanto pode complementar e expandir os métodos atuais para se obter um diagnóstico pré-natal mais preciso e uma melhor caracterização das síndromes.

A disponibilidade de diferentes plataformas de *array* CGH para a investigação cromossômica fetal, incluindo as matrizes de oligonucleotídeos, trouxe outro desafio sobre o teste genético ideal para diagnóstico pré-natal. Até o momento, o *array* de oligonucleotídeos não se provou ser benéfico em relação aos protocolos com BAC para o diagnóstico pré-natal<sup>44</sup> (C). Novos estudos são necessários para um consenso sobre a plataforma ideal de *array* CGH para uso clínico no diagnóstico pré-natal. É desejável que, no futuro, *chips* personalizados com marcadores em regiões descobertas ou suspeitas possam ser projetados para o diagnóstico pré-natal.

Além disso, estudos adicionais são necessários para validar a aplicação clínica de *array* CGH para diferentes situações clínicas de diagnóstico pré-natal, como a idade materna avançada, o rastreio bioquímico alterado, marcadores ultrassonográficos de primeiro e segundo trimestres e em situações de ansiedade da família na presença de rastreamentos bioquímico e ultrassonográficos normais<sup>45</sup> (C).



Outro desafio a superar é a concepção de uma estratégia uniforme e eficaz para a interpretação dos resultados envolvendo as CNVs. O tempo e o esforço necessários para distinguir os achados patogênicos dos benignos aumentam na medida em que a resolução dos *arrays* CGH também aumenta, mas os resultados não interpretáveis podem ocorrer em todas as plataformas de *array* CGH disponíveis.

Apesar de os desafios ainda a serem vencidos, é evidente que a hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos vem afirmando-se como uma ferramenta valiosa na identificação e caracterização molecular das anomalias cromossômicas em fetos com defeitos congênitos, abrindo um novo capítulo na interface histórica entre a Citogenética Clínica e a Medicina Fetal.

## Leituras suplementares

- OPAS. Prevenção e controle de enfermidades genéticas e defeitos congênitos: relatório de um grupo de consulta. Washington DC.: Publicação científica 460; 1984.
- Penchaszadeh V, Christianson A, Giugliani R, Boulyjenkov V, Katz M. Services for the prevention and management of genetic disorders and birth defects in developing countries. *Community Genet.* 1999;2(4):196-201.
- Carrera J, Torrents M, Mortera C, Cusi V, Muñoz A. Routine prenatal ultrasound screening for fetal abnormalities: 22 years' experience. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1995;5(3):174-9.
- Nicolaides K, Snijders R, Gosden C, Berry C, Campbell S. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet.* 1992;340(8821):704-7.
- Jacobs P, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* 1992;29(2):103-8.
- Jackson L. Cytogenetics and molecular cytogenetics. *Clin Obstet Gynecol.* 2002;45(3):622-39; discussion 730-2.
- Nelson K, Holmes L. Malformations due to presumed spontaneous mutations in newborn infants. *N Engl J Med.* 1989;320(1):19-23.
- Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, et al. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet.* 2006;43(4):353-61.
- Cabral ACV, Machado IN, Leite HV, Pereira A, Vitral Z. Cariótipo fetal em líquido pleural obtido por toracocentese. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2001;23(4):243-6.
- Vissers L, Veltman J, van Kessel A, Brunner H. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet.* 2005;14 Spec No 2:R215-23.
- Speicher M, Gwyn Ballard S, Ward D. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 1996;12(4):368-75.
- Schröck E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jalal S, et al. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet.* 1997;101(3):255-62.
- Smith L, Nagar S, Kim G, Morgan W. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. *Health Phys.* 2003;85(1):23-9.
- Ryall R, Callen D, Cocciolone R, Duvnjak A, Esca R, Frantzis N, et al. Karyotypes found in the population declared at increased risk of Down syndrome following maternal serum screening. *Prenat Diagn.* 2001;21(7):553-7.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270(5235):467-70.
- Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(5083):818-21.
- Albertson D, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet.* 2003;12 Spec No 2:R145-52.
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 2001;38(11):740-4.
- Ness G, Lybaek H, Houge G. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet.* 2002;113(2):125-36.
- Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet.* 1995;57(5):1211-20.
- Yu L, Moore Dn, Magrane G, Cronin J, Pinkel D, Lebo R, et al. Objective aneuploidy detection for fetal and neonatal screening using comparative genomic hybridization (CGH). *Cytometry.* 1997;28(3):191-7.
- Lapierre J, Cacheux V, Collet N, Da Silva F, Hervy N, Rivet D, et al. Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities. *Ann Genet.* 1998;41(3):133-40.
- Thein A, Charles A, Davies T, Newbury-Ecob R, Soothill P. The role of comparative genomic hybridisation in prenatal diagnosis. *BJOG.* 2001;108(6):642-8.
- Heinrich JK, Machado IN, Vivas L, Bianchi MO, Andrade KC, Sbragia L, et al. Prenatal genomic profiling of abdominal wall defects through comparative genomic hybridization: perspectives for a new diagnostic tool. *Fetal Diagn Ther.* 2007;22(5):361-4.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Döhner H, et al. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999;25(4):410-3.
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998;20(2):207-11.
- Telenius H, Carter N, Bebb C, Nordenskjöld M, Ponder B, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 1992;13(3):718-25.
- Pollack J, Perou C, Alizadeh A, Eisen M, Pergamenschikov A, Williams C, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 1999;23(1):41-6.
- Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M, et al. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res.* 2003;13(10):2291-305.
- Mantripragada K, Tapia-Páez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski J. DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. *Int J Mol Med.* 2004;13(2):273-9.
- Cheung S, Shaw C, Scott D, Patel A, Sahoo T, Bacino C, et al. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(15):1679-86.
- Baldwin E, Lee J, Blake D, Bunke B, Alexander C, Kogan A, et al. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med.* 2008;10(6):415-29.
- Aradhya S, Manning M, Splendore A, Cherry A. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(13):1431-41.
- Schaeffer A, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter D, Lese Martin C. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet.* 2004;74(6):1168-74.
- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Verber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, et al. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet.* 2005;42(2):121-8.
- Sahoo T, Cheung S, Ward P, Darilek S, Patel A, del Gaudio D, et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med.* 2006;8(11):719-27.
- Machado IN, Heinrich JK, Campanhol C, Rodrigues-Peres RM, Oliveira FM, Barini R. Prenatal diagnosis of a partial trisomy 13q (q14-->qter): phenotype, cytogenetics and molecular characterization by spectral karyotyping and array comparative genomic hybridization. *Genet Mol Res.* 2010;9(1):441-8.
- Kitsiou-Tzeli S, Sismani C, Karkaletsis M, Florentin L, Anastassiou A, Koumbaris G, et al. Prenatal diagnosis of a de novo partial trisomy 10p12.1-12.2 pter originating from an unbalanced translocation onto 15qter and confirmed with array CGH. *Prenat Diagn.* 2008;28(8):770-2.
- Simovich M, Yatsenko S, Kang S, Cheung S, Dudek M, Pursley A, et al. Prenatal diagnosis of a 9q34.3 microdeletion by array-CGH in a fetus with an apparently balanced translocation. *Prenat Diagn.* 2007;27(12):1112-7.

