

MANUAL DE CITOGENÔMICA

SUMÁRIO

01. INTRODUÇÃO	4
02. CARIÓTIPO CONSTITUCIONAL COM BANDA G	10
03. CARIÓTIPO DE PRODUTO DE CONCEPÇÃO (ABORTO) COM BANDA G	12
04. CARIÓTIPO DE CORDOCENTESE COM BANDA G	14
05. CARIÓTIPO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO COM BANDA G	16
06. CARIÓTIPO DE VILOSIDADE CORIÔNICA COM BANDA G	18
07. CARIÓTIPO HEMATOLÓGICO COM BANDA G	20
08. CARIÓTIPO DE FIBROBLASTOS COM BANDA G (PELE)	22
09. CARIÓTIPO COM PESQUISA DE QUEBRAS CROMOSSÔMICA	24
10. aCGH PRÉ-NATAL – VILO CORIA	26
11. aCGH PRÉ-NATAL – LÍQUIDO AMNIÓTICO	28
12. aCGH PRÉ-NATAL – PRODUTO DE CONCEPÇÃO (ABORTO)	30
13. aCGH PÓS-NATAL	32
14. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH) - CONSTITUCIONAL	34
15. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH) - ONCOLÓGICO	36
16. AMPLIFICAÇÃO DE MÚLTIPLAS SONDAS DEPENDENTES DE LIGAÇÃO	38
17. INSTRUÇÕES GERAIS DE ENVIO DE AMOSTRA	40

01. INTRODUÇÃO

Toda variação genética, patogênica ou não, se origina do processo conhecido como mutação. Este é definido como qualquer alteração na dosagem na estrutura, no arranjo ou na sequência do DNA. Em termos amplos, as mutações podem ser classificadas em genômicas, que alteram o número de cromossomos na célula; mutações cromossômicas, que alteram a estrutura de um ou mais cromossomos; e mutações gênicas, que alteram genes individuais.

Para investigação do diagnóstico de condições causadas por mutações genômicas, tais como trissomias ou monossomias cromossômicas, a metodologia aplicada é o Cariótipo. Essa metodologia é também utilizada no estudo de condições genéticas causadas por mutações na estrutura cromossômica, tais como translocações, deleções (perdas) ou duplicações (ganhos) microscópicas parciais.

O Cariótipo se baseia no estudo dos cromossomos por meio da análise da morfologia, do tamanho e do bandamento. O exame é realizado em uma cultura de células que possibilita a obtenção de metáfases (células em divisão) e posterior coloração dos cromossomos por bandamento G (GTG). A banda G permite a análise da identificação de bandas características de cada cromossomo e, assim, a detecção de alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais, equilibradas e/ou desequilibradas, com cerca de 5 Mb.

De acordo com a necessidade ou quando solicitadas pelo médico, outras técnicas de coloração podem ser utilizadas, produzindo diferentes padrões de bandas. Como exemplo, citamos a Banda C e a Banda NOR, aplicadas para evidenciar regiões de heterocromatina e Região organizadora de nucléolo dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22.

O Cariótipo é indicado em casos de aneuploidias, como trissomia do cromossomo 21 (Síndrome de Down), trissomia do 18 (Síndrome de Edwards), trissomia do 13 (Síndrome de Patau), monossomia do X (Síndrome de Turner), Síndrome de Klinefelter, deficiência intelectual, malformações congênitas, abortos recorrentes e infertilidade.

O Cariótipo é também indicado para diagnóstico e prognóstico de doenças genéticas adquiridas, e cânceres, visto que células cancerígenas são caracterizadas por acúmulo de anomalias cromossômicas.

Entretanto, algumas vezes, a condição genética é causada por mutações cromossômicas submicroscópicas, ou seja, não detectáveis por Cariótipo. Nessas situações, a metodologia adequada para a investigação do diagnóstico é o array-CGH (Hibridização genômica comparativa por microarranjo).

A metodologia de array-CGH possibilita a busca por deleções e duplicações em todo o genoma humano com uma resolução 1.000x maior que a de um Cariótipo. Essa metodologia se baseia na comparação entre a emissão de sinal decorrente da hibridização de DNA teste e DNA controle (marcados com diferentes fluoróforos), com sondas (sequências genômicas de referência) fixadas em uma plataforma (lâmina). A metodologia do array-CGH é considerada padrão ouro na investigação de perdas e ganhos de material genético.

Nem toda deleção ou duplicação leva necessariamente a uma condição genética. Estudos populacionais mostraram que existem variações no número de cópias de segmentos de DNA que são relativamente frequentes na população em geral, constituindo polimorfismos. Um desses estudos, por exemplo, mostrou que, em média, cada indivíduo é portador de aproximadamente 104 variações genéticas comuns presentes em pelo menos 3% da população.

Cerca de 70% dessas variantes incluem genes relacionados aos sentidos (olfato, audição, visão e paladar) e à suscetibilidade a doenças complexas, como câncer, diabetes, esquizofrenia e Alzheimer. Portanto, para a análise e a interpretação do exame de array-CGH, as alterações encontradas são pesquisadas em literatura científica em bases de dados especializados, assim como avaliadas quanto ao tipo (deleção ou duplicação), tamanho, genes afetados e mecanismo etiológico da hipótese diagnóstica. Isso visa à correta identificação de alterações patogênicas ou possivelmente patogênicas, de acordo com as diretrizes do ACMG (American College of Medical Genetics) e pertinentes com o fenótipo do paciente.

O array-CGH é uma ferramenta de diagnóstico genético importante, com maior densidade de sondas em regiões clinicamente relevantes. Possibilita a detecção de alterações que afetam total ou parcialmente um único gene.

Esse exame é recomendado para investigação de deficiência intelectual, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, síndromes genéticas não reconhecíveis clinicamente, Cariótipo normal ou inconclusivo, Cariótipo com cromossomo marcador ou translocações, análise de material de abortos, genitália ambígua, Transtorno do espectro autista (TEA), malformações congênitas e epilepsia.

