

# **GENÉTICA CLÍNICO-LABORATORIAL**

## **Aula 9**

Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais

2016/17  
1º Semestre

# Sumário

## 1. Métodos de diagnóstico laboratorial em genética

**Citogenética:** Análise cromossômica; Hibridação *in situ*; Análises de DNA array.

**Genética molecular:** Detecção de mutações; Sequenciação; *Southern Blot*; Quantificação genômica; *DNA microarrays*

**Diagnóstico indireto:** Identificação de genes relacionados com doenças; Diagnóstico de famílias

## 2. Evolução clínica da genética molecular

## 3. Métodos de Investigação laboratorial em genética

**Expressão genética:** Hibridação *in situ*; qPCR

## Thomas Hunt Morgan

(1866-1945)  
USA



*"Assim como as descobertas de Charles Darwin sobre a evolução de espécies animais definiram a biologia do século XIX como uma ciência descritiva, as descobertas de Morgan sobre os genes e a sua localização nos cromossomas ajudaram a transformar a biologia em uma ciência experimental."*

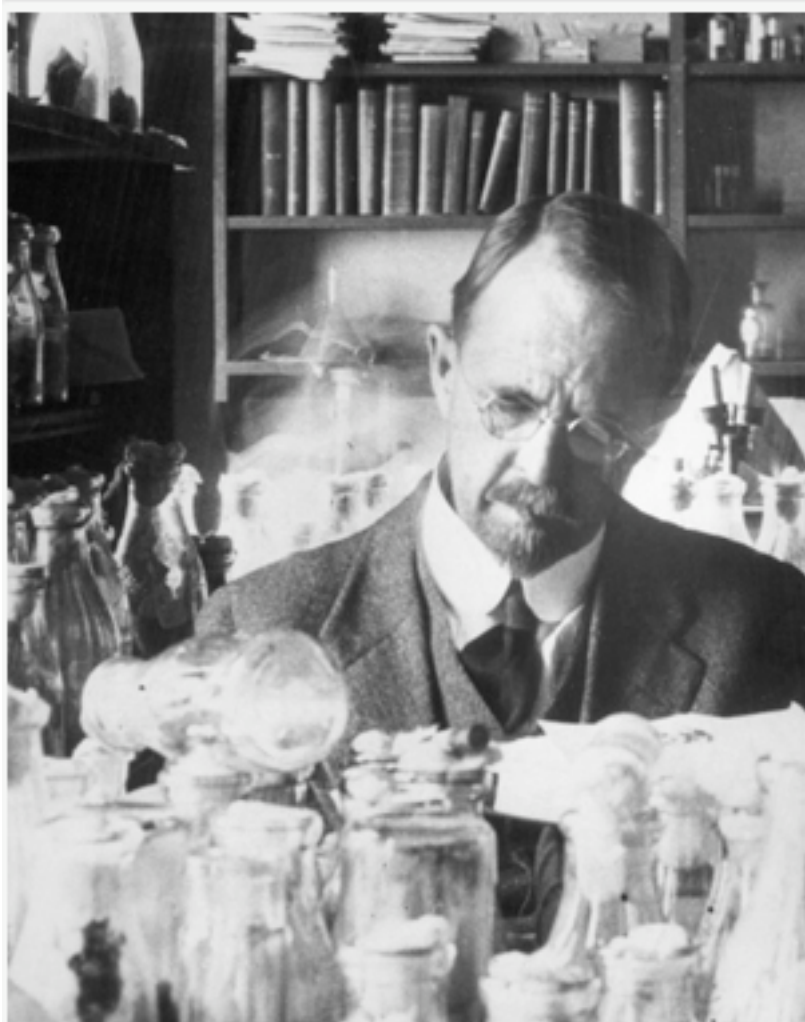
*Prémio Nobel, Eric Richard Kandal (aluno de Morgan)*

## Thomas Hunt Morgan

- ✓ Prémio Nobel da Medicina em 1933 por provar que os **cromossomas são portadores de genes.**
- ✓ Estudou a hereditariedade através do animal modelo *Drosophila* (mosca da fruta)
- ✓ Aplicou as teorias de Mendel aos animais
- ✓ Identificou o primeiro gene: *withe*
- ✓ Através da recombinação de cromossomas, conseguiu um mapa de localizações dos genes no cromossoma



# Thomas Hunt Morgan



Thomas Hunt Morgan in the fly room. This picture is from a paper published by Gerry Rubin and E.B. Lewis, both very influential *Drosophila* biologists in their own right.

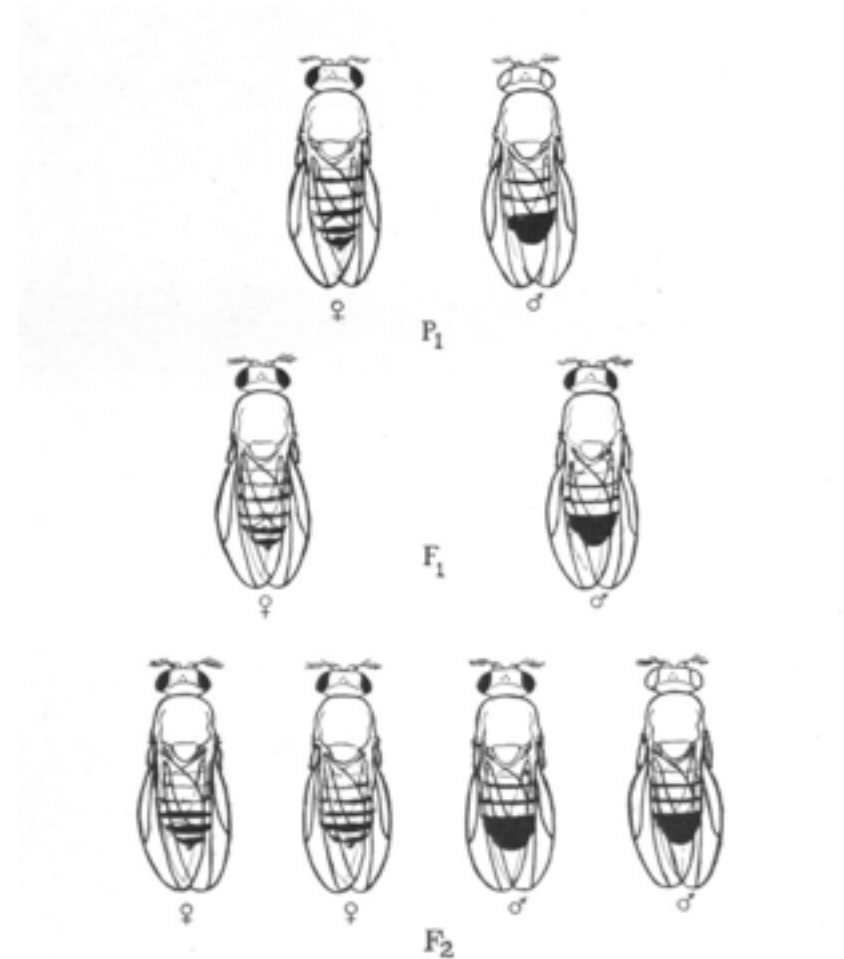
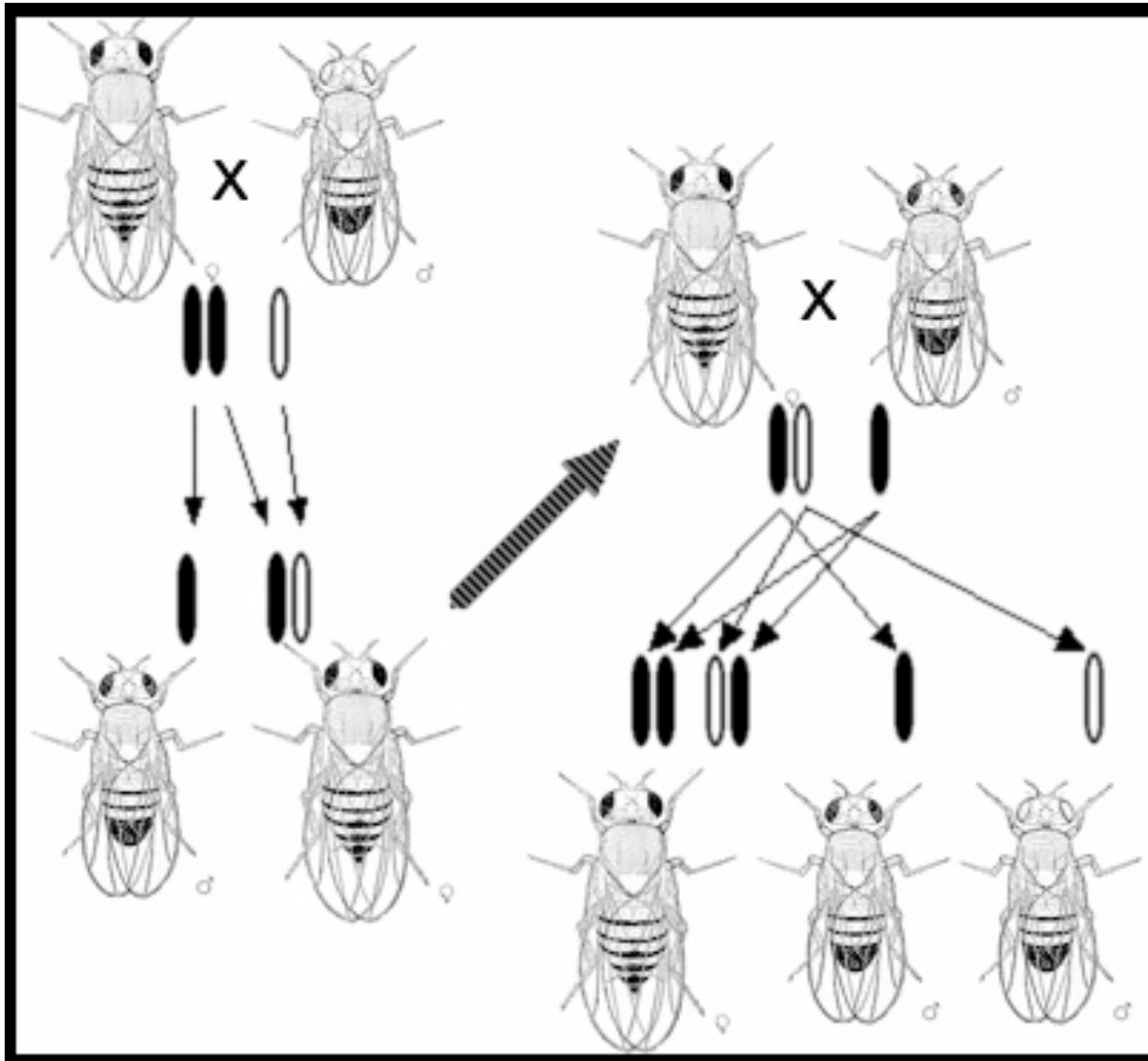


FIG. 35. Diagram showing a cross between a white eyed male and a red eyed female of the fruit fly. Sex linked inheritance.

Hereditariedade ligada ao sexo

# Thomas Hunt Morgan



gene: *withe*

Hereditariedade ligada ao sexo

# **Métodos de diagnóstico laboratorial em genética**

## **Citogenética**

# Citogenética

## Análise Cromossômica

- Colheita de células (qualquer tecido)
- Cultura em **meio que facilita a divisão celular** (enriquecido com fitohemaglutinina)
- Quando a divisão celular chega à **metafase** são administrados tóxicos específicos (colcemida) que **param a divisão celular**



# Citogenética

- As células são *lisadas* (solução hipotónica) para libertar os cromossomas
- **Os cromossomas são fixados** (ácido metil-acético remove as histonas, em parte) numa lâmina
- Podem ser aplicadas várias técnicas de **coloração** dos cromossomas para a sua visualização ao microscópio (i.e. Giemsa)
- As alterações cromossómicas são reconhecidas pois cada cromossoma possui um **padrão específico de bandas (*G-banding*)**

# Citogenética

Estudo dos cromossomas – **Análise cromossómica**



# Citogenética

## Estudo dos cromossomas – **Análise cromossómica**

- ✓ As alterações cromossómicas são visualizadas ao **microscópio**
- ✓ Esta técnica é substituída na maioria dos casos pelo diagnóstico laboratorial através de **DNA array**
- ✓ Através do **G-banding** foi possível estabelecer a nomenclatura citogenética

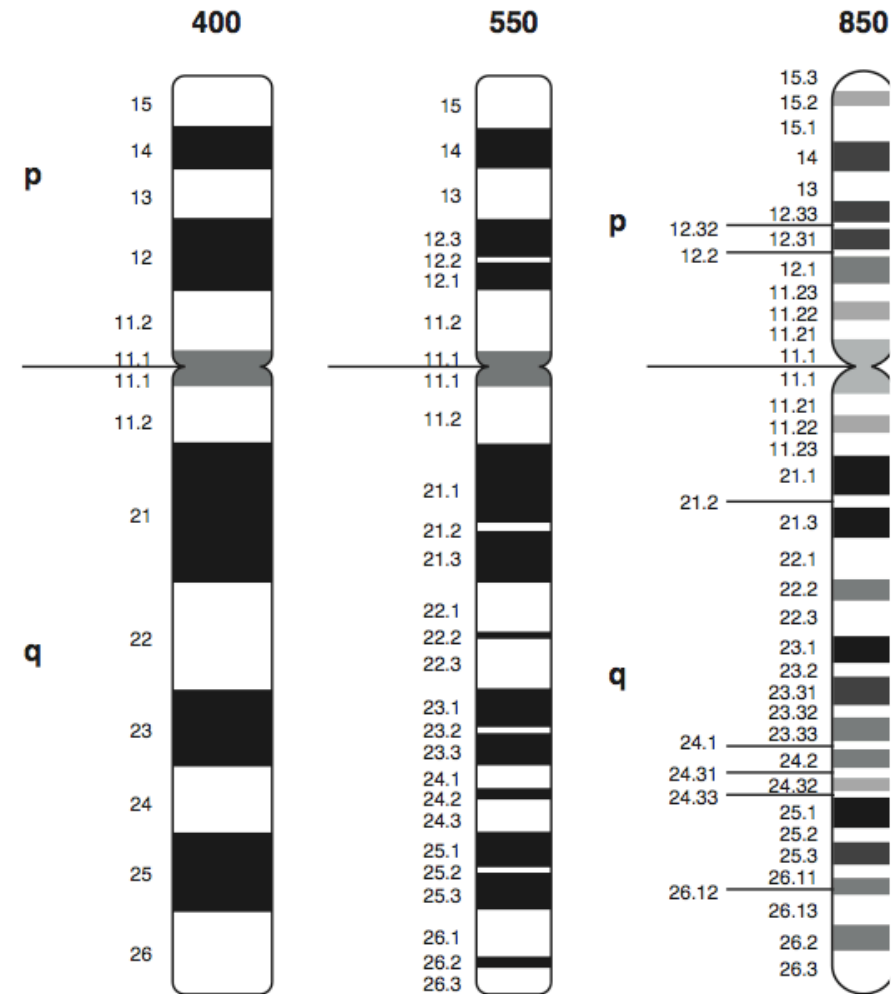


Figure 15.2. Different Band Resolutions and Corresponding Ideograms of Chromosome 10. Resolution

