

AValiação e Caracterização de Aberrações Cromossômicas no Laboratório de Citogenética do Hospital Universitário-UFSC

Fernanda L. Basei

Acadêmica do Curso de Graduação em Farmácia-Análises Clínicas da UFSC

Fernando S. A. Maciel, Glauber Wagner, Aline Nuernberg, Tania S. Liz

Acadêmicos do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFSC

Eliana T. Pereira, Dra.

Professora do Departamento de Clínica Médica da UFSC

Elza M. P. Sartorelli, Dra.

Professora do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC

Maria Cecília M. Ribeiro, Dra.

Prof.^a do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (Coordenadora)
menks@ccb.ufsc.br

Resumo

Neste trabalho, apresentamos os resultados do estudo citogenético para diagnóstico, realizado no Laboratório de Citogenética do Hospital Universitário-UFSC. Foram encaminhados para o estudo 63 pacientes, obtendo-se crescimento da cultura em 54, dos quais 12 (22,22%) apresentaram cariótipo anômalo. Foram detectadas alterações numéricas, estruturais e mosaicismos cromossômicos. Esta avaliação contribuiu para o diagnóstico clínico, e orientação dos familiares, demonstrando a importância do estudo citogenético, num hospital-escola, pois além do caráter assistencial possibilita a formação profissional dos alunos participantes.

Palavras-chave: genética clínica, citogenética, aberrações cromossômicas.

Introdução

A genética clínica vem adquirindo uma importância crescente na sociedade e nos sistemas de saúde pública em decorrência do desenvolvimento científico e tecnológico gerado nos últimos anos. Esta especialidade apresenta interface com diversas áreas clínicas (pediatria, endocrinologia, hematologia, ginecologia, obstetrícia, dermatologia, ortopedia, etc) e ciências básicas (biologia celular, biologia molecular, genética, embriologia, etc).

Atualmente os estudos citológicos, citogenéticos e moleculares possibilitam o diagnóstico preciso de um número crescente de condições, proporcionando uma maior precisão no diagnóstico e na orientação dos pacientes e seus familiares. A

demanda por estas avaliações vem tornando-se cada vez mais expressiva, no entanto sua disponibilização ainda é bastante limitada.

O estudo citogenético é uma das metodologias mais tradicionais em genética humana, utilizada para a detecção de alterações cromossômicas numéricas e estruturais. Os distúrbios cromossômicos constituem uma categoria importante de doenças genéticas, respondendo por uma grande proporção significativa dos insucessos reprodutivos, malformações congênitas e retardo mental (GARDNER & SUTHERLAND, 1996). O estudo cromossômico também é importante para a caracterização de indivíduos portadores de doenças gênicas associadas à predisposição ao desenvolvimento tumoral e diagnóstico pré-natal de cromossomopatias (TRASK, 2002).

Estima-se que as anomalias cromossômicas atingem no mínimo 7,5% de todas as concepções, no entanto, a maior parte destes conceitos são abortados espontaneamente. A frequência de aberrações cromossômicas em abortos está ao redor de 50% e entre os nativos é de 0,6% (CONNOR & FERGUSON-SMITH, 1991).

As malformações congênitas e as doenças genéticas estão incluídas entre as principais causas de mortalidade infantil nos países da América Latina. Contudo, grande parte dos governos estaduais e federais não tem dado a devida atenção, em parte porque os principais problemas de saúde responsáveis pela morbidade e mortalidade infantil possuem origem sócio-econômica e ambiental (OPS, 1984).

O Hospital Universitário da UFSC é o único serviço público do estado de Santa Catarina que possui um atendimento especializado em genética clínica, contando com profissionais adequadamente capacitados.

O presente trabalho teve como objetivo a análise citogenética de pacientes encaminhados ao Laboratório de Citogenética do HU-UFSC. Apresentamos os resultados obtidos no ano de 2002.

Material e Métodos

Casuística

Os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Citogenética do HU-UFSC provenientes do ambulatório de genética, centro obstétrico (natimortos e fetos

mortos), neonatologia, pediatria, serviço de endocrinologia, Hospital Regional de São José e do projeto ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênicas).