O Cariótipo e o array-CGH são metodologias com vantagens e objetivos específicos. A escolha dependerá da hipótese clínica. Porém, muitas vezes, essas metodologias se complementam para a conclusão de um diagnóstico. Portanto, são ferramentas importantes para a investigação de condições genéticas.

Uma terceira técnica também muito utilizada para investigação de síndromes de microdeleção e microduplicação, não detectáveis por meio de Cariótipo, é o FISH – Hibridização fluorescente *In Situ*. Porém, diferente do array-CGH, que possibilita a busca de microalterações por todo o genoma, o FISH busca por uma região predeterminada. Portanto, é necessário ter uma hipótese diagnóstica bem definida e conhecer a posição genômica alvo do estudo.

Na Genética Constitucional, o FISH é especialmente útil na investigação de pequenas translocações em progenitores de crianças com síndromes de microdeleção ou microduplicação e na investigação do ponto de quebra de translocações balanceadas. Nas doenças onco-hematológicas, a técnica de FISH auxilia na identificação e no monitoramento de anormalidades cromossômicas relacionadas à tumorigênese. Também tem grande utilidade no monitoramento do transplante de medula óssea em doador-receptor de sexos diferentes.

Nessa técnica, utilizam-se sondas específicas para regiões cromossômicas-alvo, marcadas com fluorocromos. O resultado pode ser observado em microscópio especial para fluorescência com filtros de luz específicos para excitar cada comprimento de onda.

A principal limitação do FISH é que apenas uma ou poucas alterações (combinações de sondas) podem ser avaliadas simultaneamente. Nesse aspecto, quando existe a necessidade de se estudar várias regiões genômicas-alvo simultaneamente, a técnica de escolha pode ser a Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA, do inglês, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Há painéis de MLPA que permitem, por exemplo, a investigação diagnóstica de pacientes com deficiência intelectual, fenótipo de alterações subteloméricas, fenótipo de cânceres hereditários, características clínicas de síndromes de microdeleções conhecidas, tais como: as síndromes de Wolf-Hirschhorn, Sotos, Williams-Beuren,

Langer-Giedion, WAGR, Rubinstein-Taybi, Miller-Dieker, Smith-Magenis, Alagille, DiGeorge, Phelan-McDermid e os cânceres de mama e ovário hereditários, entre outras.

A técnica de Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação possibilita a quantificação relativa do número de cópias de sequências genômicas-alvo, sendo capaz de detectar deleções e duplicações em um ou mais genes/regiões associadas ao fenótipo.

O **laboratório DB Molecular** disponibiliza todas as técnicas supracitadas. Entre em contato sempre que tiver dúvida de qual a melhor metodologia citogenômica para a investigação de uma hipótese diagnóstica. Contamos com profissionais especializados que poderão auxiliá-lo.

O quadro a seguir informa a resolução média e resume as principais aplicações, vantagens e limitações de cada metodologia.

Características	Cariótipo	Array-CGH	FISH	MLPA
Objetivo do método	Detectar aneuploidias, deleções e duplicações parciais microscópicas. Detectar rearranjos cromossômicos equilibrados ou desequilibrados.	Detectar microdeleções e microduplicações de qualquer fragmento do genoma humano.	Detectar alterações cromossômicas mediante a uma hipótese diagnóstica bem definida.	Buscar por alterações cromossômicas em regiões relacionadas a condições genéticas conhecidas.
Resolução	±5 Mb	±50 Kb	Estudo focado	Estudo focado
Vantagens	Detecta rearranjos cromossômicos equilibrados.	Detecta microalterações em todo o genoma humano. Alta resolução. Possível detectar alterações que afetem total ou parcialmente um único gene.	Permite detectar pequenas translocações não observadas no cariótipo. Permite definir pontos de quebra de translocações equilibradas.	Os painéis de MLPA permitem investigar deleções e duplicações em um conjunto de genes ou regiões genômicas associadas a condições genéticas específicas. Painéis de MS-MLPA permitem investigar não só deleções e duplicações, mas também padrão de metilação. Permite buscar por deleções e duplicações em um único gene associado a uma condição genética.
Limitações	Baixa resolução	Não detecta rearranjos cromossômicos equilibrados. Não detecta mosaicismos abaixo de 30%.	Necessário conhecer a região do genoma que se pretende estudar, consequentemente, necessário hipótese diagnóstica bem definida. Avalia poucas regiões simultaneamente.	Necessário conhecer a região do genoma que se pretende estudar. Não detecta rearranjos cromossômicos equilibrados.
Quando solicitar*	Na suspeita de grandes alterações cromossômicas. Na suspeita da existência de rearranjos cromossômicos equilibrados. Investigação oncológica.	Na investigação de síndromes genéticas não reconhecíveis clinicamente, ou seja, no estudo de casos com suspeita de microalterações, porém, sem uma hipótese diagnóstica bem definida. Cariótipo com resultado inconclusivo.	Estudo dos progenitores de crianças com síndromes de microalterações. Estudo de pontos de quebra. Investigação oncológica.	Na investigação de condições genéticas associadas a poucos genes ou regiões genômicas. Por exemplo: Williams-Bueren, Phelan-McDermid, Smith-Magenis, entre outras. Investigação oncológica.

Tabela 1: Resumo das principais características de cada metodologia para estudos de mutações genômicas e cromossômicas

*Informação detalhada na ficha de cada exame.

02. CARIÓTIPO CONSTITUCIONAL COM BANDA G



Preparo para exame: Não tem preparo ou jejum aconselhável. Entretanto, recomenda-se ao paciente que não esteja fazendo uso de anti-inflamatórios ou antibióticos.



Coleta: O sangue total deve ser colhido em tubo de heparina sódica (tampa verde ou azul), homogeneizado e encaminhado ao DB Molecular no mesmo dia. O volume de amostra coletado deverá ser de 4 a 10 mL, para adultos, e de 2 a 4 mL, para crianças até 5 anos.