# Citogenética Molecular

## Hibridação *in situ* fluorescente - FISH

Apenas permite a detecção de rearranjos cromossômicos de grande dimensões e portanto visíveis ao microscópio óptico ou confocal de fluorescência

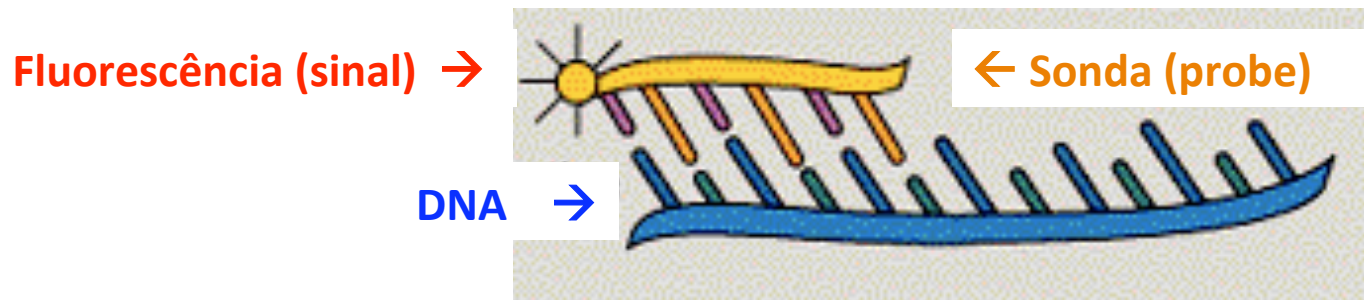
É uma técnica que está em desuso devido ao aparecimento do DNA array e microarray

# Citogenética Molecular

## Hibridação *in situ* fluorescente - FISH

### Fundamentos de citogenética e genética molecular

- Utiliza **sondas** (*probes*) marcadas com proteínas fluorescentes e complementares a cada zona dos cromossomas



- As **sondas são hibridadas com os cromossomas** emitindo sinal fluorescente quando visualizadas ao microscópio de fluorescência

# Citogenética Molecular

## Hibridação *in situ* fluorescente - FISH

### Tipos de Sondas Utilizadas em FISH:

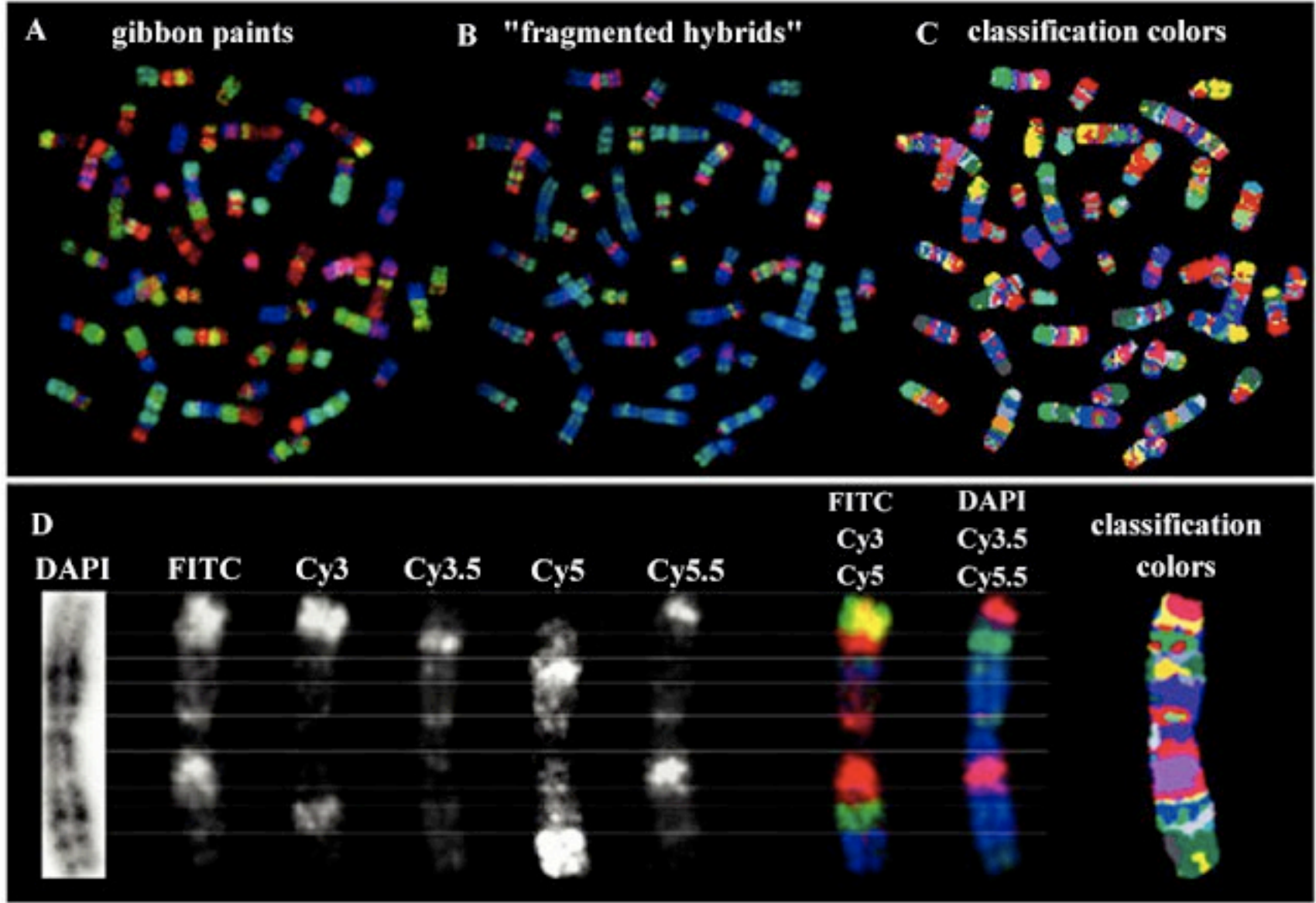
#### Sondas específicas para um locus

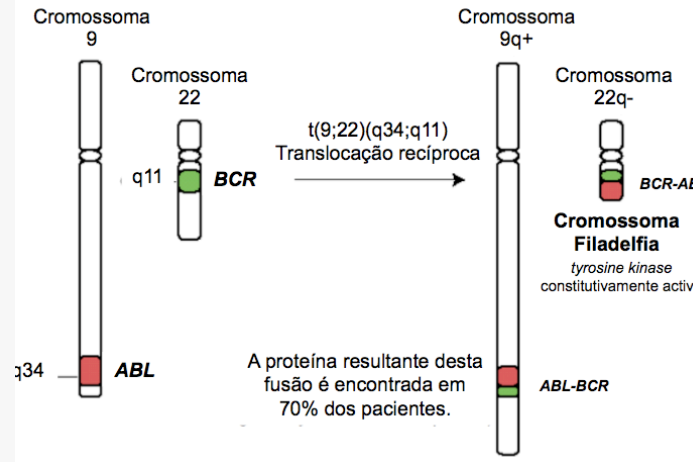
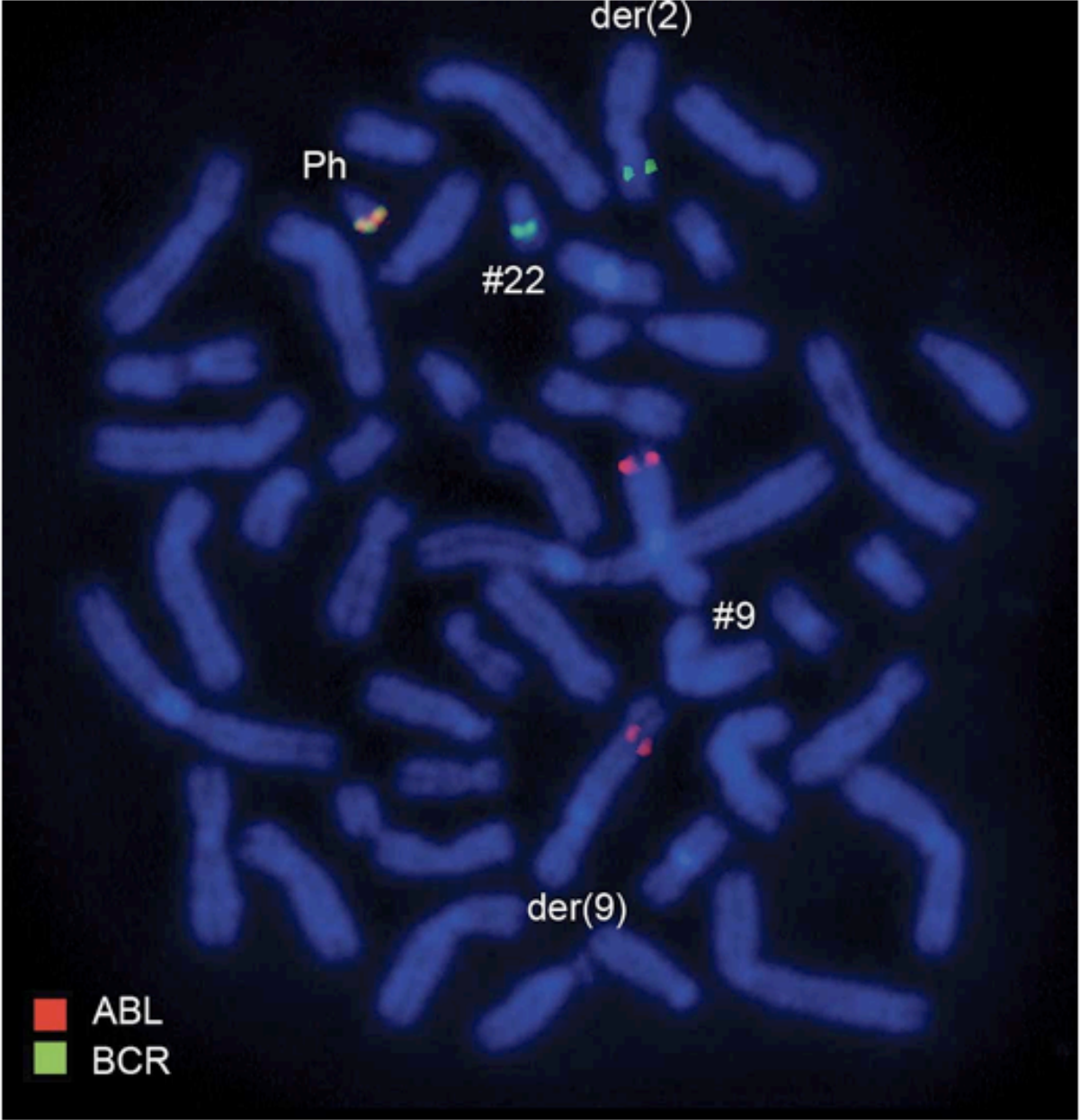
Hibridam com uma região específica do cromossoma.

São usadas na detecção de uma pequena porção de um gene, para saber a sua localização cromossómica ou quantas copias do gene existem num determinado genoma.

# Citogenética Molecular

Hibridação *in situ* fluorescente – sondas marcadas com diferentes compostos fluorescentes (FITC; Cy3; Cy3.5; Cy5 e Cy5.5)





## Diagnóstico Genético

### Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Sondas específicas para um locus:

- Cromossoma Philadelphia

### Diagnóstico de LMC

Figure 2 - Using probes for bcr (green) and abl (red), fluorescence in situ hybridization (FISH) confirmed the involvement of chromosome 2 in the rearrangement present in this case. #Chromosome; der, derivative chromosome; Ph, Philadelphia chromosome.

# Citogenética Molecular

## Hibridação *in situ* fluorescente - FISH

### Tipos de Sondas Utilizadas em FISH:

#### Sondas centroméricas repetitivas

São sintetizadas a partir de sequências de DNA repetitivo de cada cromossoma.

Servem para determinar o número correto de cromossomas.

Podem ser usadas em combinação com sondas específicas de um *locus* para determinar se um indivíduo tem em falta material genético de um cromossoma em particular.

# Citogenética Molecular

## Hibridação *in situ* fluorescente - FISH

### Tipos de Sondas Utilizadas em FISH:

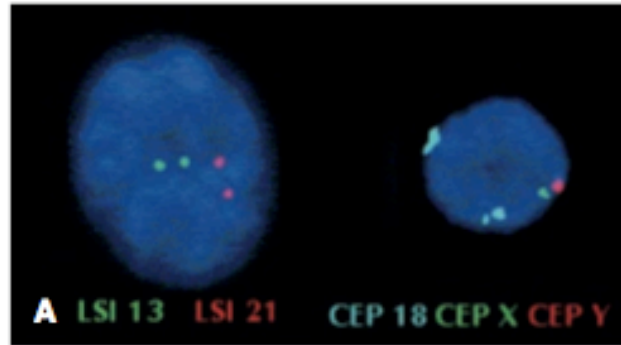
#### Sondas para todos os cromossomas

São coleções/bibliotecas de pequenas sondas em que cada uma delas é complementar de uma sequência específica de DNA, ao longo do comprimento de um cromossoma em particular.

Através do uso de múltiplas sondas marcadas com corantes fluorescentes diferentes é possível marcar cada cromossoma de uma só cor.

Estas sondas são bastante úteis para a detecção de anormalidades cromossómicas estruturais (ex. Translocações).