Obtenção de Metáfases

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa. Nos natimortos e fetos mortos, foi colhido sangue do cordão umbilical e/ou realizada punção intra-cardíaca.

O estudo foi realizado a partir de culturas temporárias de linfócitos de sangue periférico. Os linfócitos em cultura foram estimulados com fitohemaglutinina segundo modificação da técnica de MOORHEAD *et al.*, (1960).

Estudo Citogenético

Nas culturas que apresentaram crescimento, o cariótipo foi determinado pela análise ao microscópio óptico através de coloração convencional e das técnicas de bandas G e bandas C. Esta análise foi complementada pela avaliação de bandas R, bandas Q e bandas NOR, buscando caracterizar melhor as alterações e polimorfismos detectados (ROONEY, 2001). Foram analisadas no mínimo 11 células de cada pacientes, ampliando-se esta análise, quando necessário.

Após a conclusão do estudo citogenético, os resultados foram entregues aos pacientes e/ou familiares durante consulta médica no ambulatório de genética do HU-UFSC, ocasião em que os mesmos foram esclarecidos do diagnóstico e receberam aconselhamento genético.

Resultados e Análise

No período de janeiro a dezembro de 2002, foram encaminhados para estudo citogenético 63 pacientes, e o estudo foi concluído em 54 pacientes, dos quais 42 apresentaram cariótipo normal, 12 pacientes apresentaram cariótipo anômalo (22%), em 9 casos a análise citogenética não foi possível.

Dos 63 pacientes avaliados (ver quadro 1), 39 foram encaminhados pelo ambulatório de genética, 6 recém-nascidos portadores de malformações congênicas encaminhados através do ECLAMC, 6 pacientes foram encaminhados por outros setores do HU, e 12 natimortos /ou fetos mortos encaminhados pelo centro-obstétrico. As culturas apresentaram crescimento

satisfatório e foram obtidas metáfases suficientes e com qualidade para análise em 54 (85%) dos 63 pacientes, os insucessos na obtenção de metáfases foram registrados em 2 dos (5%) pacientes encaminhados pelo ambulatório de genética, 1 dos 6 (16,6%) pacientes encaminhado por outros setores do HU (pediatria) e em 6 dos 12 natimortos/ou fetos mortos (50%). Nos recém-nascidos encaminhados através do ECLAMC não houve falha na obtenção de metáfases para análise. O insucesso na obtenção de metáfases ocorre por vários fatores, entre eles coleta não adequada das amostras de sangue periférico, demora entre a coleta e envio de sangue para o laboratório, ausência de células viáveis no material coletado, ou mesmo acidentes no processamento do material no laboratório. O alto insucesso na obtenção de culturas observado entre os fetos mortos e natimortos é provavelmente em decorrência da pouca viabilidade do material coletado.

Foram detectados 12 indivíduos com cariótipo anômalo, sendo observadas 8 alterações numéricas e quatro estruturais, 4 aneuploidias sob forma universal (2 cariótipos 47,XY+21, um cariótipo 45,X e outro com constituição 47,XXY), 3 aneuploidias em mosaico (46,XY/47,XY+21 ; 46,XX/47,XXX; 46,XY/47,XY,+?), e 1 euploidia em mosaico (46,XX/92,XXXX).

As alterações estruturais em 3 pacientes envolveram o cromossomo X, sendo uma universal com cariótipo 46,XiX, e duas em mosaico com cariótipo 45,X/46,XiX e 45,X/46,X+anel. Uma única alteração estrutural envolvendo cromossomo autossomo foi detectada, uma monossomia parcial do cromossomo 15 (46,XX, del15q).

Estas alterações demonstram uma preponderância de cariótipos compatíveis com a síndrome de Down (3 casos) e com a síndrome de Turner (4 casos), as alterações cromossômicas mais frequentes na população.

Os pacientes I-02-32 e I-02-46 apresentaram trissomia livre do cromossomo 21, na forma universal. O paciente I-01-44 apresentou mosaicismo somático com duas linhagens celulares, uma com constituição cromossômica normal (97% das células) e outra com trissomia do cromossomo 21 (3% das células).