Estabilidade da amostra: 48 horas à temperatura entre 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: A amostra deve ser enviada sob refrigeração 2° a 8°C, evitando o contato direto com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Devido à baixa estabilidade da amostra, ela deverá ser enviada no mesmo dia da coleta. Em casos de exames anteriores, enviar cópia dos laudos obtidos. Casos de recoleta poderão ser solicitados quando houver ausência de informações médicas, assim como não apresentar as condições mínimas de padrão de qualidade para liberação de resultados. Enviar, junto com a amostra, o pedido médico e o formulário preenchido (disponível no *site* do DB).



A quem é indicado: Para casos de alterações clínicas relacionadas ao crescimento, síndromes congênitas, genitália ambígua, amenorreia, infertilidade, histórico de abortos recorrentes, doação de óvulos, atraso no desenvolvimento psicomotor, atraso na fala ou déficit intelectual e histórico de alterações cromossômicas balanceadas.



Método: Por meio da cultura de linfócitos, obtêm-se células em metáfase, possibilitando a análise cromossômica com bandamento G (CARBG, CARBG1, CARBG5). Análise de anomalias cromossômicas a nível numérico e/ou estrutural com resolução de 500-550 bandas.



Vantagens: Exame de baixo custo, não invasivo, que permite diagnosticar de maneira precoce o sexo (genitália ambígua), confirmar a suspeita de síndromes não identificadas anteriormente em exames de pré-natal (Down, Edwards, Patau, Turner, Klinefelter, etc.) e investigar translocações equilibradas.



Limitações da metodologia: Alterações cromossômicas observadas apenas em resolução de 5 Mb, casos de mosaicismo de baixa frequência e alterações a níveis moleculares.



Interferentes: Uso de anti-inflamatórios e/ou antibióticos, amostras coaguladas, hemolisadas e não refrigeradas.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no *site* DB Molecular.

03. CARIÓTIPO DE PRODUTO DE CONCEPÇÃO (ABORTO) COM BANDA G



Preparo para exame: Deve ser realizado em clínicas especializadas em Medicina Fetal ou em ambiente hospitalar em qualquer idade gestacional.



Coleta: Nos casos de perdas de 1º e 2º trimestres, colher preferencialmente fragmentos de vilosidades coriônicas. Podem também ser enviadas amostras como: saco gestacional completo, pequeno fragmento de pele fetal ou cordão umbilical, membranas amnióticas e/ou placenta. A ausência de embrião (ovo cego) não inviabiliza o exame.



Estabilidade da amostra: Até 24 horas refrigerada à temperatura de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: O material deverá ser transportado em frasco estéril com soro fisiológico (NaCl 0,9%), sob refrigeração.



Orientações de envio da amostra: O material deve ser acondicionado em frasco estéril, com solução fisiológica estéril. Não colocar o material em formol. Não aquecer. Não congelar. Respeitar o prazo máximo de 24 horas após a coleta para o envio. De acordo com a resolução nº 1.779/2005, do Conselho Federal de Medicina, o laboratório de Citogenética do DB Molecular não recebe material de aborto quando a gestação tiver duração igual ou superior a 20 semanas ou o feto tiver estatura igual ou superior a 25 cm ou, ainda, feto com peso igual ou superior a 500 g. O laboratório também não recebe material placentário inteiro. Devido à baixa estabilidade da amostra, ela deverá ser enviada no mesmo dia da coleta. Enviar, junto com a amostra, o pedido médico e o formulário preenchido (disponível no [site](#) do DB).



A quem é indicado: Em casos de abortos de repetição, casal que realizou fertilização *in vitro*, gestação anembrionada, mola hidatiforme antecedentes familiares de cromossomopatias.



Método: Os cromossomos são obtidos da cultura de fibroblastos ou trofoblastos e posterior bandamento G (CARO). A análise permite visualizar alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais com resolução de 300-550 bandas.



Vantagens: Diagnosticar alterações cromossômicas e identificar o possível motivo do aborto, sugerindo ao casal a consulta de aconselhamento genético (futura gestação).



Limitações da metodologia: O estudo do Cariótipo não exclui casos de mosaicismo de baixa frequência, assim como alterações cromossômicas decorrentes de exposição materna a fatores teratogênicos, mutações gênicas e microalterações cromossômicas.



Interferentes: Temperatura de transporte inadequada; amostra acondicionada em álcool ou formol; aborto retido; frasco de coleta inadequado e contaminação com células maternas.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no [site](#) DB Molecular.

04. CARIÓTIPO DE CORDOCENTESE COM BANDA G



Preparo para exame: O exame é realizado por punção de cordão umbilical (cordocentese) a partir da 20ª semana de gestação.



Coleta: Devem ser coletados 3 mL de sangue fetal em heparina sódica (tampa verde), ou seringa heparinizada.



Estabilidade da amostra: 48 horas à temperatura de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: O material deve ser transportado sob refrigeração (entre 2°C e 8°C) e enviado em gelo reciclável (o material não deve ter contato com o gelo).



Orientações de envio da amostra: Devido à baixa estabilidade da amostra, ela deverá ser enviada no mesmo dia da coleta. Enviar, junto com a amostra, o pedido médico e o formulário preenchido (disponível no *site* do DB). Identificar a amostra com nome da mãe, idade gestacional e sexo do bebê.



A quem é indicado: Gestantes com diagnóstico de malformação fetal (observada no exame de ultrassom) durante o segundo ou o terceiro trimestre.



Método: Por meio da cultura de linfócitos, obtêm-se células em metáfase, possibilitando a análise cromossômica com bandamento G (CARBSF). Análise de anomalias cromossômicas numérica e/ou estrutural com resolução de 400-550 bandas.



Vantagens: Permite diagnosticar anomalias cromossômicas no feto.