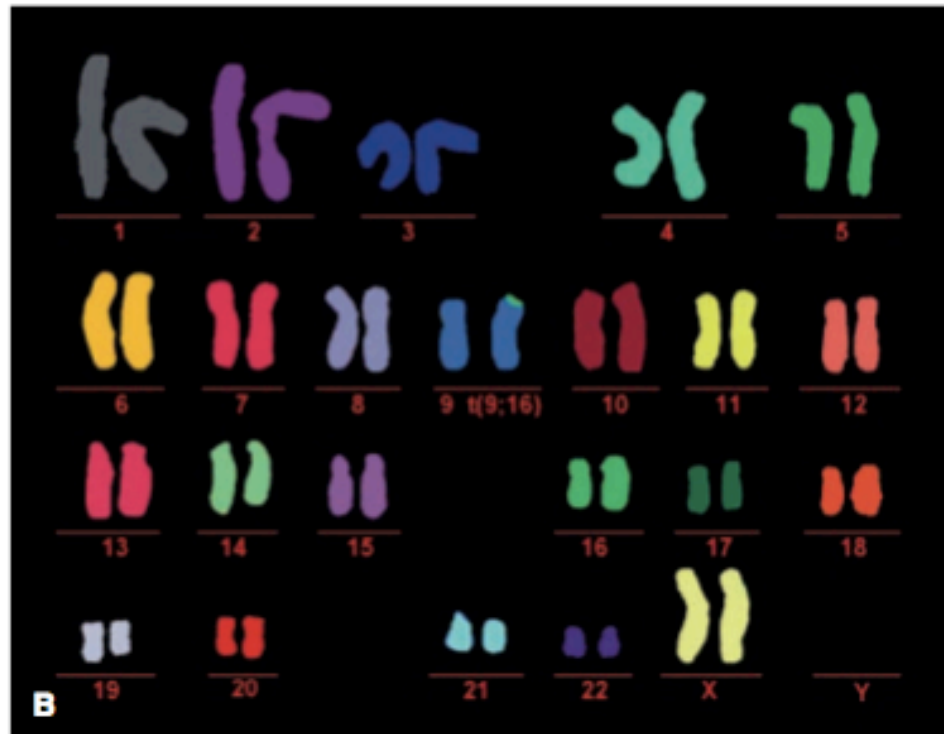
# Citogenética Molecular



Sondas centroméricas repetitivas

## Diagnóstico Genético

### Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)



Sondas para todos os cromossomas

■ **Figure 15.3. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Diagnostics.** **A.** In prenatal diagnostics, a rapid FISH test of interphase nuclei reveals three copies of the chromosome 18 centromere, indicating either trisomy 18 or partial trisomy 18 in a male fetus. **B.** Multiplex-FISH (M-FISH) analysis with combination stained “painting” probes for all human chromosomes shows an unbalanced translocation of (9)t(9;16). The short arm of the derived chromosome 9 (in blue) shows additional material of chromosome 16 (green). (Courtesy of Dr. Jauch Institut für Humangenetik Heidelberg.)

# Citogenética Molecular

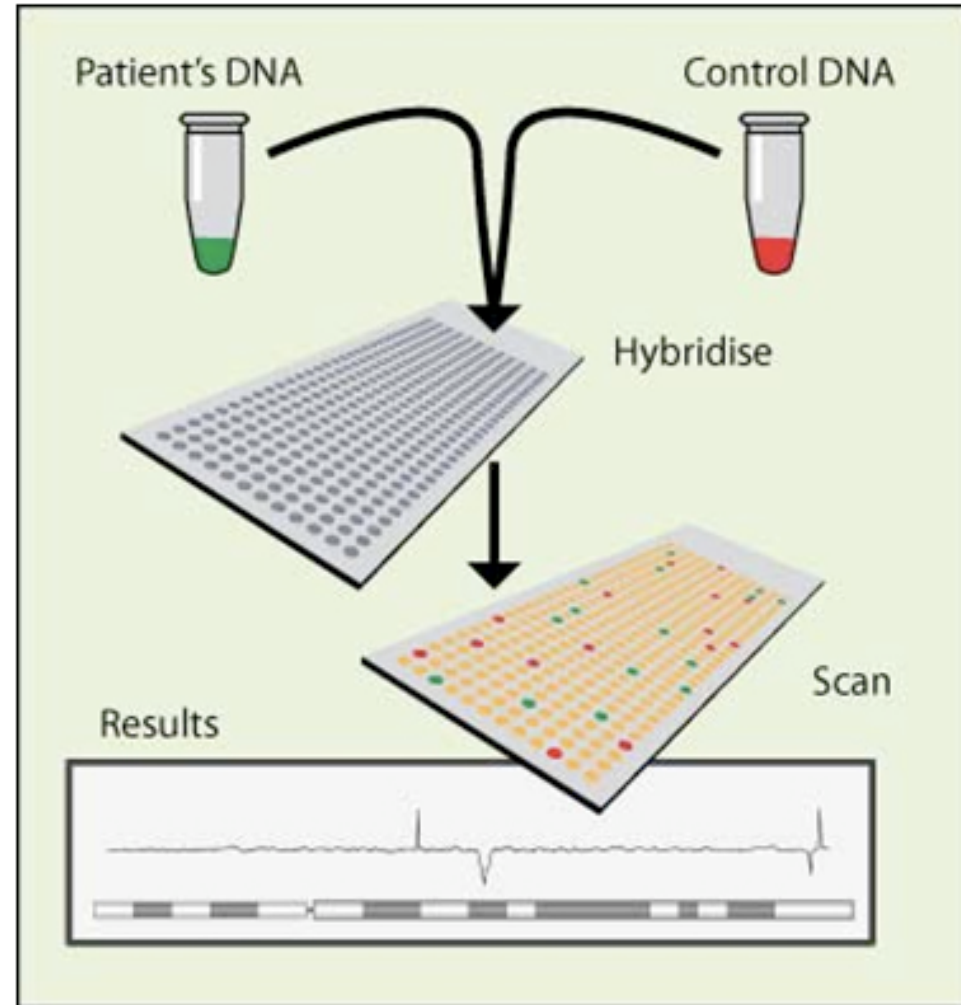
## Análises de DNA Array

- Os cromossomas são purificados do resto do material celular e **são marcados por regiões** com sondas marcadas com uma proteína fluorescente.
- **Estas sondas correspondem a diferentes regiões cromossómicas, abrangendo todo o genoma humano.**
- Seguidamente são hibridados com uma **membrana (*slide*)** que contem centenas de sondas oligonucleotídicas fixas.

# Citogenética Molecular

## Análises de DNA Array

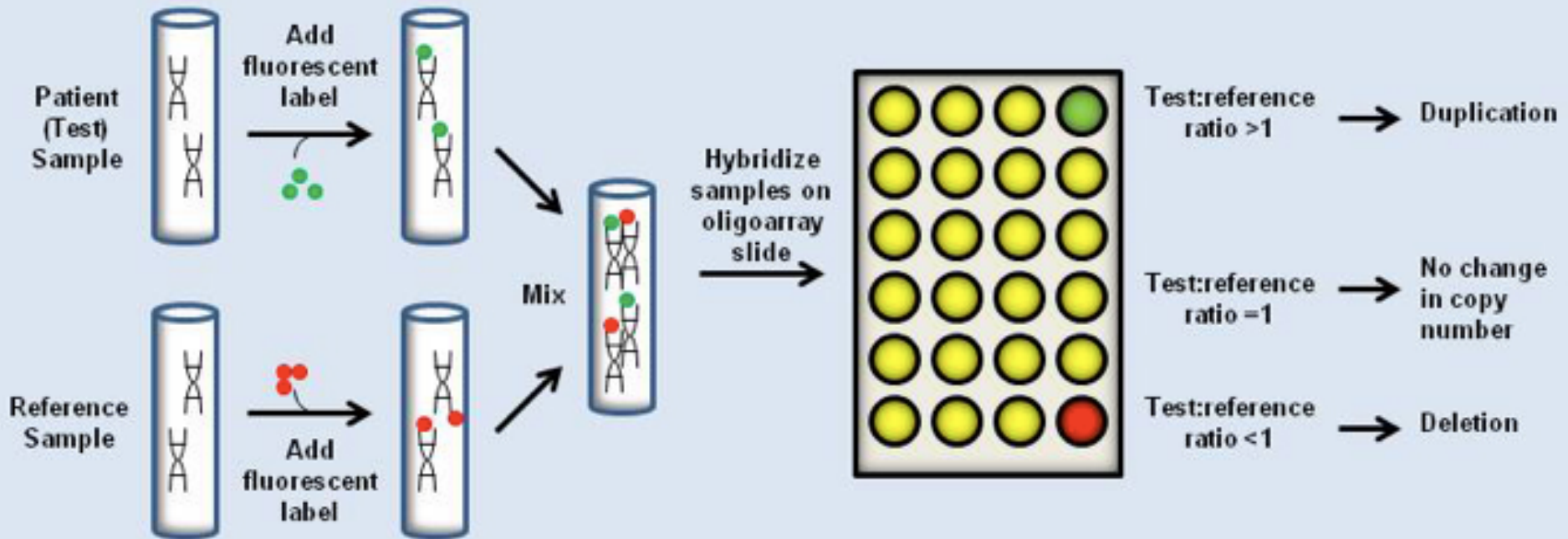
- As regiões cromossômicas hibridam especificamente com as sondas fixa no *slide*.
- O mesmo procedimento é feito com uma amostra de referência (controle)
- A análise computacional (bioinformática) é usada para comparar o material genético do paciente com uma amostra controle.
- Uma diferença entre o DNA do paciente e a amostra controle é chamada de **variante**.



# Citogenética Molecular

## Análises de DNA Array

As variantes podem ser classificadas segundo o tipo de alteração no material genético:



# Citogenética Molecular

## Análises de DNA Array

Esta técnica permite a identificação de **deleções** e **duplicações/multiplicações** chamadas *copy number variants (CNVs)*

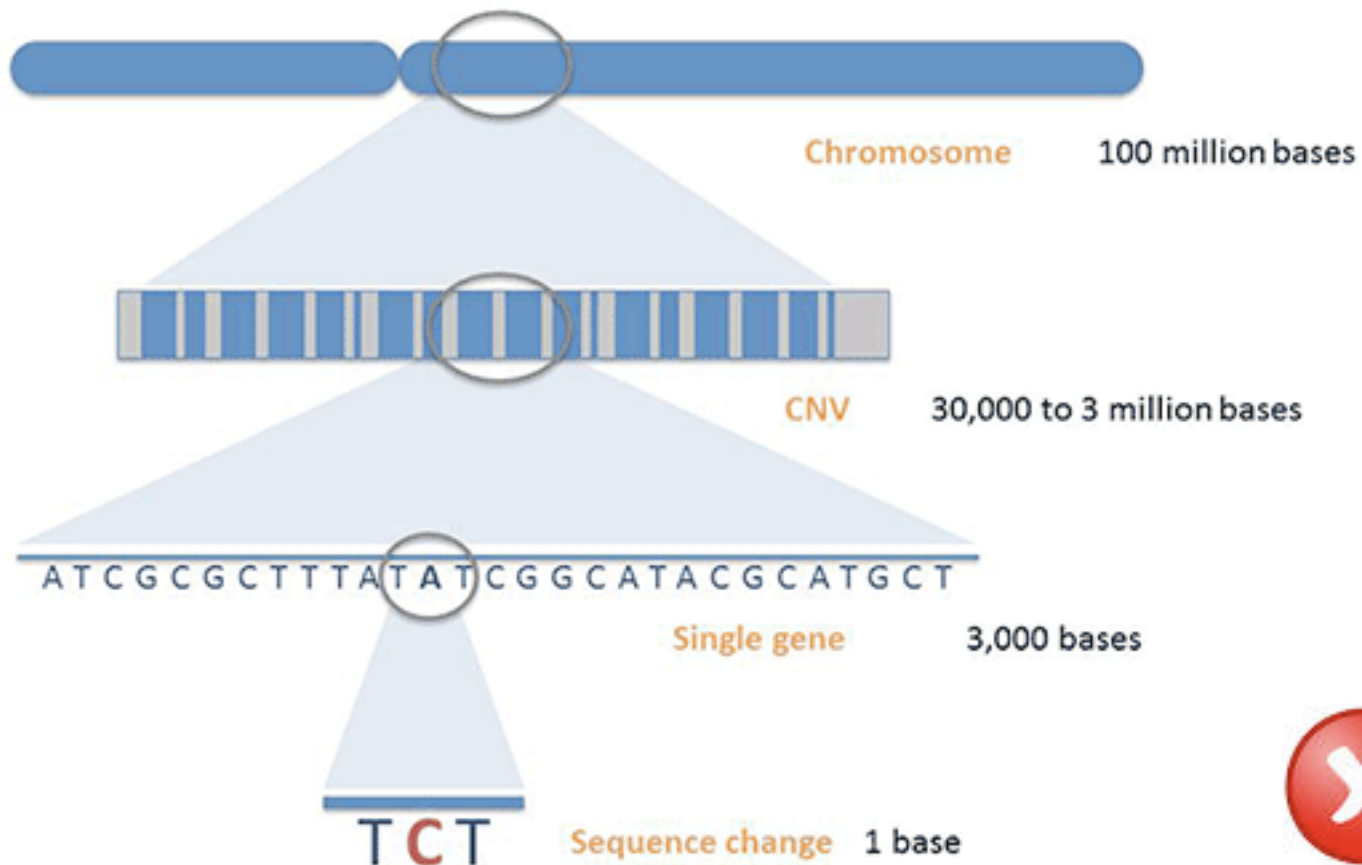
Podem ser:

- Microdeleções e microduplicações de segmentos cromossômicos, que são demasiado pequenas para serem detetadas ao microscópio.
- Maioria das aberrações numéricas cromossômicas (trissomia, monossomia, etc.).
- Maioria dos rearranjos estruturais cromossômicos desequilibrados (translocações, inversões, etc.).
- Moisaicismo, apenas em casos a partir de 20 a 25% de células com cariótipo anormal (diferente)

# Citogenética Molecular

## Análises de DNA Array

### Scale of Genomic Variation



# Citogenética Molecular

## Análises de DNA Array

Esta técnica não permite a detecção de:

- Pequenas alterações na sequência de um único gene (SNPs).
- Pequenas duplicações e deleções em segmentos de DNA dentro de um único gene (ex. Síndrome do X frágil ou autismo: consiste na mutação por repetição de 3 nucleótidos do gene FMR1 do cromossoma X).
- Rearranjos cromossômicos equilibrados (ex. Translocações e inversões)

# Citogenética Molecular

## Análises de DNA Array

Aconselhamento genético:

### **General Indications for Requesting a DNA Array Analysis**

- Multiple malformations or unknown dysmorphism syndrome
- Unexplained fetal demise, especially if history of more than one fetal demise or stillbirth
- Psychomotor developmental delays, especially in the context of short stature, dysmorphism, and/or multiple malformations
- Growth disturbances in girls; quite often, these are caused by Turner syndrome/monosomy X
- Increased risk for a fetal chromosomal disturbance during pregnancy (e.g., advanced maternal age, as well as prior child or fetus with chromosomal abnormality)
- Positive family history for chromosomal abnormality; a copy of the abnormal chromosomal report should be reviewed

# **Métodos de diagnóstico laboratorial em genética**

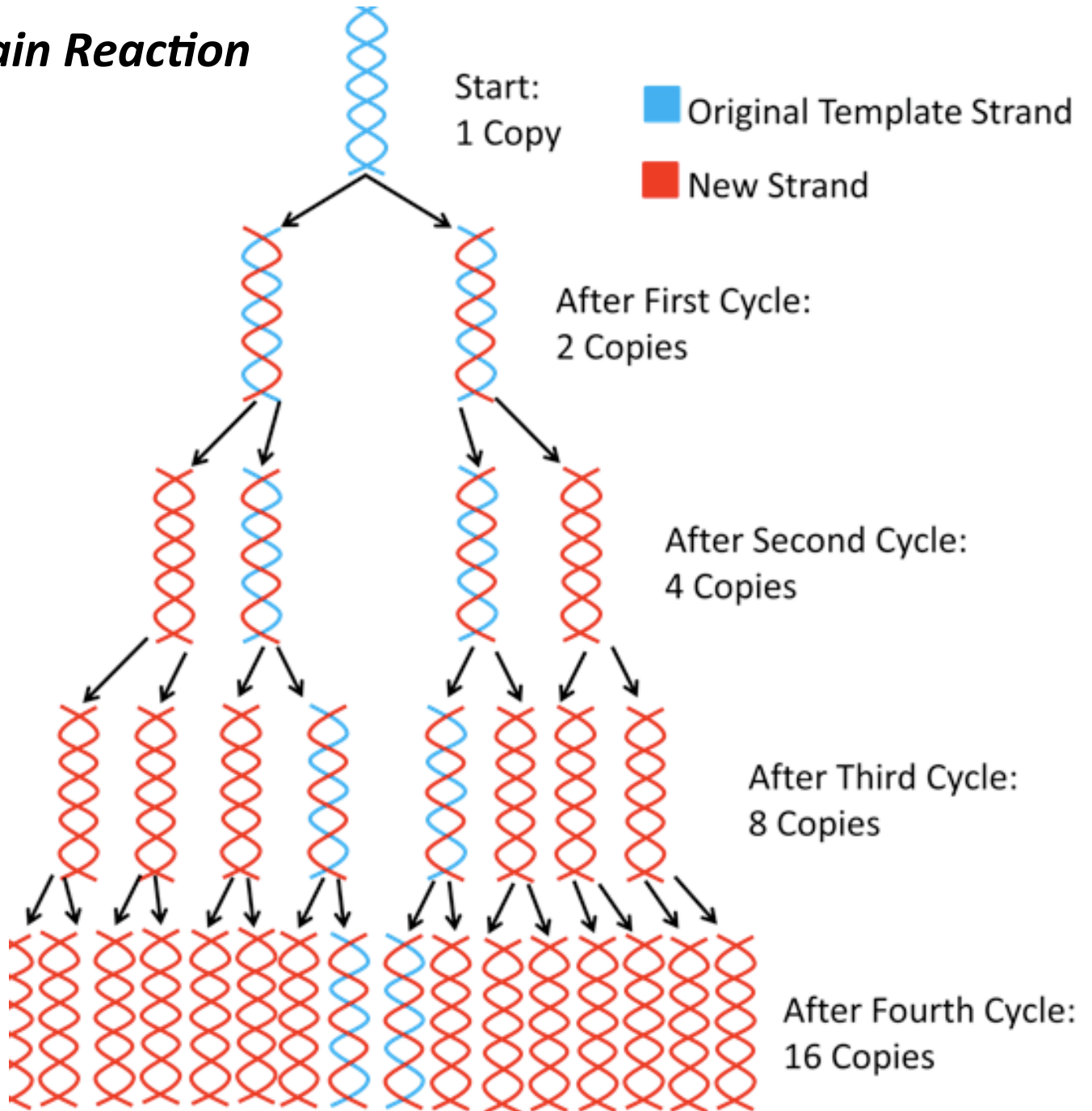
## **Genética Molecular**

# Genética Molecular

## Detecção de mutações e níveis de expressão genética

- ✓ A genética molecular refere-se a todos os métodos de diagnóstico que detectam mudanças na informação genética em **DNA** ou **RNA** extraído de células.
- ✓ Esta área da genética humana cresceu bastante nos últimos 25 anos devido à invenção da **PCR** em 1983 (*Polimerase chain reaction*).
- ✓ Os **produtos de PCR** podem ser analisados em termos de sequência, tamanho e quantidade, o que permite a detecção de pequenas mutações num gene em particular

# Polimerase Chain Reaction



# Genética Molecular

## Detecção de mutações - Amostra Biológica

- ✓ Para a detecção de mutações são necessárias células específicas, ou seja, que **expressem o gene a analisar** (ex. Biopsia de fígado)
- ✓ Para a análise genética ao nível da molécula de RNA, o processamento da amostra deve ser feito rapidamente (extração de RNA), uma vez que é uma molécula instável.
- ✓ O RNA deve ser transcrito em laboratório ao seu DNA complementar – **cDNA (*transcriptase reversa*)**, de forma a ser analisado da mesma forma que o DNA genómico (ex. **Sequenciação**)

# Genética Molecular

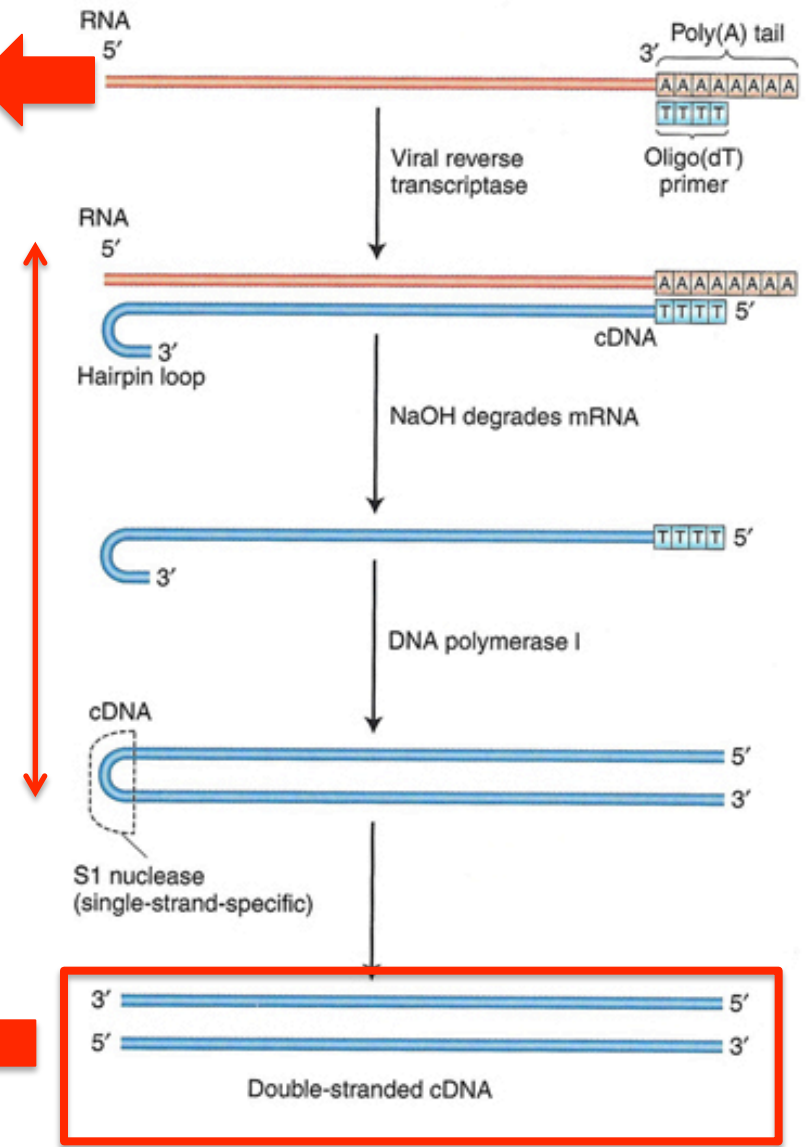
## Amostra Biológica

Processamento de amostras de RNA (análise de expressão genética e mutações)

Purificação de RNA de células alvo

Transcrição reversa para cDNA

Amostra Usada



# Genética Molecular

## Amostra Biológica

- ✓ Os métodos de análise podem ser aplicados tanto para cDNA como para DNA
- ✓ A maioria dos métodos de genética molecular utilizam o DNA genómico como amostra biológica
- ✓ Na detecção de infeções virais e bacterianas é frequente o diagnóstico através da detecção de RNA exógeno

# Genética Molecular

## Detecção de mutações – Seleção de métodos adequados

- ✓ A seleção do método a utilizar para a análise depende do **tipo** e da **frequência** da mutação.
- ✓ **Mutações pontuais** e **pequenas deleções** são fáceis de detetar através de **protocolos baseados na PCR**, como **sequenciação** direta dos produtos de PCR.
- ✓ **Deleções grandes, duplicações ou repetições de três nucleótidos** requerem métodos específicos de quantificação genómica ou análises por ***Southern blot***.

# Genética Molecular

## Detecção de mutações – Seleção de métodos adequados

- ✓ Mutações por ***Imprintig*** (*imprinting mutations*) em que o imprinting genómico é prejudicial, são analisadas por **testes de metilação** específicos.
- ✓ Ocasionalmente a qualidade e quantidade de amostra biológica não tem importância, pois para as análises é utilizada uma quantidade muito pequena ( $\mu\text{l}/\text{nl}$  ou  $\mu\text{g}/\text{ng}$ ).
- ✓ No entanto as análises por *Southern Blot* requerem grandes quantidades de DNA intacto e bastante puro

# Genética Molecular

## Detecção de mutações – Triagem (*screening*)

- A triagem é indicada em doenças em que as **mutações são conhecidas** (pelo menos algumas das mutações responsáveis), como no caso da fibrose quística (kits comerciais disponíveis no mercado).
- Estes testes têm um **número limitado de mutações específicas** (com fenótipo patológico identificado) num gene.
- A etnia do paciente deve ser conhecida, uma vez que as frequências alélicas podem variar em diferentes populações

# Genética Molecular

## Detecção de mutações – Análise (*scanning*)

- Durante a análise são **detetadas todas as mutações** de um gene, tanto mutações conhecidas como mutações desconhecidas.
- As análises são maioritariamente feitas por **PCR** seguida de **sequenciação**.
- A análise de patologias provocadas por grandes repetições de tripletos (três nucleótidos) são normalmente analisadas por *Southern Blot*.

# Genética Molecular

## Detecção de mutações – Análise (*scanning*)

- Deleções grandes ou duplicações em genes ou em segmentos de cromossomas são analisados por quantificação genómica através de **MLPA (*Multiplex ligation-dependet probe amplification*)** que permite a análise de pelo menos 40 *loci* diferentes.
- Para quantificações genómicas e detecção de mutações em grande escala é usado o diagnóstico por **DNA microarray** é usado uma vez que consegue testar de 10 000 até 100 000 sequências de DNA em simultâneo

# Genética Molecular

## Detecção de mutações – Análise (*scanning*)

- Para a detecção de SNP e polimorfismos associados (ou não) a doenças é também utilizada a análise de ***restriction fragment length polymorphism (RFLP)***.
- Este método foi um dos primeiro métodos utilizados para a análise de mutações, embora seja cada vez mais substituído por métodos baseados na PCR.

# Genética Molecular

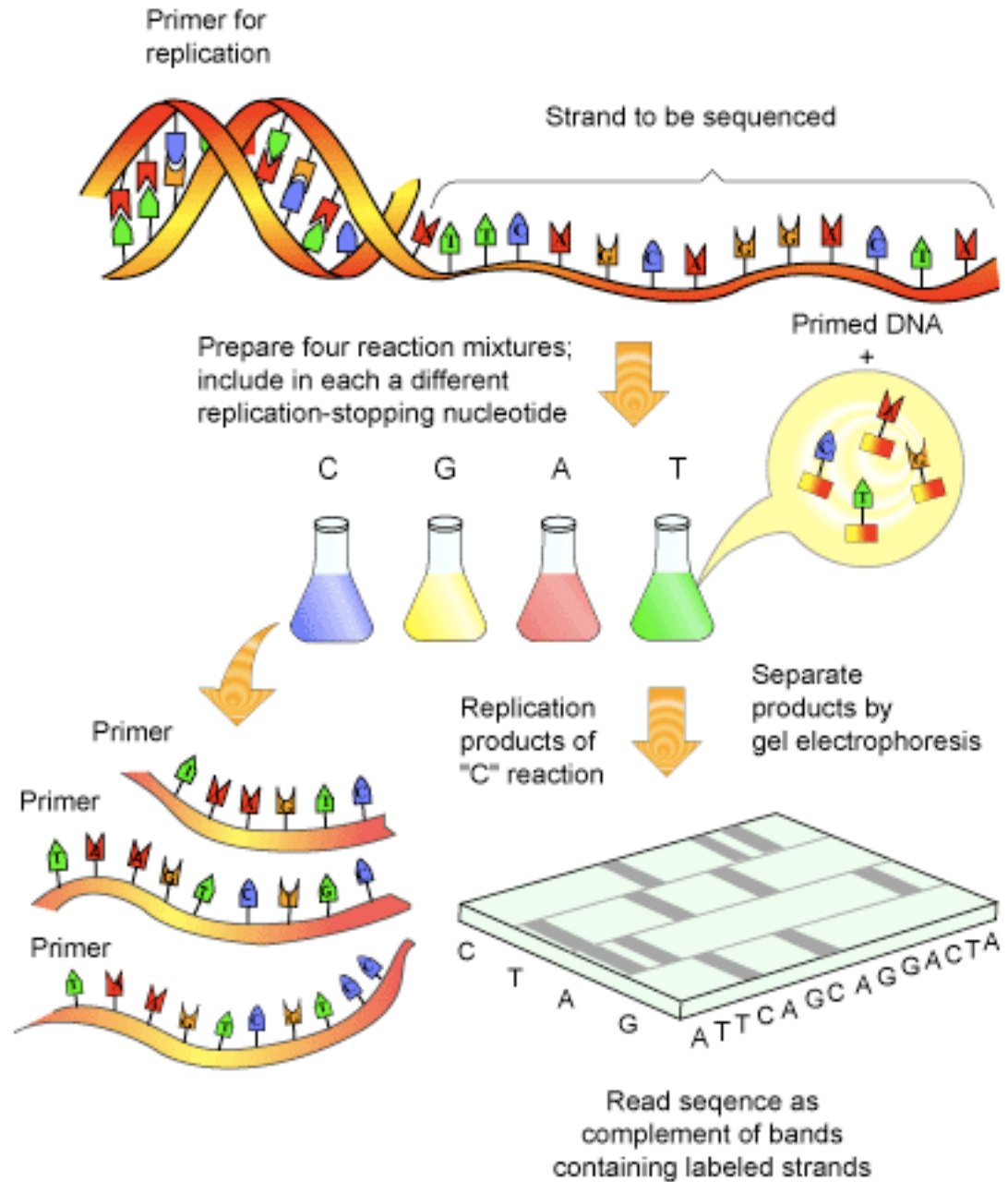
## Detecção de mutações – Análise (*scanning*)