Das anomalias dos cromossomos sexuais compatíveis com a síndrome de Turner (ST). Apenas o paciente I-02-64 apresentou o cariótipo clássico (45,X) de ST. Outros dois pacientes apresentaram mosaicismo somático com duas linhagens celulares. No paciente I-02-54, 88,3% das células apresentaram monossomia X e 11,7% apresentaram um cromossomo em anel não identificado, além da presença de um cromossomo X normal. No caso I-02-61 foi evidenciada

a presença de um isocromossomo X em 81% das células, e as demais células com monossomia do cromossomo X. O paciente I-02-67 apresentou isocromossomo X em todas as células. O isocromossomo é a alteração estrutural mais freqüente dos cromossomos sexuais, tanto na forma universal como em mosaico, ocorrendo em cerca de 10-15% das mulheres com ST (Simpson & Rajkovic, 1999).

Alteração na constituição do complemento sexual também foi observada no paciente III-02-31, que apresentou cariótipo 47,XXY, compatível com a síndrome de Klinefelter (SK).

O paciente II-02-05 apresentou duas linhagens celulares, uma delas normal, com constituição 46,XX (15%) e outra com constituição 47,XXX (85%). A trissomia do cromossomo X usualmente não apresenta repercussão fenotípica, em virtude da inativação do cromossomo supranumerário. A detecção de mosaicismo para esta trissomia em portador de malformação congênita constitui uma observação pouco usual, podendo ser decorrente de desvios da inativação do X e da distribuição do mosaicismo nos tecidos (Santos et al., 2000).

A monossomia parcial do cromossomo 15 decorrente de uma deleção intersticial na região compreendida entre as bandas q13-q21 foi verificada no paciente II-02-10. Na literatura existem poucos relatos de pacientes com deleção intersticial do cromossomo 15, a maior parte dos quais relacionados às síndromes de Prader-Willi e Angelman. Neste paciente a monossomia não envolve a região crítica para estas síndromes e estudos através de técnicas que permitam precisar a região envolvida e caracterizar a relação cariótipo/fenótipo são necessários. Os pais apresentaram cariótipo normal (casos I-02-20 e I-02-21 - tabela 1), sugerindo que essa alteração ocorreu durante a gametogênese. O estudo da segregação dos polimorfismos do cromossomo 15 poderia identificar em qual dos progenitores ocorreu o erro meiótico.

O cariótipo 46,XX/92,XXXX foi identificado num recém-nascido (IV-02-06), que apresentou uma malformação congênita extremamente rara (*ectopia cordis*), falecendo algumas horas após o nascimento.

No paciente II-02-19, portador de focomelia, o estudo visou realizar o diagnóstico diferencial da Síndrome de Roberts, condição que apresenta separação prematura no centrômero. Esta alteração não foi encontrada, no entanto, em uma das células analisadas estava presente um cromossomo acrocêntrico extra não identificado.

O paciente IV-02-18 apresentou cariótipo normal, no entanto foi verificada desespiralização da heterocromatina constitutiva. Como esta criança não apresentou

malformações e a mãe era portadora de epilepsia, concluímos tratar-se de uma modificação induzida pelos medicamentos utilizados pela mãe, sem consequências fenotípicas.

Em outros 4 pacientes foram observados polimorfismos da heterocromatina constitutiva. O significado clínico dos polimorfismos cromossômicos é bastante discutido. Enquanto alguns autores consideram os mesmos sem expressão fenotípica, outros questionam se sua associação com determinadas condições clínicas é de fato casual (DOVIGO,2001). Nos demais pacientes o cariótipo foi normal e compatível com o sexo.

Quadro 1: Dados referentes ao sexo, idade, cariótipo e indicação clínica dos pacientes encaminhados para estudo citogenético.