Limitações da metodologia: O estudo do Cariótipo não exclui casos de mosaicismos de baixa frequência, assim como alterações cromossômicas decorrentes de exposição materna a fatores teratogênicos, mutações gênicas e microalterações cromossômicas.



Interferentes: Amostras coaguladas, hemolisadas e/ou transportadas em temperaturas inadequadas.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no *site* DB Molecular.

05. CARIÓTIPO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO COM BANDA G



Preparo para exame: O líquido amniótico deve ser coletado por médico, em clínicas especializadas em Medicina Fetal ou em ambiente hospitalar, com idade gestacional entre 15 e 20 semanas de gestação.



Coleta: A coleta de líquido amniótico deve ser realizada em seringa atóxica. Deve ser coletado 1 mL de líquido amniótico para cada semana gestacional e, a partir da 17ª semana de gestação, coletar 20 mL de líquido amniótico.



Estabilidade da amostra: 24 horas refrigerada à temperatura de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: O líquido amniótico deve ser transportado na própria seringa atóxica, com tampa estéril tipo Luer Cap® (tampa especial para seringas).



Orientações de envio da amostra: A amostra deve ser enviada refrigerada (não congelada) em até 24 horas após a coleta. Não usar nenhum tipo de anticoagulante. O volume ideal de líquido amniótico é de 20 mL. Enviar pedido médico e laudo de ultrassonografia.



A quem é indicado: Esse exame está indicado quando são observadas anomalias na ultrassonografia fetal ou translucência nucal, pais com rearranjo cromossômico, histórico familiar ou filho anterior com cromossomopatia e/ou malformação congênita, idade materna avançada (35 anos ou mais), abortos de repetição, mosaicismo ou aneuploidias dos cromossomos sexuais.



Método: Os cromossomos são obtidos de cultura prolongada de fibroblastos e posterior bandamento G (CARBL). A análise permite visualizar alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais com resolução de 300-550 bandas.



Vantagens: Diagnóstico precoce de síndromes congênitas.



Limitações da metodologia: O estudo do Cariótipo não exclui casos de mosaicismo de baixa frequência, assim como alterações cromossômicas decorrentes de exposição materna a fatores teratogênicos, microalterações cromossômicas e mutações gênicas.



Interferentes: Temperatura de transporte inadequada; contaminação com células sanguíneas; quantidade de células em degeneração (altera o tempo de cultura); envio da amostra em seringa inadequada.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no [site DB Molecular](#).

06. CARIÓTIPO DE VILOSIDADE CORIÔNICA COM BANDA G



Preparo para exame: A vilosidade coriônica deve ser coletada por médico, em clínicas especializadas em Medicina Fetal ou em ambiente hospitalar com idade gestacional entre 11 e 14 semanas de gestação.



Coleta: Devem ser coletadas aproximadamente 25 a 30 mg de vilosidade coriônica em frasco estéril contendo soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%).



Estabilidade da amostra: 24 horas à temperatura de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: A amostra deverá ser transportada a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, evitando o contato com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Devido à baixa estabilidade da amostra, ela deverá ser enviada no mesmo dia da coleta. Enviar pedido médico, formulário preenchido (disponível no *site* do DB) e laudo da ultrassonografia.



A quem é indicado: É indicado a mulheres com idade avançada, quando há alterações no exame de ultrassonografia ou translocação cromossômica no casal, em casos de doenças genéticas em gestações anteriores e em história de perdas fetais.



Método: Os cromossomos são obtidos de cultura prolongada e/ou semidireta de trofoblastos e posterior bandamento G (VILCO). A análise permite visualizar alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais com resolução de 300-550 bandas.



Vantagens: Diagnóstico precoce de alterações cromossômicas.



Limitações da metodologia: O estudo do Cariótipo não exclui casos de mosaicismo de baixa frequência, assim como alterações cromossômicas decorrentes de exposição materna a fatores teratogênicos, mutações gênicas e microalterações cromossômicas.



Interferentes: Prazo de estabilidade excedido; temperatura de transporte inadequada; quantidade de amostra inadequada e/ou amostra coletada em meio de cultura que não seja o fornecido pelo laboratório.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no *site* DB Molecular.

07. CARIÓTIPO HEMATOLÓGICO COM BANDA G



Preparo para exame: Não é necessário jejum prévio. A coleta deverá ser realizada por médico hematologista.



Coleta: Coletar de 3 a 5 mL de aspirado medular em tubo com anticoagulante heparina (tubo de tampa verde) ou em seringa heparinizada (encaminhar sem agulha e vedada com tampa). A realização do Cariótipo hematológico em sangue periférico é indicada somente quando não for possível coleta de medula óssea e se houver mais de 20% blastos circulantes (enviar laudo de hemograma).



Estabilidade da amostra: 24 horas à temperatura de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: A amostra deverá ser transportada a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, evitando o contato com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Enviar, juntamente com a amostra, o pedido médico e o formulário preenchido (disponível no *site* do DB). Em casos de exames anteriores, enviar cópia dos laudos obtidos. Casos de recoleta poderão ser solicitados quando houver ausência de informações médicas, assim como não apresentar as condições mínimas de padrão de qualidade para liberação de resultados. Somente serão recebidas amostras de sangue periférico que apresentarem pelo menos 20% de blastos.



A quem é indicado: Casos suspeitos de leucemias, síndromes mielodisplásicas, linfomas, mielomas, policitemia vera, trombocitemia essencial, anemia aplástica, plaquetopenia, leucopenia, entre outras desordens hematológicas.



Método: Por meio da cultura de células da medula óssea ou do sangue periférico, obtêm-se os cromossomos. As células provenientes da medula óssea e/ou do sangue periférico serão incubadas em meio de cultura adequado, à uma temperatura de 37°C durante 24, 48 ou 72 horas (a depender da suspeita clínica e do tipo de material).

Posteriormente, adiciona-se a colchicina para a visualização das células em metáfase. A técnica de bandamento G é realizada para melhor visualização das bandas. A análise das alterações cromossômicas numérica e/ou estrutural é realizada com resolução de 400 bandas.