40. Machado IN, Heinrich JK, Barini R. Genomic imbalances detected through array CGH in fetuses with holoprosencephaly. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011; 69(1):3-8.
41. Machado IN, Heinrich JK, Barini R, Peralta CF. Copy number imbalances detected with a BAC-based array comparative genomic hybridization platform in congenital diaphragmatic hernia fetuses. *Genet Mol Res*. 2011;10(1):261-7.
42. ACOG. ACOG Committee Opinion No. 446: array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol*. 2009;114(5):1161-3.
43. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010;86(5):749-64.
44. Bi W, Breman A, Venable S, Eng P, Sahoo T, Lu X, et al. Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array CGH. *Prenat Diagn*. 2008;28(10):943-9.
45. Pergament E. Controversies and challenges of array comparative genomic hybridization in prenatal genetic diagnosis. *Genet Med*. 2007;9(9):596-9.
46. Shaffer L, Coppinger J, Alliman S, Torchia B, Theisen A, Ballif B, Bejjani B: Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn*. 2008;28:789-795.
47. Kleeman L, Bianchi D, Shaffer L, Rorem E, Cowan J, Craigo S, Tighiouart H, Wilkins-Haug L: Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn*. 2009;29:1213-1217.
48. Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B, Quarello E, Escalona A, Le Sciellour C, Serazin V, Roume J, Ville Y, de Mazancourt P, Selva J: Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: Another experience. *Fetal Diagn Ther*. 2009;25:277-284.
49. Van den Veyver I, Patel A, Shaw C, Pursley A, Kang S, Simovich M, Ward P, Darilek S, Johnson A, Neill S, Bi W, White L, Eng C, Lupski J, Cheung S, Beaudet A: Clinical use of array comparative genomic hybridization (acgh) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn*. 2009;29:29-39.
50. Machado IN, Heinrich JK, Barini R. Whole genome BAC-array CGH results in fetuses with congenital malformation and normal karyotype. In: Puertas A, Montoya F, Romero J, Hurtado J, Manzanares S, editors. *Advances in Perinatal Medicine*. Milano: Monduzzi Editoriale; 2010. p. 721-5.