1. PCR ✓
2. Sequenciação de DNA
3. *Southern Blot*
4. Testes de metilação de DNA
5. MLPA
6. *DNA microarray*
7. RFLP

# Genética Molecular

## Detecção de mutações – Sequenciação de DNA

### Método de Sanger

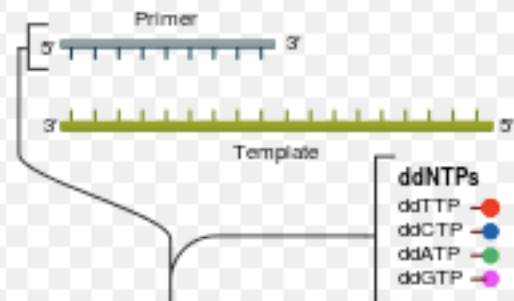


# – Sequenciação de DNA

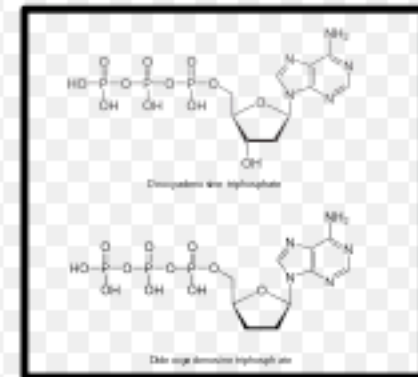
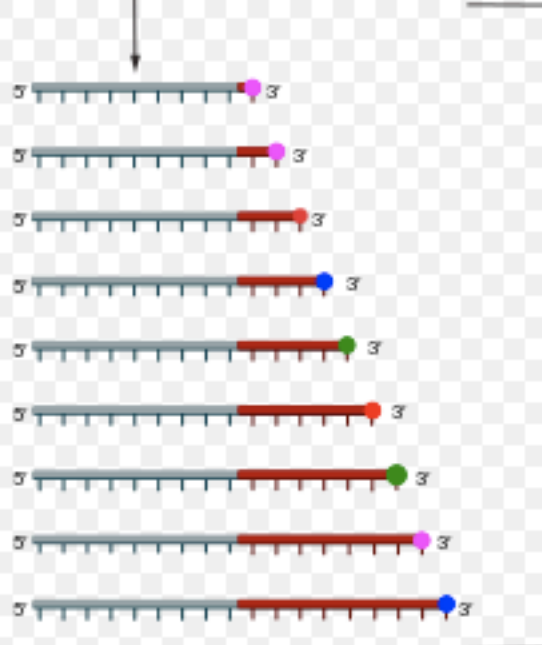
## Método de Sanger

### ① Reaction mixture

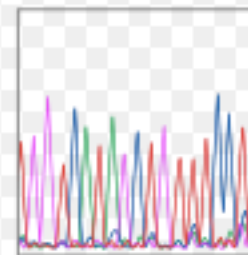
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



### ② Primer elongation and chain termination



### ③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

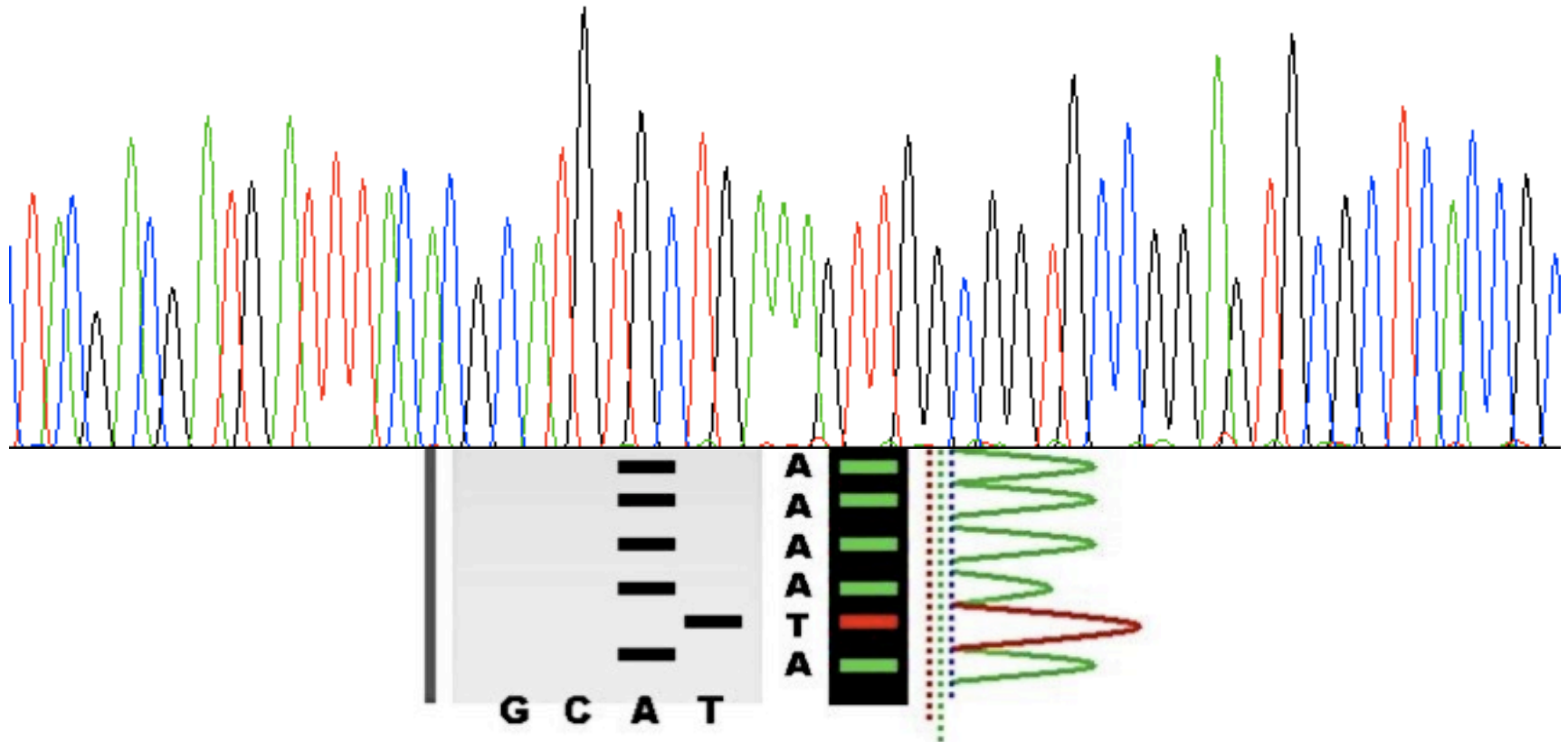
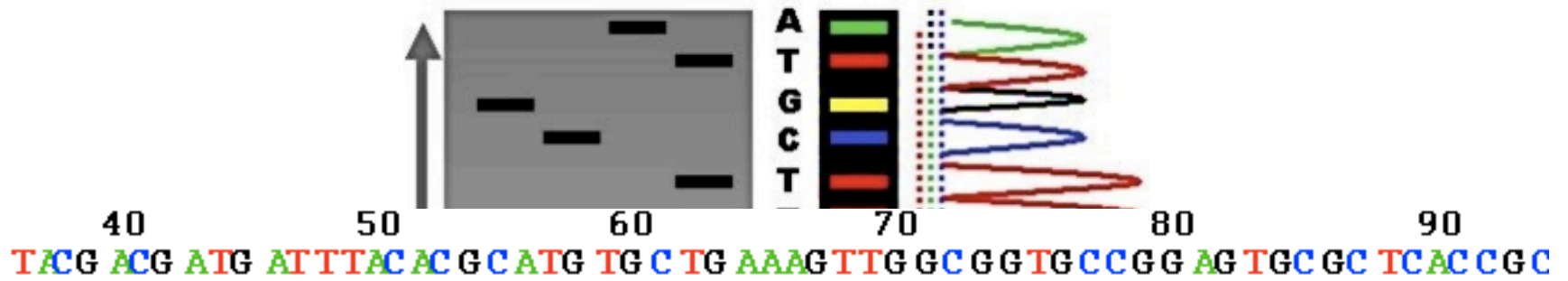


Chromatograph

### ④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis

# - Sequenciação de DNA

## Método de Sanger



# Genética Molecular – *Southern Blot*

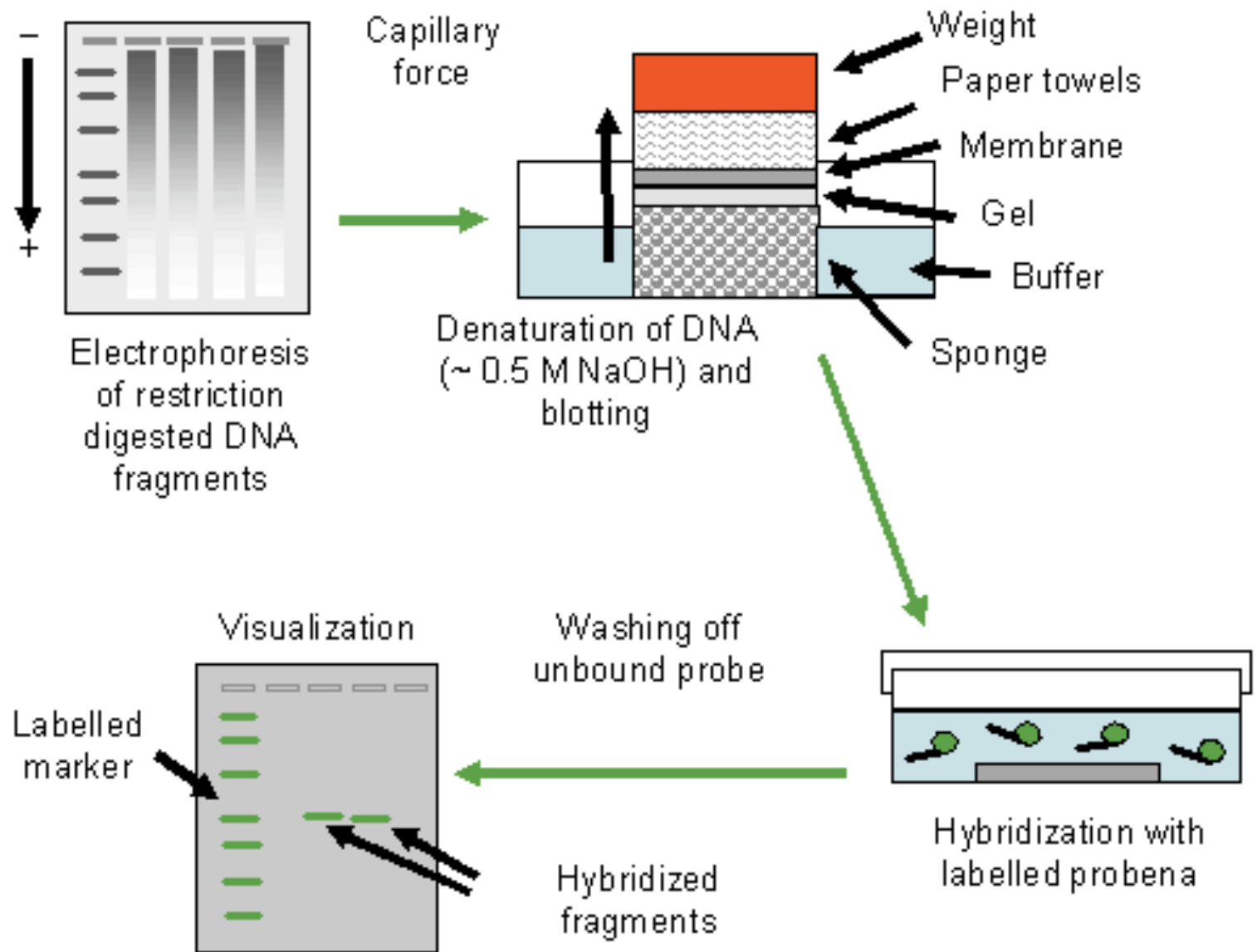
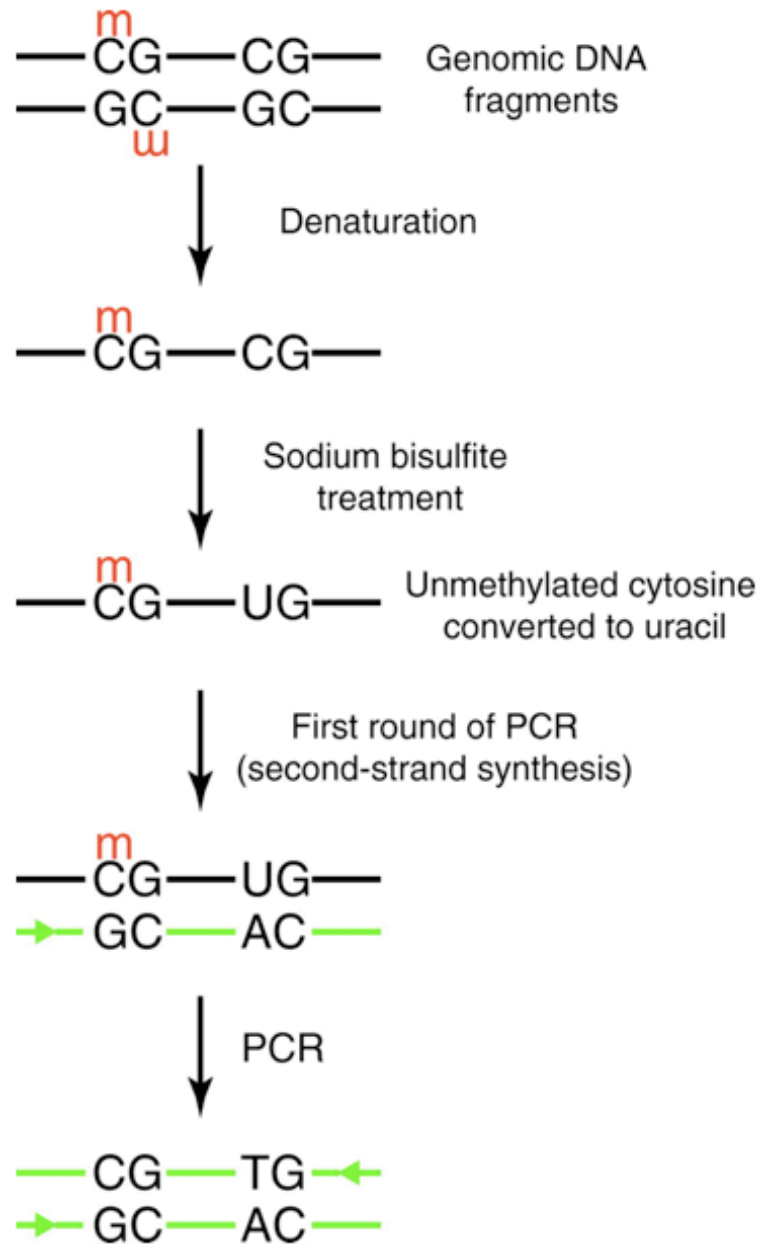


Figure 1. Principle of Southern blotting.