Vantagens: O exame é capaz de auxiliar médicos e pesquisadores na classificação, no diagnóstico, no prognóstico, na orientação e na monitoração terapêutica, no monitoramento do tratamento e do transplante de medula óssea, além de permitir identificar quais são os oncogenes envolvidos.



Limitações da metodologia: O estudo do Cariótipo não exclui casos de mosaicismo de baixa frequência, assim como alterações cromossômicas decorrentes de exposição materna a fatores teratogênicos, mutações gênicas e microalterações cromossômicas.



Interferentes: Amostra congelada, hemolisada e/ou coagulada; quantidade insuficiente de amostra; uso de anticoagulante inadequado.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no *site* DB Molecular.

08. CARIÓTIPO DE FIBROBLASTOS COM BANDA G (PELE)



Preparo para exame: Não tem preparo ou jejum aconselhável. Entretanto, recomenda-se ao paciente que não esteja fazendo uso de anti-inflamatórios ou antibióticos.



Coleta: Recomenda-se a utilização de frasco estéril, contendo soro fisiológico estéril para acondicionar os dois fragmentos de pele (30 a 50 mg ou 2 a 4 mm³ cada).



Estabilidade da amostra: 24 horas em soro fisiológico.



Transporte da amostra: A amostra deve ser enviada sob refrigeração (2° C a 8 °C), evitando o contato direto com o gelo.



Orientações de envio da amostra: A amostra deverá estar totalmente imersa na solução fisiológica. Enviar, junto com a amostra, o pedido médico e o formulário preenchido (disponível no *site* do DB). Não enviar a amostra acondicionada em formol. Não enviar a amostra acondicionada em álcool. Devido à baixa estabilidade da amostra, ela deverá ser enviada no mesmo dia da coleta.



A quem é indicado: Casos de mosaicismos cromossômicos de baixa frequência, mosaico pigmentar, suspeita de mosaicismos teciduais, óbito neonatal, fetos abortados, doenças genéticas confinada a tecidos.



Método: Cromossomos obtidos por meio da cultura de fibroblastos e posterior coloração por técnica de bandamento G. Análise de anomalias cromossômicas numérica e/ou estrutural com resolução de 400-550 bandas.



Vantagens: Diagnóstico de alterações cromossômicas; identificar o possível motivo do aborto; identificar a presença ou não de mosaicismos teciduais.



Limitações da metodologia: O estudo do Cariótipo não exclui casos de mosaicismos de baixa frequência, assim como alterações cromossômicas decorrentes de exposição materna a fatores teratogênicos, mutações gênicas e microalterações cromossômicas.



Interferentes: Temperatura de transporte inadequada, contaminação de material, fragmentos de tecido necrosado e/ou assepsia da pele com iodopovidona.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no *site* DB Molecular.

09. CARIÓTIPO COM PESQUISA DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS



Preparo para exame: Não tem preparo ou jejum aconselhável. Entretanto, recomenda-se ao paciente que não esteja fazendo uso de anti-inflamatórios ou antibióticos.



Coleta: Coletar 10 mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante heparina sódica.



Estabilidade da amostra: 48 horas após a coleta, se mantido à temperatura de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: A amostra deverá ser transportada a uma temperatura de 2 °C a 8 °C, evitando o contato com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Devido à baixa estabilidade da amostra, ela deverá ser enviada no mesmo dia da coleta. Juntamente com a amostra, enviar pedido médico com indicação clínica e questionário preenchido (disponível no *site* do DB).



A quem é indicado: A pacientes com suspeita de anemia de Fanconi.



Método: O Cariótipo é realizado após a cultura de linfócitos do sangue periférico, estimulados com agente mitógeno para indução da divisão celular e obtenção de metáfases. Para a avaliação das quebras cromossômicas, será realizada a indução por meio de agente clastogênico diepoxibutano (DEB) e/ou com a mitomicina C (MMC). Utiliza-se a técnica de bandamento convencional e GTW.



Vantagens: Baixo custo; único teste com valor preditivo elevado (99,9%) para detecção de anemia de Fanconi.



Limitações da metodologia: O estudo do Cariótipo não exclui casos de mosaicismo de baixa frequência, assim como alterações cromossômicas decorrentes de exposição materna a fatores teratogênicos, mutações gênicas e microalterações cromossômicas.



Interferentes: Anticoagulante inadequado; amostras congeladas; transporte inadequado; amostras insuficientes, hemolisadas e/ou coaguladas.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no *site* DB Molecular.

10. aCGH PRÉ-NATAL – VILO CORIAL



Preparo para exame: Consultar no local em que será realizada a coleta qual o preparo necessário.



Coleta: A coleta deve ser realizada por especialistas em clínicas especializadas, com todo o suporte hospitalar necessário, a partir da 11ª semana de gestação.



Amostra: 25 a 50 mg de vilosidade coriônica em frasco estéril contendo soro fisiológico estéril (NaCl 0.9%).



Estabilidade da amostra: 24 horas após a coleta se refrigerada de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: Enviar a amostra sob refrigeração com gelo reciclável, tomando o cuidado de não deixar a amostra em contato direto com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Enviar as amostras refrigeradas, entre 2 °C e 8 °C, no prazo de 24 horas.



A quem é indicado: Pessoas com alterações detectadas em exames de imagem (ultrassom), suspeitas de alterações cromossômicas com Cariótipo normal e/ou resultado de Cariótipo inconclusivo e progenitores portadores de translocações balanceadas.



Método: Para a realização do experimento de microarray, moléculas de DNA genômico do indivíduo a ser avaliado (DNA teste) e de uma amostra que servirá como referência (DNA controle) são marcadas com fluorocromos que emitem luminosidade de diferentes comprimentos de onda. O DNA teste e controle são comparados após a hibridização com sondas dispostas em uma lâmina. Caso as hibridizações de sequências

de DNA com as sondas sejam equivalentes entre as amostras comparadas (teste *versus* controle), a razão entre os sinais emitidos dos fluorocromos será idêntica. Por outro lado, microdeleções e microduplicações de determinadas sequências de DNA na amostra teste podem ser observadas em decorrência das diferenças na razão quantitativa entre as emissões de sinais dos fluorocromos.