Registro	Idade	Encaminhamento	Indicação	Resultado
I-01-44	6a2m	AG	RM	46,XY(97%)/ 47,XY,+21(3%)
I-01-47	23a	AG	aborto de repetição (esposa I-01-48)	46,XX inv9qh
I-01-48	29a	AG	aborto de repetição (esposo I-01-47)	46,XY
I-01-49	9m	AG	dismorfologia	46,XX
I-01-50	1a1m	AG	Síndrome de Turner	46,XX
I-01-51	26a	AG	dismorfologia/RM	46,XY
I-02-13	29a	AG	3 abortos/ irmão com S.Down	46,XX,inv9qh
I-02-14	25a	AG	amenorréia secundária	46,XX
I-02-15	36a	AG	2 abortos	46,XX
I-02-16	3a4m	AG	holoprosencefalia	46,XX,16qh+
I-02-20	27a	AG	mãe de portador de aberração cromossômica (210)	46,XX
I-02-21	>20a	AG	pai de portador de aberração cromossômica (210)	46,XY
I-02-25	31 ^a	AG	aborto de repetição	46,XX
I-02-26	6a	AG	RM	46,XY

I-02-27-267	9a	AG	baixa estatura/estigmas de síndrome de Turner	46,XiX
I-02-28	16a	AG	dismorfologia /duplo Y?	46,XY
I-02-29	29a	AG	mãe de portador de aberração cromossômica (205)	46,XX
I-02-32	<1m	AG	Síndrome de Down	47,XY,+21
I-02-33	12a	AG	RM	46,XY
I-02-35	34a	AG	aborto de repetição (esposa 236)	46,XX
I-02-36	35a	AG	aborto de repetição (marido 235)	46,XY
I-02-38	3a	AG	retinopatia e microcefalia	46,XX
I-02-40	41a	AG	Dismorfologia cromossomopatia na família	46,XX,inv9qh
I-02-42	2a	AG	RDNPM	46,XX
I-02-43	4a	AG	RM	46,XX
I-02-44	1a7m	AG	microcefalia	46,XX
I-02-45	32a	AG	RM, baixa estatura	46,XY
I-02-46	2m	AG	Síndrome de Down	47,XY,+21
I-02-47	28a	AG	mãe de portador de aberração cromossômica (t 21;21)	46,XX
I-02-49	2a9m	AG	baixa estatura a esclarecer	46,XX
I-02-52	14a	AG	RDNPM	46,XY
I-02-53	23a	AG	útero hipoplásico	46,XX
I-02-54	12a	AG	Síndrome de Turner	45,X/46X+anel
I-02-55	11a	AG	RM	não cresceu
I-02-57	23a	AG	*	não cresceu
I-02-58	1m	AG	esquizencefalia	46,XY
I-02-59	31a	AG	ginecomastia	46,XY
I-02-61	17a	AG	Síndrome de Turner	45,X/46,XiX
I-02-64	25a	AG	Síndrome de Turner	45,X
II-02-05	RN	ECLAMC-HU	dismorfologia/hipotonia	46,XX (15%)/ 47,XXX (85%)

II-02-10-212-239	RN	ECLAMC - HU	malformações	46,XX,del15
II-02-11	RN	ECLAMC - HU	agenesia renal	46,XY
II-02-19	RN	ECLAMC - CD	focomelia	46,XY/47,XY,+?
II-02-48-250	RN	ECLAMC - HU	hipotonia severa/miopatia	46,XY
II-02-60	RN	ECLAMC - HU	hipertonia/calcificação cérebro	46,XX
III-02-04	87d	neonatologia	dismorfologia	46,XX
III-02-08	3a	pediatria	Retardo mental/ dismorfologia/ Suspeita de instabilidade cromossômica	Material insuficiente
III-02-22	*	pediatria	dismorfologia	46,XY
III-02-31	*	endocrinologia	hipogonadismo	47,XXY
III-02-56	13a11m	pediatria	RM/obesidade/amenorréia	46,XX
III-02-69	49a	HRSJ	seminoma/ genitália ambígua	46,XY
IV-01-46		CO	NM	46,XY
IV-02-01		CO	NM	não cresceu
IV-02-03		CO	aborto	46,XX
IV-02-06		CO	NM/ <i>ectopia cordis</i>	46,XX(96%)/ 92,XXXX(4%)
IV-02-07		CO	FM	46,XX
IV-02-09		CO	FM	não cresceu
IV-02-17		CO	FM	não cresceu
IV-02-18		CO	FM	46,XX
IV-02-23		CO	NM/distrofia miotônica	não cresceu
IV-02-30		CO	FM	não cresceu