# Genética Molecular – Testes de metilação de DNA

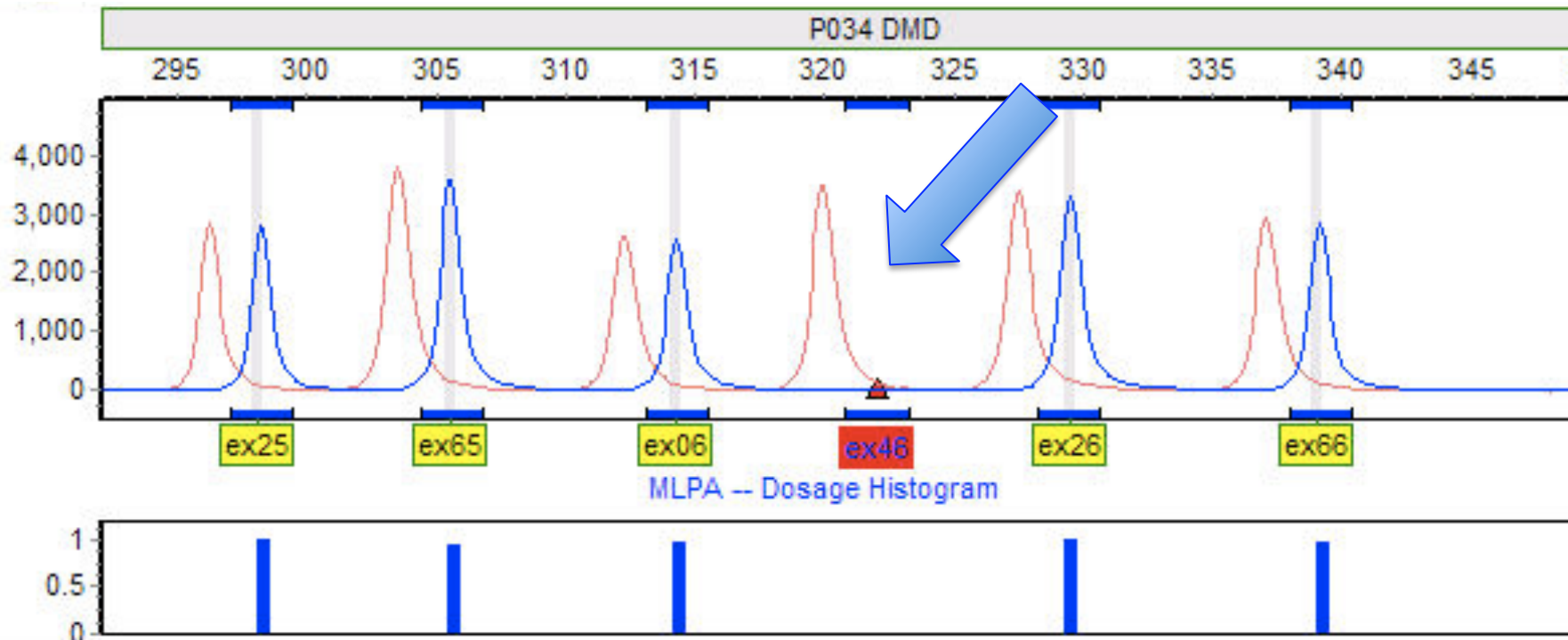
- Detecção de modificações epigenéticas nas ilhas CpG (modificação de citosinas)
- **Método do Bissulfito**



Bisulfite conversion. DNA is denatured and then treated with sodium bisulfite to convert unmethylated cytosine to uracil, which is converted to thymine by PCR. An important point is that following bisulfite conversion, the DNA strands are no longer complementary, and primers are designed to assay the methylation (m) status of a specific strand.

# Genética Molecular – MPLA

- Amplificação de **várias sequências alvo** em simultâneo
- Ao comparar com DNA controlo avalia-se a integridade cromossómica (variantes)

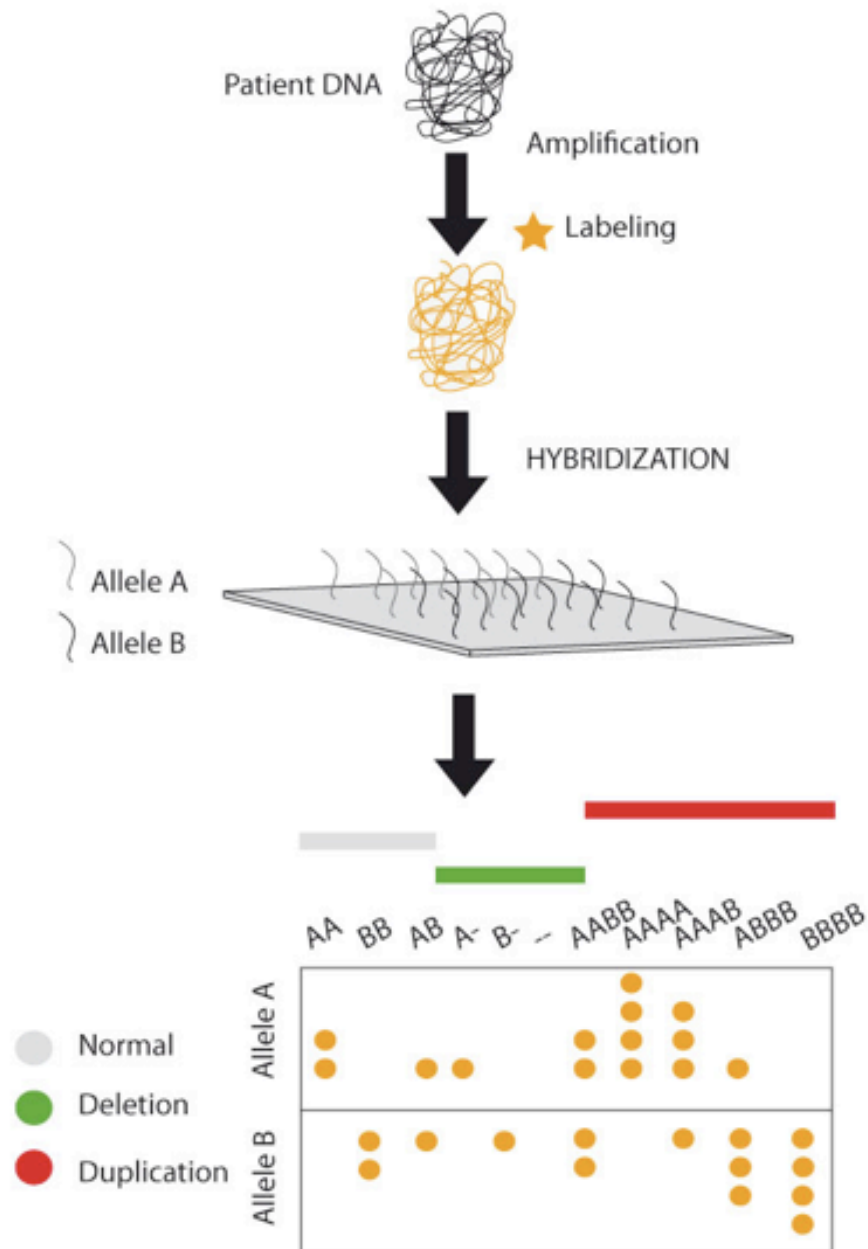


# Genética Molecular

## DNA microarrays

Sondas oligonucleotídicas específicas para polimorfismos (SNP) encontrados frequentemente na população em geral encontram-se fixadas no *slide*.

## Single-nucleotide polymorphism (SNP) array



SNPs are used as markers for genetic diseases with complex traits to map loci of interest and to determine susceptibility genes. It is also possible to study loss of heterozygosity (LOH) in cancer and to detect copy-neutral LOH.

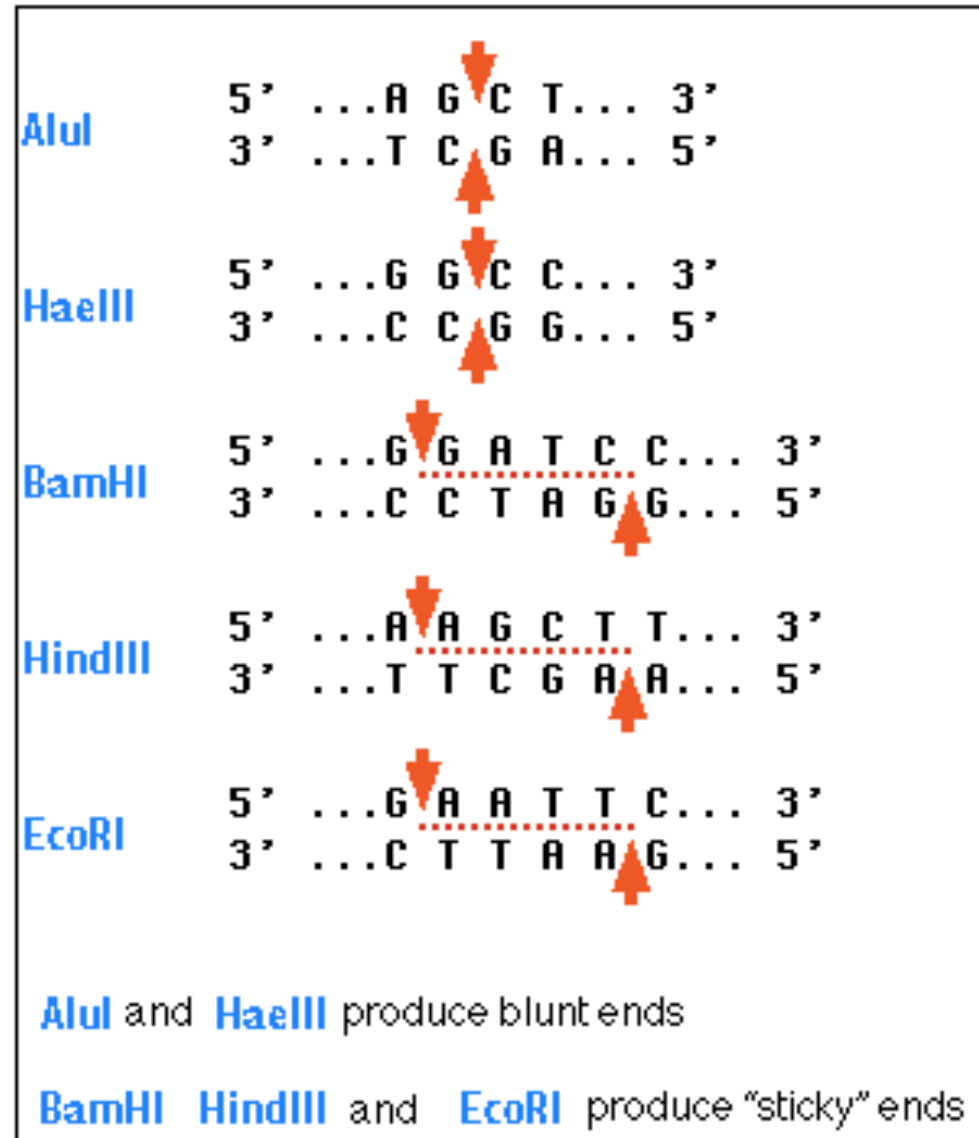
# Genética Molecular

## Enzimas de restrição - mecanismo

### Análise de RFLP

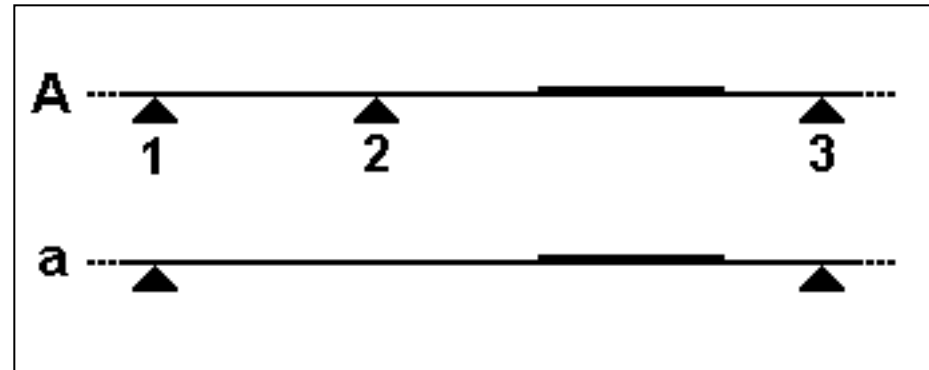
Análise do padrão de corte de **enzimas de restrição** numa região específica do DNA genómico.

Normalmente associada a um fenótipo patológico.