Vantagens: Análise simultânea de milhares de regiões do genoma em busca de pequenas (não detectadas por Cariótipo) Variações no número de cópias (CNVs).



Limitações da metodologia: Não detecta mosaicismos abaixo de 30%; não detecta translocações equilibradas; não detecta deleções e/ou duplicações menores, que a resolução da plataforma utilizada.



Interferentes: Amostra transportada fora da temperatura adequada (2 °C a 8 °C) e/ou fora do prazo estipulado de 24 h após a coleta; quantidade de amostra insuficiente.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no [site DB Molecular](#).

11. aCGH PRÉ-NATAL – LÍQUIDO AMNIÓTICO



Preparo para exame: Consultar no local em que será realizada a coleta qual o preparo necessário.



Coleta: A coleta deve ser realizada por especialistas em clínicas especializadas, com todo o suporte hospitalar necessário, a partir da 14ª semana de gestação. Até a 16ª semana completa de gestação, coletar 1 mL de líquido amniótico para cada semana. A partir da 17ª semana, coletar 20 mL de líquido amniótico. Coletar em seringa atóxica e encaminhá-la sem a agulha, fechada com a tampa específica para seringas. Não usar anticoagulante.



Amostra: Seringa atóxica (de preferência da marca BD) específica, sem agulha, vedada com a tampa para seringas, contendo 1 mL de líquido amniótico para cada semana gestacional, sendo o volume máximo de 20 mL.



Estabilidade da amostra: 48 horas após a coleta se refrigerada de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: Enviar a amostra sob refrigeração com gelo reciclável, tomando o cuidado de não deixar a amostra em contato direto com o gelo.



Orientações de envio de amostra: Enviar as amostras refrigeradas, entre 2 °C e 8 °C, no prazo de 48 horas.



A quem é indicado: Pessoas com alterações detectadas em exames de imagem (ultrassom), suspeitas de alterações cromossômicas com Cariótipo normal ou resultado de Cariótipo inconclusivo, progenitores portadores de translocações balanceadas e para confirmação de resultado positivo para síndromes de microdeleção obtido por meio do exame pré-natal não invasivo (NIPT).



Método: Para a realização do experimento de microarray, moléculas de DNA genômico do indivíduo a ser avaliado (DNA teste) e de uma amostra que servirá como referência (DNA controle) são marcados com fluorocromos que emitem luminosidade de diferentes comprimentos de onda. O DNA teste e controle são comparados após a hibridização com sondas dispostas em uma lâmina. Caso as hibridações de sequências de DNA com as sondas sejam equivalentes entre as amostras comparadas (teste versus controle), a razão entre os sinais emitidos dos fluorocromos será idêntica. Por outro lado, microdeleções e microduplicações de determinadas sequências de DNA na amostra teste podem ser observadas em decorrência das diferenças na razão quantitativa entre as emissões de sinais dos fluorocromos.



Vantagens: Análise simultânea de milhares de regiões do genoma em busca de pequenas (não detectadas por Cariótipo) Variações no número de cópias (CNVs).



Limitações da metodologia: Não detecta mosaicismos abaixo de 30%; não detecta translocações equilibradas; não detecta deleções e/ou duplicações menores que a resolução da plataforma utilizada.



Interferentes: Líquido amniótico contaminado com células sanguíneas; recipiente de transporte inadequado (tampa de borracha); amostra transportada fora da temperatura adequada (2 °C a 8 °C) e/ou fora do prazo estipulado de 48 horas após a coleta.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no [site DB Molecular](#).

12. aCGH PRÉ-NATAL – PRODUTO DE CONCEPÇÃO (ABORTO)



Preparo para exame: Consultar no local em que será realizada a coleta qual o preparo necessário.



Coleta: A coleta deve ser realizada por especialistas em clínicas especializadas, com todo o suporte hospitalar necessário. Consultar a assessoria científica do laboratório DB em casos de abortos espontâneos ocorridos em ambientes adversos.



Amostra: Até a 11ª semana de gestação, colher vilosidade coriônica ou enviar o saco gestacional completo. Da 12ª à 16ª semana de gestação, colher vilosidade coriônica, pequeno fragmento de pele fetal ou cordão umbilical. A partir da 17ª semana de gestação, colher pequeno fragmento de cordão umbilical e/ou pele fetal, de preferência da região posterior do tronco (costas).



Estabilidade da amostra: 24 horas após a coleta se refrigerada de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: Enviar a amostra sob refrigeração com gelo reciclável, tomando o cuidado de não deixar a amostra em contato direto com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Enviar as amostras refrigeradas, entre 2 °C e 8 °C, no prazo de 24 horas.



A quem é indicado: Casos com Cariótipo normal ou inconclusivo ou casos em que não foi possível realizar o Cariótipo.



Método: Para a realização do experimento de microarray, moléculas de DNA genômico do indivíduo a ser avaliado (DNA teste) e de uma amostra que servirá como referência (DNA controle) são marcadas com fluorocromos que emitem luminosidade de diferentes comprimentos de onda. O DNA teste e controle são comparados após a

hibridação com sondas dispostas em uma lâmina. Caso as hibridações de sequências de DNA com as sondas sejam equivalentes entre as amostras comparadas (teste *versus* controle), a razão entre os sinais emitidos dos fluorocromos será idêntica. Por outro lado, microdeleções e microduplicações de determinadas sequências de DNA na amostra teste podem ser observadas em decorrência das diferenças na razão quantitativa entre as emissões de sinais dos fluorocromos.



Vantagens: Análise simultânea de milhares de regiões do genoma em busca de pequenas (não detectadas por Cariótipo) Variações no número de cópias (CNVs).