IV-02-37		CO	NM	46,XY
IV-02-41		CO	FM	não cresceu

Legenda do Quadro 1:

(a) anos, (m) meses, (*) não informado, (RN) recém-nascido, (RM) retardo mental, (RDNPM) retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, (NM) natimorto, (FM) feto morto, (HU) Hospital Universitário, (AG) ambulatório de genética, (ECLAMC) Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas, (CO) centro obstétrico,(CD) Maternidade Carmela Dutra,(HRSJ) Hospital Regional de São José.

Conclusão

A frequência de aberrações cromossômicas detectada nos pacientes encaminhados ao Laboratório de Citogenética do Hospital Universitário foi de 22%, inferiores aquelas encontradas por SANTOS et al (2000), e DOVIGO (2001) , 32,9% e 37,9 % respectivamente, em abordagens similares realizadas em pacientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto do Rio de Janeiro (RJ) e pelo Laboratório de Citogenética Humana da Unicamp em Campinas (SP).

O predomínio das aberrações numéricas sobre as estruturais também é verificado na literatura, consolidando as aneuploidias como a forma mais comum e significativa, em termos clínicos , de distúrbios cromossômicos humanos (NUSSBAUM et al.,2002).

O diagnóstico preciso destas condições é fundamental para a orientação clínica adequada dos afetados e informações aos familiares a respeito do risco de recorrência nos familiares.

Este trabalho mostra a incidência destas alterações na população atendida no Hospital Universitário da UFSC, não sendo encontradas na literatura estudos similares realizados na população de Santa Catarina. A alta frequência de anomalias nesta população demonstra o encaminhamento correto por parte dos clínicos e reflete a necessidade de expansão desta atividade, salientando a importância da interação clínico-laboratorial.

O desenvolvimento deste projeto proporcionou aos alunos, bolsistas e voluntários, um treinamento que incluiu diversas metodologias laboratoriais e análise e classificação dos cromossomos metafásicos ao microscópio para obtenção dos cariótipos, permitindo um aprendizado circunstanciado no contexto assistencial, contribuindo para sua formação

profissional. Em vista da originalidade da casuística avaliada, também contribuiu para a formação científica, pois alguns resultados constituem novos conhecimentos.

Desta forma foram contempladas as atividades de ensino, pesquisa e extensão, contribuindo para a formação profissional dos alunos participantes e proporcionando à comunidade um serviço assistencial diferenciado.

Referências

COONOR, J.M. & Ferguson-Smith, M.A.: **Essential Medical Genetics**. 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, London. ., 1991.

DOVIGO, J.R.D.: **Análise da casuística não oncológica do laboratório de genética humana do Departamento de Genética Médica FCM-UNICAMP (1970-1999)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.83pp. .,2001.

GARDNER, R.J.M & Sutherland, G.R.: Pregnancy loss and infertility. In: **Chromosome abnormalities and genetic counseling**, ed Oxford University Press. Oxford,p.311-331., 1996.

MOORHEAD, P.S., Nowell, P.C., Mellmann, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A., 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. **Exp.Cell Res.**20:613-616.

ORGANIZATION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS): **Prevención y control de las enfermedades genéticas y los defectos congénitos**. Publicación Científica N° 460, Washington, D.C. , 1984

ROONEY, D.E.: **Human Cytogenetics, constitutional analysis. A practical approach**. 3rd ed. Oxford University Press, 2001.

SANTOS, C.B.; Boy, R.T.; Santos, J.M.; Silva, M.P.S.; Pimentel, M.M.G.: Chromosomal investigations in patients with mental retardation and/or congenital malformations. **Genet. Mol. Biol.** (23): 703-707, 2000.

SIMPSON, J.L., Rajkovic,A.: Ovarian differentiation and gonadal failure. **Am. J. Med Genet.** (89):186-200,1999.

TRASK, B.J.: Human Cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. **Nature R. Genet.** (3):769-778, 2002.