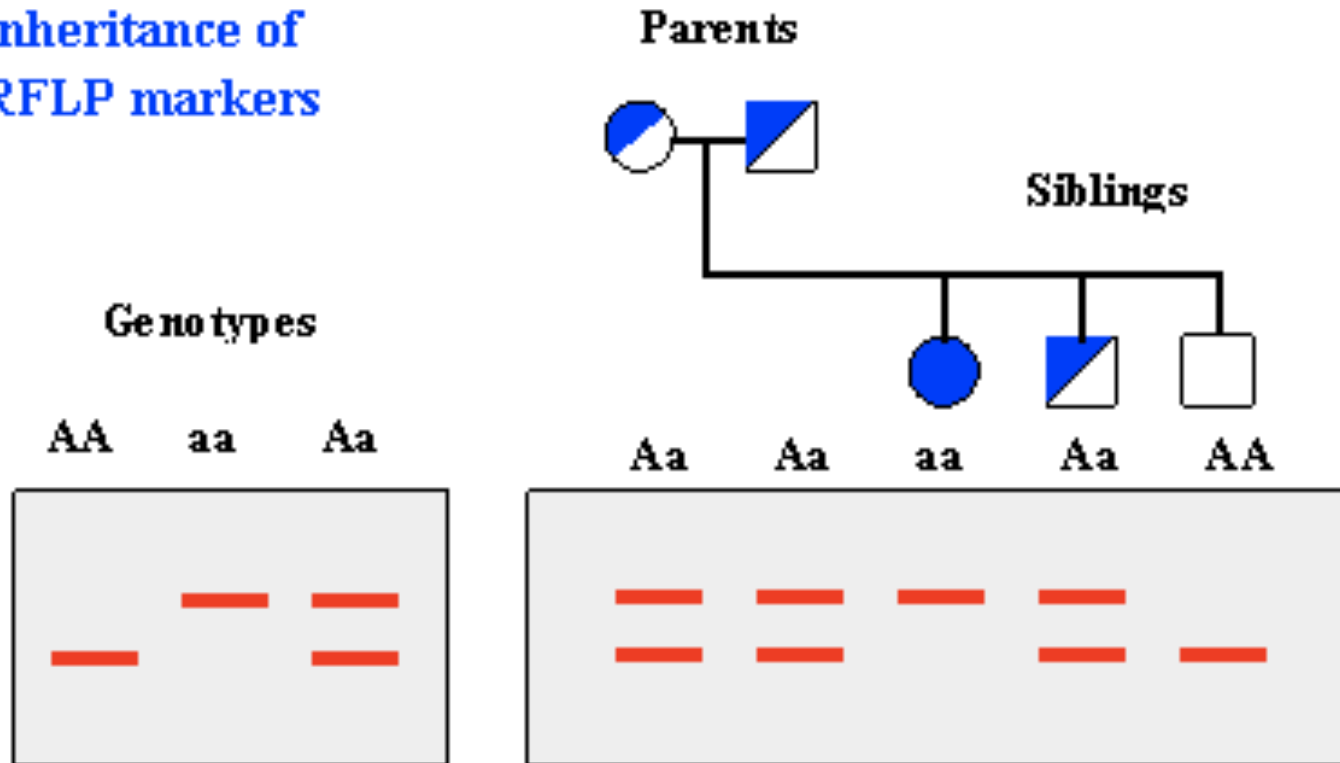


# Genética Molecular

## Análise de RFLP

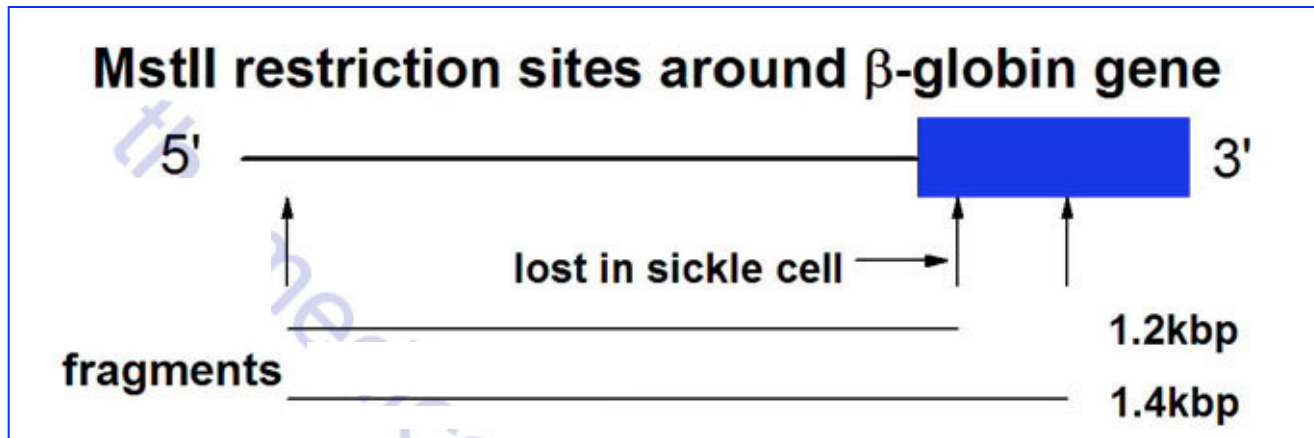


### Inheritance of RFLP markers

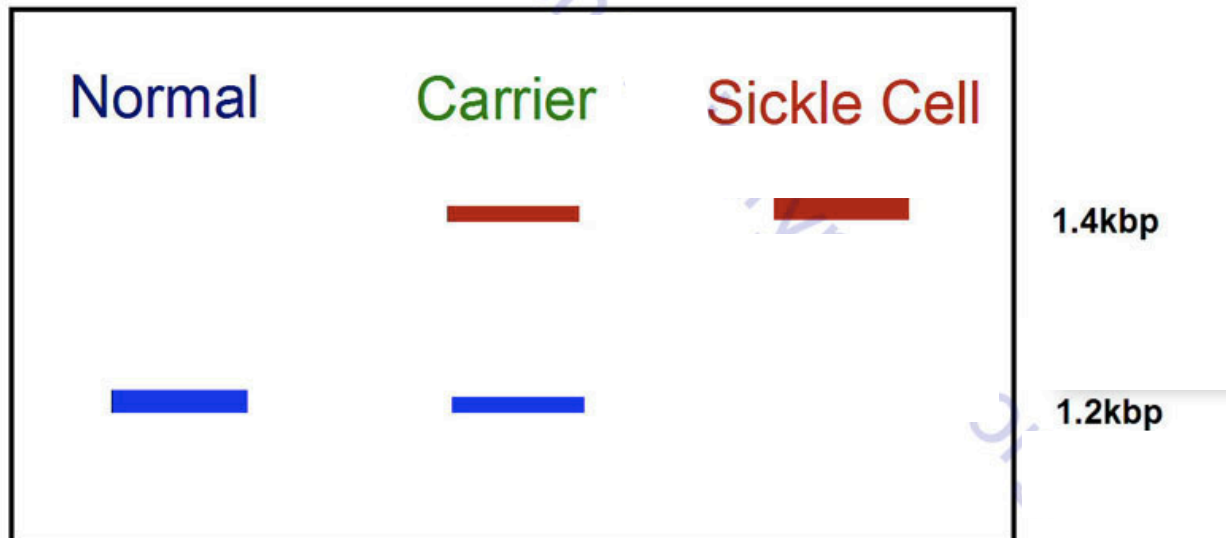


# Genética Molecular      Análise de RFLP

Exemplo: Diagnóstico de anemia faciforme



## Possible RFLP Data



# **Métodos de diagnóstico laboratorial em genética**

## **Diagnóstico Indireto**

## Diagnóstico Indireto

- ✓ Polimorfismos frequentes, como os SNPs ou microssatélites, podem ser bastante úteis na definição de vários alelos num determinado gene ou *locus* cromossómico.
- ✓ O Diagnóstico indireto baseia-se no facto de que as mutações responsáveis por doenças são herdadas conjuntamente com os marcadores genéticos (***Linkage***) localizados na sua vizinhança genómica, no mesmo cromossoma e na mesma cadeia de DNA.

# Diagnóstico Indireto

Desta forma é possível através do diagnóstico indireto:

- 1. Identificar genes causadores de doença.**
- 2. Realizar o diagnóstico indireto numa família.**

## Diagnóstico Indireto – Linkage Analysis

### Identificação de genes responsáveis por doenças

- Em muitas doenças genéticas os genes responsáveis são identificados através *Linkage analysis*
- Estas análises só são possíveis quando uma doença ocorre em várias pessoas dentro de uma família.
- É necessário fazer uma análise genómica dos marcadores de DNA polimórfico em todos os membros de uma família.

## Diagnóstico Indireto – Linkage Analysis

Identificação de genes responsáveis por doenças

- Por exemplo, no caso de uma doença autossômica dominante, como uma penetrância de 100%, são analisados:
  - Quais os alelos presentes em todos os membros da família com sintomas clínicos da doença.
  - Quais os alelos que nunca estão presentes em membros da família saudáveis.
- São portanto investigados os alelos que, numa família, são sempre transmitidos junto com o fenótipo patológico.

## Diagnóstico Indireto – Linkage Analysis

Identificação de genes responsáveis por doenças

- Assim, é possível identificar o *locus* genómico (cromossómico) ao qual a doença se encontra associada/ligada (*linked*).
- Como a associação/ligação de um gene a um marcador genómico pode ser perdida durante a recombinação e durante as gerações (em famílias pequenas), esta análise expressa o seu resultado em **probabilidade**.

## Diagnóstico Indireto – Linkage Analysis

Identificação de genes responsáveis por doenças

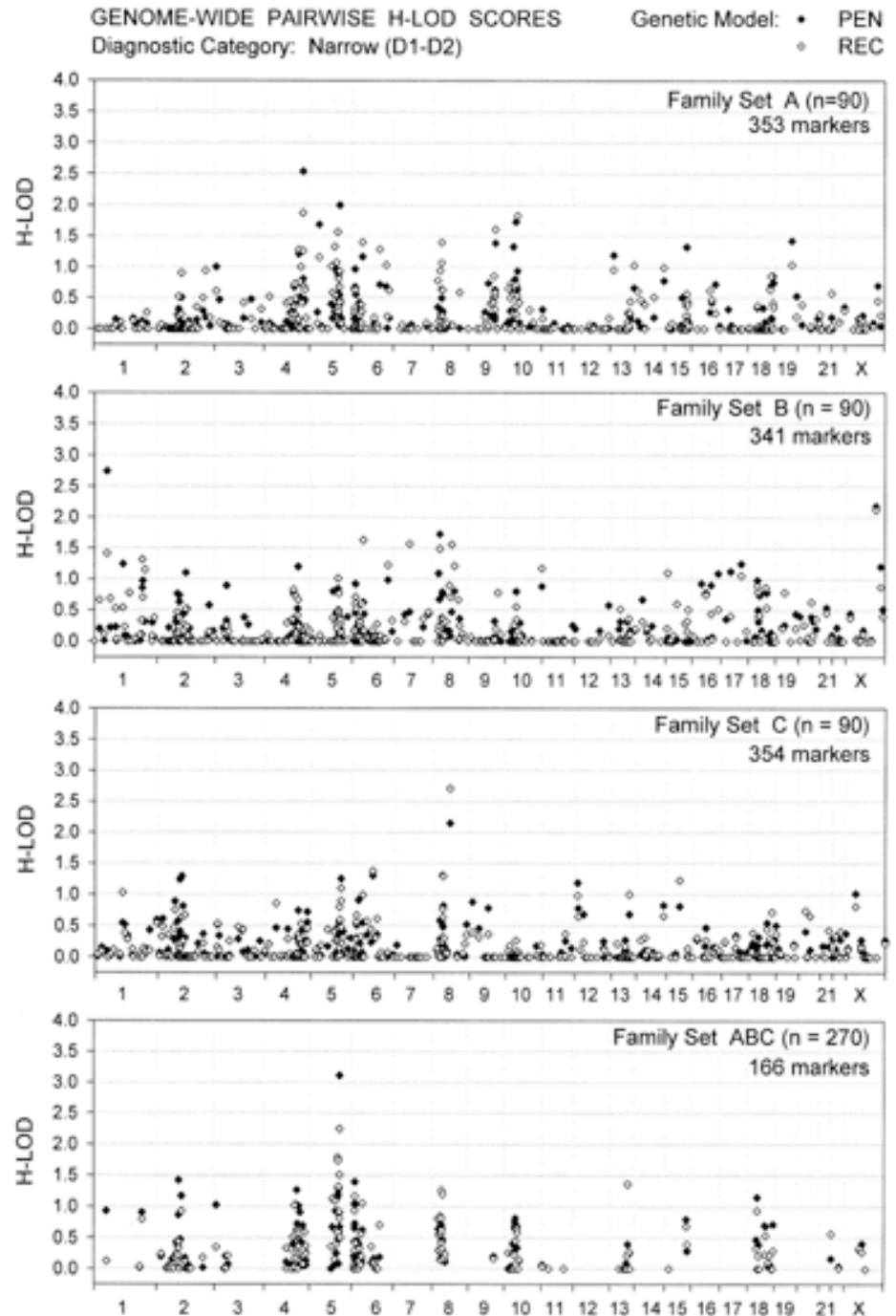
- Esta probabilidade é representada através de um logaritmo, o *logarithm of the odds score (LOD score)*.
- Quanto maior for o **LOD score**, maior é a probabilidade de que um gene causador de doença esteja presente nessa região genómica.

# Diagnóstico Indireto – Linkage Analysis

Identificação de genes  
responsáveis por doenças

Exemplo: esquizofrenia

H-LOD : Heterogeneity LOD score



## Diagnóstico Indireto –

### Diagnóstico indireto de uma família

- Análises de segregação cromossômica de uma família.
- Pode prever se uma pessoa é portadora de um alelo para uma determinada doença.
- Deve ser analisado o DNA de um grande número de membros de uma família (afetados e saudáveis).

## Diagnóstico Indireto –

Diagnóstico indireto de uma família

- Os marcadores genómicos devem estar muito perto do gene para evitar efeitos de recombinação.
- Devido ao avanço das técnicas e métodos de detecção de mutações este tipo de diagnóstico é pouco utilizado atualmente.

# **Evolução clínica da genética molecular**

# Evolução clínica da genética molecular

## Acesso à informação:

O diagnóstico genético tem um **potencial preditivo natural**.

- Por exemplo: não existe diferença (excluindo o preço) entre diagnosticar a anemia falciforme através de um esfregaço sanguíneo ou através da detecção da mutação por PCR ou RFLP, no entanto, apenas a análise da mutação permite um diagnóstico no útero.
- Contudo, existe uma diferença substancial entre diagnosticar a doença de Huntington clinicamente num indivíduo de 50 anos ou prever geneticamente a pré-disposição para a doença num indivíduo de 20 anos.