Limitações da metodologia: Não detecta mosaicismos abaixo de 30%; não detecta translocações equilibradas; não detecta deleções e/ou duplicações menores que a resolução da plataforma utilizada.



Interferentes: Recipiente de transporte inadequado; amostra transportada fora da temperatura adequada (2 °C a 8 °C) e/ou fora do prazo estipulado de 24 horas após a coleta; material insuficiente. Amostras armazenadas em álcool ou qualquer outro produto químico não serão aceitas.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no [site DB Molecular](#).

13. aCGH PÓS-NATAL



Preparo para exame: Não é necessário jejum ou qualquer outro preparo do paciente para realização da coleta.



Coleta: Sangue periférico em tubo com EDTA.



Amostra: Dois tubos com EDTA com 4 mL de sangue cada. Para recém-nascidos, um tubo com no mínimo 2 mL.



Estabilidade da amostra: Sete dias se refrigerada de 2 °C a 8 °C. Três dias em temperatura ambiente.



Transporte da amostra: Enviar a amostra em temperatura ambiente ou sob refrigeração com gelo reciclável, tomando o cuidado de não deixar a amostra em contato direto com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Enviar as amostras refrigeradas, entre 2 °C e 8 °C, no prazo de uma semana ou em temperatura ambiente no prazo de 72 horas. Não serão aceitas amostras coletadas em tubos com anticoagulantes do tipo heparina, citrato ou fluoreto. Não serão aceitas amostras de sangue congeladas ou com sinal de hemólise.



A quem é indicado: Pessoas com deficiência intelectual, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, síndromes genéticas não reconhecíveis clinicamente, Cariótipo normal ou inconclusivo, Cariótipo com cromossomo marcador ou translocações, genitália ambígua, Transtorno do espectro autista (TEA), malformações congênitas, epilepsia, suspeita de síndromes de genes contíguos e análise de material de abortos.



Método: Para a realização do experimento de microarray, moléculas de DNA genômico do indivíduo a ser avaliado (DNA teste) e de uma amostra que servirá como referência (DNA controle) são marcadas com fluorocromos que emitem luminosidade de diferentes comprimentos de onda. O DNA teste e controle são comparados após a

hibridização com sondas dispostas em uma lâmina. Caso as hibridações de sequências de DNA com as sondas sejam equivalentes entre as amostras comparadas (teste versus controle), a razão entre os sinais emitidos dos fluorocromos será idêntica. Por outro lado, microdeleções e microduplicações de determinadas sequências de DNA na amostra teste podem ser observadas em decorrência das diferenças na razão quantitativa entre as emissões de sinais dos fluorocromos.



Vantagens: Análise simultânea de milhares de regiões do genoma em busca de pequenas (não detectadas por Cariótipo) Variações no número de cópias (CNVs)



Limitações da metodologia: Não detecta mosaicismos abaixo de 30%; não detecta translocações equilibradas; não detecta deleções e/ou duplicações menores que a resolução da plataforma utilizada.



Interferentes: Amostra hemolisada, coagulada, congelada ou coletada em tubo com anticoagulante incorreto.



Prazo do exame: Consultar o Guia de exames no [site DB Molecular](#).

14. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) - CONSTITUCIONAL



Preparo para exame: Não é necessário jejum ou qualquer outro preparo do paciente para realização da coleta.



Coleta: Sangue periférico em tubo com heparina sódica.



Amostra: Dois tubos com heparina sódica com 4 mL de sangue cada.



Estabilidade da amostra: 24 horas se refrigerada de 2 °C a 8 °C.



Transporte da amostra: Enviar a amostra sob refrigeração com gelo reciclável, tomando o cuidado de não deixar a amostra em contato direto com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Enviar as amostras refrigeradas, entre 2 °C e 8 °C, no prazo de 24 horas. Não serão aceitas amostras coletadas em tubos com anticoagulantes do tipo EDTA, citrato ou fluoreto. Não serão aceitas amostras de sangue congeladas ou com sinal de hemólise.



A quem é indicado: Indivíduos portadores de síndromes genéticas específicas, progenitores de crianças portadoras de microdeleções e/ou microduplicações cromossômica para investigação de translocações.



Método: Permite a identificação e localização de sequências de DNA alvo, pela ligação complementar de sondas (sequências de DNA conhecidas, obtidas comercialmente) marcadas com fluorocromos. O resultado pode ser observado em microscópio especial para fluorescência com filtros de luz específicos para excitar cada comprimento de onda marcado.



Vantagens: Permite a investigação de pequenas translocações em progenitores de crianças com síndromes de microdeleção ou microduplicação e a investigação do ponto de quebra de translocações balanceadas.



Limitações da metodologia: Estudo de regiões genômicas específicas, complementares a sondas utilizadas.



Interferentes: Amostra hemolisada, coagulada, congelada ou coletada em tubo com anticoagulante incorreto.



Prazo do exame: Dependente da região-alvo. Consultar o laboratório DB Molecular.

15. HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) - ONCOLÓGICO



Preparo para exame: Consultar no local em que será realizada a coleta qual o preparo necessário.



Coleta: As coletas de medula óssea e biópsia de tecido tumoral devem ser realizadas por especialistas em clínicas especializadas, com todo o suporte hospitalar necessário.



Amostra:

- a. Biópsia tumoral em bloco de parafina;
- b. Aspirado de medula óssea;
- c. Sangue em heparina sódica.



Estabilidade da amostra:

- a. Medula: A amostra é estável por 24 horas após coleta, devendo ser mantida refrigerada (2 °C a 8 °C), evitando contato direto da amostra com o gelo;
- b. Sangue: A amostra é estável por 24 horas após a coleta, devendo ser mantida em temperatura ambiente ou refrigerada (2 °C a 8 °C), evitando contato direto da amostra com o gelo.