# Evolução clínica da genética molecular

## **Custo vs Benefício:**

A seleção de uma técnica em genética molecular depende do tipo de mutação e da consideração do custo/benefício

Exemplos:

- Diagnóstico molecular de doenças com diagnóstico confuso/ambíguo.
- Mutações específicas associadas com manifestações clínicas especiais.
- Investigação clínica para a compreensão das relações genótipo-fenótipo.

# Evolução clínica da genética molecular

## Interpretação dos resultados:

- Para uma melhor interpretação dos resultados o geneticista deve estar familiarizado com o espectro da mutação do gene analisado.
- Deve conhecer o *background* clínico e as relações genótipo-fenótipo da doença.
- Avaliar novas variantes genéticas pode ser especialmente difícil, uma vez que frequentemente não se pode dizer com certeza se é patologicamente relevante ou não (variantes genéticas não classificadas).
- As novas variantes genéticas devem ser primeiro discutidas através da publicação/discussão com a comunidade científica e posterior investigação.

# Evolução clínica da genética molecular

## Sensibilidade e Especificidade:

Factores determinantes da sensibilidade das técnicas de genética molecular:

- ✓ Técnica de grande ou baixa resolução (ex. *PCR* vs *Southern blot*).
- ✓ Gene a ser analisado
- ✓ Etnicidade do paciente

# **Métodos de Investigação laboratorial em genética**

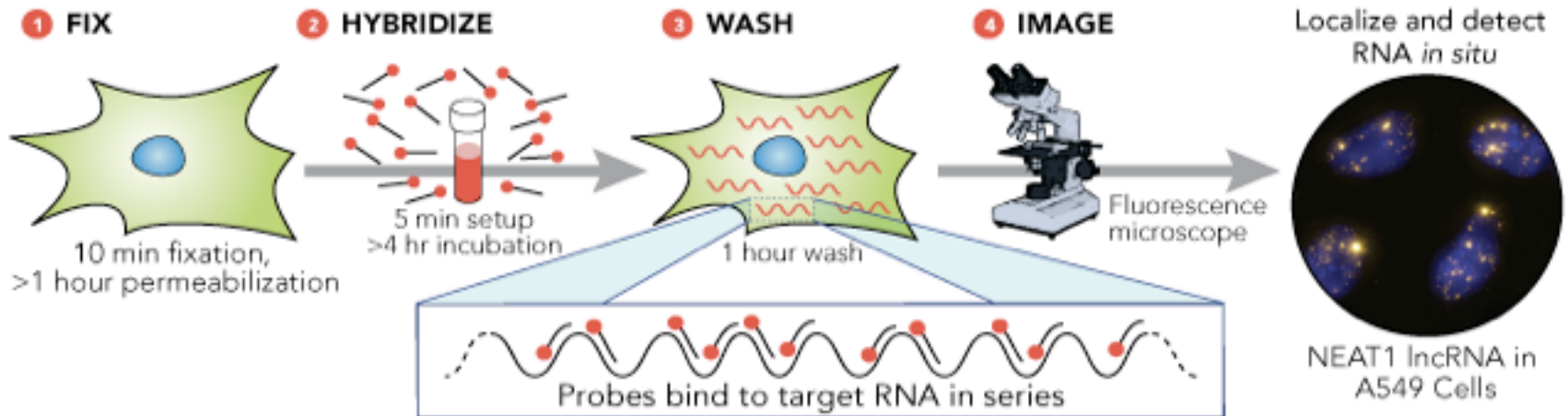
# Análise da Expressão Genética

## Hibridação *in situ* de RNA

- Detecta e localiza a expressão de um gene num organismo, tecido ou célula.
- São desenhadas sondas complementares ao RNA a detetar numa célula ou organismo.
- As sondas são marcadas com um sinal colorimétrico ou enzimático (fluorescente ou não) e hibridadas com o RNA; o sinal é desencadeado.
- As células/ organismos são visualizados ao microscópio.

# Análise da Expressão Genética

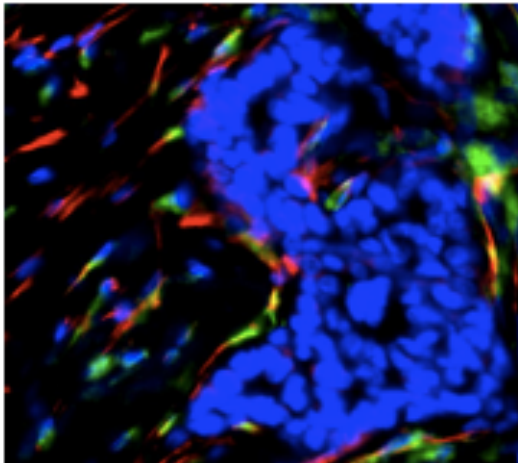
## Hibridação *in situ* de RNA



# Análise da Expressão Genética

## Hibridação *in situ* de RNA

Exemplo: detecção de miRNA associado a cancro em células (fibroastos)



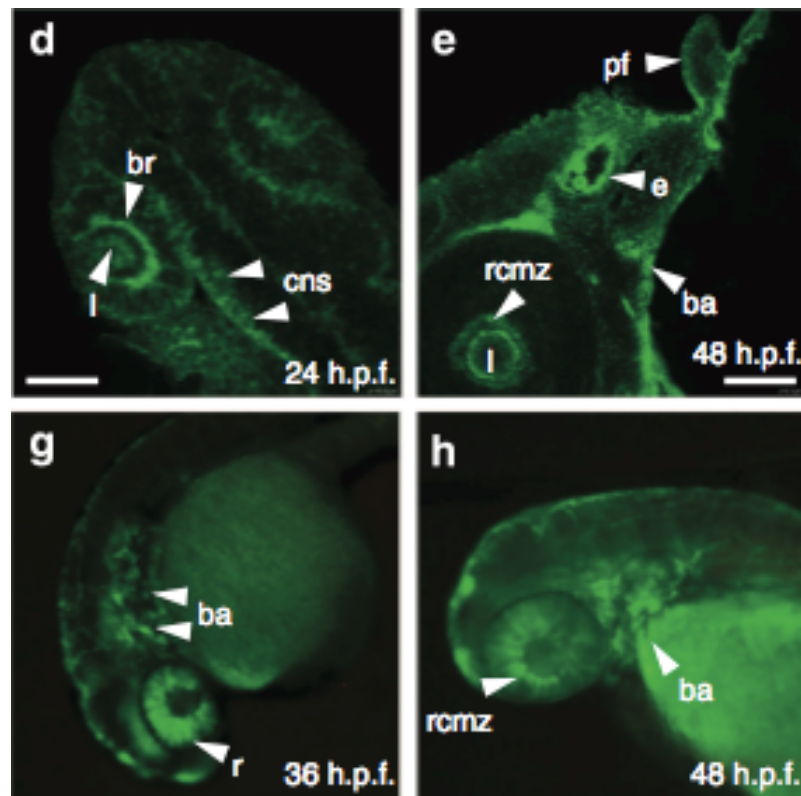
### miR-21 and alpha-actin

miR-21 expression in cancer-associated fibroblasts has been observed in colon, breast and lung cancer. Most cancer associated fibroblasts express a-smooth muscle actin and are named myofibroblasts. In this image co-expression of miR-21 (green) and a-smooth muscle actin (red) is seen in breast cancer myofibroblasts. Counterstain: DAPI.

# Análise da Expressão Genética

## Hibridação *in situ* de RNA

Exemplo: detecção da expressão de um gene morfogenético, expresso no sistema nervoso e arcos branquiais (embrião de peixe zebra)



# Análise da Expressão Genética

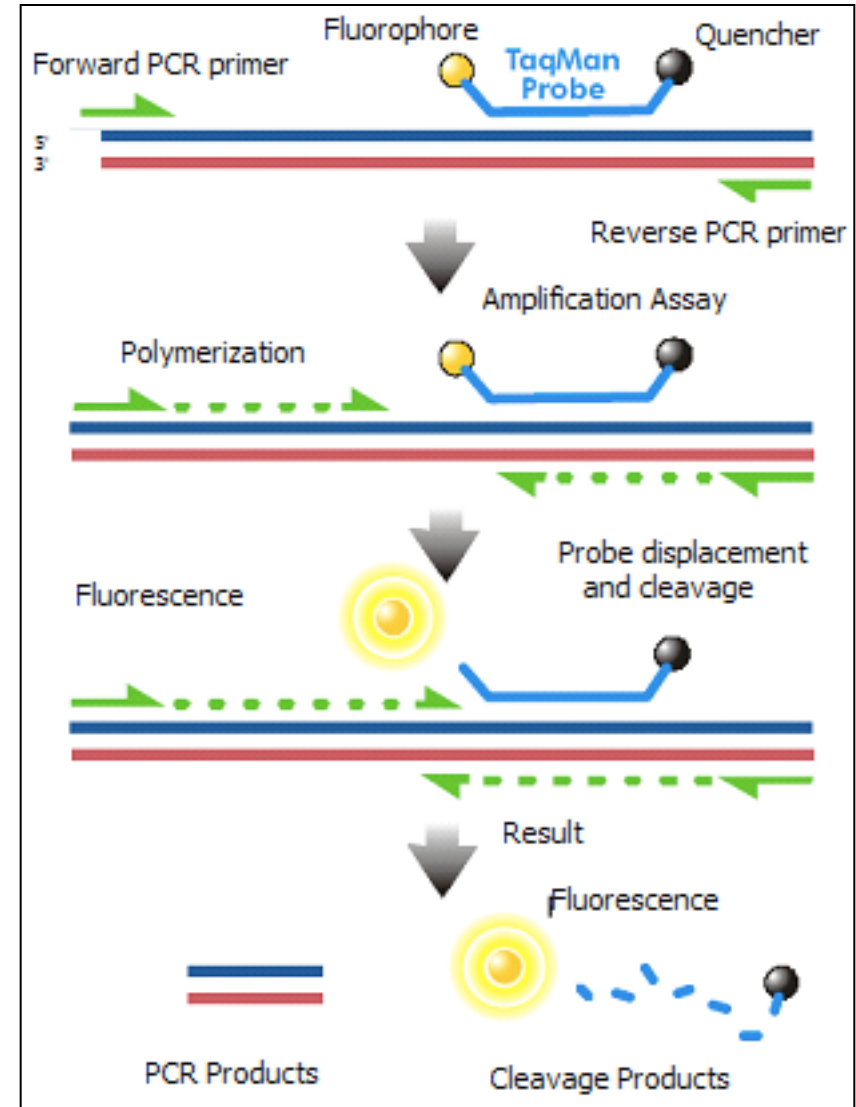
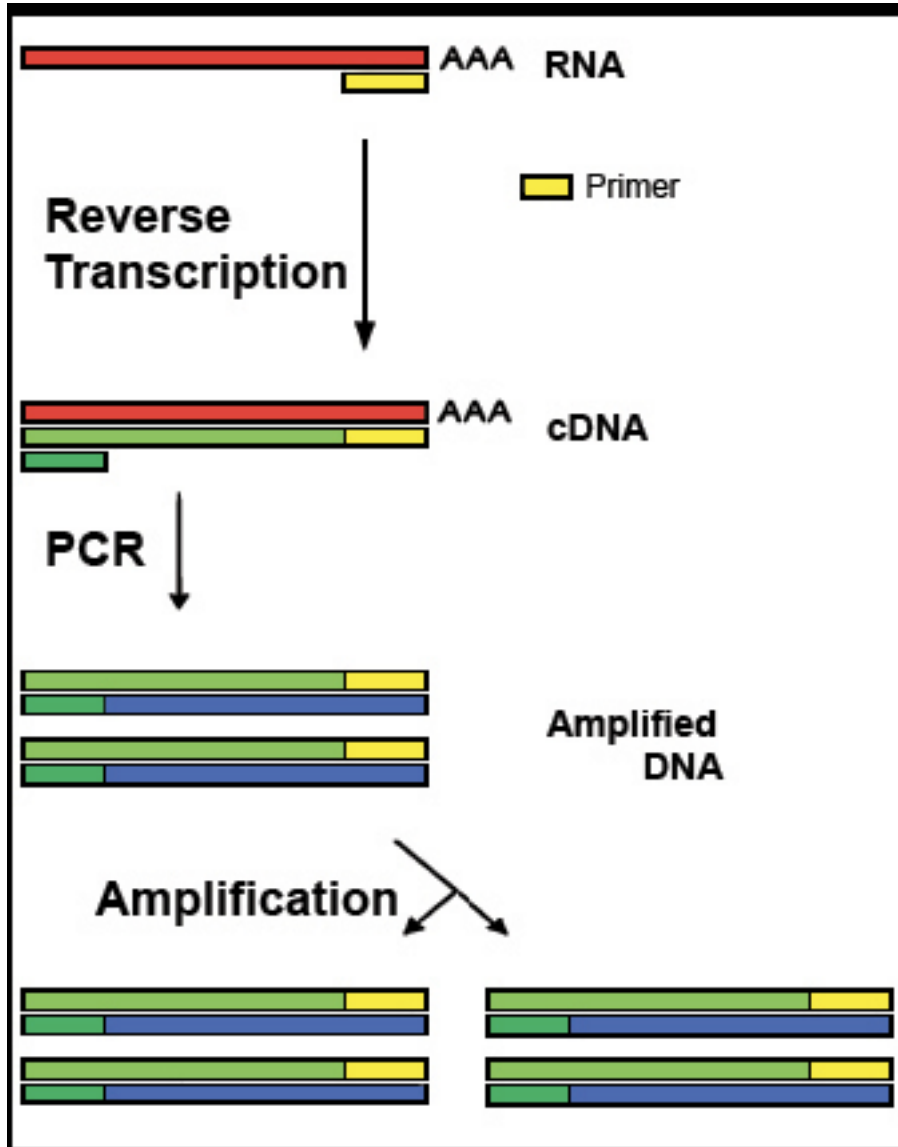
## PCR quantitativa (RT-qPCR)

Quantificação da expressão de um gene no determinado local anatómico e/ou num determinado estágio de desenvolvimento de um organismo/tumor/órgão, através da quantificação molecular de mRNA na amostra.

A quantificação é feita através de um um composto fluorescente. O sinal emitido é diretamente proporcional à quantidade molecular de **cDNA** na amostra

# Análise da Expressão Genética

## PCR quantitativa (RT-qPCR)



# Análise da Expressão Genética

## PCR quantitativa (RT-qPCR)

Exemplo: análise da variação da expressão de um gene (hipostático) quando se aumenta a expressão de outro gene (epistático)