Transporte da amostra: Os blocos de parafina devem ser enviados em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). Durante o envio, os blocos devem ser acondicionados em embalagens fechadas, que permitam proteger o material de deformações mecânicas e calor.



Medula óssea: 3 a 5 mL para adultos. De crianças, coletar no mínimo 2 mL. Coletar em seringa heparinizada com 0,01 mL de heparina sódica e encaminhar sem a agulha e fechada com a tampa específica para seringas.



Sangue periférico: Dois tubos com heparina com 4 mL de sangue cada. Para crianças, um tubo com no mínimo 2 mL.



Orientações de envio da amostra: As amostras em bloco de parafina devem ser enviadas juntamente com cópia do laudo histopatológico. As embalagens para envio dos blocos devem protegê-los de possíveis danos e do calor. As amostras de medula óssea devem ser enviadas sob refrigeração com gelo reciclável, tomando o cuidado de não deixá-las em contato direto com o gelo. Enviar na própria seringa de coleta, sem agulha, devidamente fechada com tampa de seringa vedada para evitar vazamento e contaminação. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas. Não serão aceitas amostras coletadas em tubos com anticoagulantes do tipo EDTA, citrato ou fluoreto. Não serão aceitas amostras de sangue congeladas ou com sinal de hemólise.



Método: Permite a identificação e localização de sequências de DNA alvo, por meio da ligação complementar de sondas (sequências de DNA conhecidas, obtidas comercialmente) marcadas com fluorocromos. O resultado pode ser observado em microscópio especial para fluorescência com filtros de luz específicos para excitar cada comprimento de onda.



Vantagens: Permite a detecção de alterações cromossômicas em células tumorais, auxiliando na avaliação do prognóstico e orientando o tratamento.



Limitações da metodologia: Estudo de regiões genômicas específicas, complementares a sondas utilizadas.



Interferentes: Conservante inadequado; excesso de anticoagulante; amostra hemodiluída; amostra congelada; amostra coagulada; quantidade de amostra insuficiente; temperatura de transporte inadequada



Prazo do exame: Dependente da região-alvo. Consultar o laboratório DB Molecular.

16. AMPLIFICAÇÃO DE MÚLTIPLAS SONDAS DEPENDENTES DE LIGAÇÃO (MLPA, DO INGLÊS, *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*)



Preparo para exame: Não é necessário jejum ou qualquer outro preparo do paciente para realização da coleta.



Coleta: Sangue periférico em tubo com EDTA.



Amostra: Dois tubos com EDTA com 4 mL de sangue cada. Para recém-nascidos, um tubo com no mínimo 2 mL.



Estabilidade da amostra: Sete dias se refrigerada de 2 °C a 8 °C. Três dias em temperatura ambiente.



Transporte da amostra: Enviar a amostra em temperatura ambiente ou sob refrigeração com gelo reciclável, tomando o cuidado de não deixar a amostra em contato direto com o gelo.



Orientações de envio da amostra: Enviar as amostras refrigeradas, entre 2 °C e 8 °C, no prazo de uma semana ou em temperatura ambiente no prazo de 72 horas. Não serão aceitas amostras coletadas em tubos com anticoagulantes do tipo heparina, citrato ou fluoreto. Não serão aceitas amostras de sangue congeladas ou com sinal de hemólise.



Método: Baseada na hibridização do DNA genômico a uma mistura de sondas específicas para cada região estudada, com amplificação dos produtos de ligação pela técnica de PCR, utilizando um par de *primers* universal. A visualização dessas amplificações pode ser feita por eletroforese capilar e a análise por um programa específico.



Vantagens: Possibilita o estudo simultâneo de várias regiões ou genes associados a uma condição genética



Limitações da metodologia: Não detecta rearranjos cromossômicos, não detecta pequenas alterações localizadas no intervalo entre duas sondas, não avalia todo o genoma de uma única vez.



Interferentes: Conservante inadequado; excesso de anticoagulante; amostra hemodiluída; amostra congelada; amostra coagulada; quantidade de amostra insuficiente; temperatura de transporte inadequada.



Prazo do exame: Sob consulta

17. INSTRUÇÕES GERAIS DE ENVIO DE AMOSTRAS

O envio das amostras biológicas ao laboratório deve ser realizado obedecendo criteriosamente ao tempo de estabilidade da amostra após a coleta, bem como às condições adequadas para o armazenamento e o transporte delas.

No transporte de amostras biológicas, deve-se obedecer rigorosamente às normas de biossegurança, utilizando as embalagens com o padrão ONU/IATA.

Deve-se observar a temperatura adequada ao transportar cada tipo de amostra. Quando for necessária refrigeração, as amostras devem ser acondicionadas juntamente com gelo reciclável, evitando o contato direto das amostras com o gelo. Se necessário o envio da amostra congelada, utilizar gelo-seco.

Cada amostra deve ser encaminhada dentro de sacos plásticos fechados. As tampas dos tubos devem ser envolvidas por plástico aderente para vedar e evitar vazamento ou contaminação. Os sacos plásticos com as amostras devem ser colocados em caixas térmicas impermeáveis e higienizáveis, que garantam a estabilidade delas até a chegada ao laboratório.

As amostras devem ser identificadas adequadamente, com nome completo, data de nascimento e data da coleta. Enviar juntamente com as amostras o pedido/relatório médico, o formulário e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido assinado pelo paciente ou por seu responsável legal.

Será solicitada nova coleta caso a amostra chegue ao laboratório armazenada inadequadamente, fora da temperatura e/ou do prazo de estabilidade apropriados, sem identificação, com sinal de hemólise, com sinal de vazamento, coagulada e/ou em tubo de coleta com anticoagulante inadequado.



Consulte o representante comercial de sua área sobre o endereço para envio de amostras ou a possibilidade de retirada da amostra por meio da logística do laboratório DB Molecular.

ANOTAÇÕES

[illegible][illegible]



Saiba mais

 dbmolecular.com.br

 assessoria.molecular@dbdiagnosticos.com.br

 0800 643 0376