

INVESTIGAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM PACIENTES COM MALFORMAÇÕES CONGÊNTAS E/OU PROBLEMAS REPRODUTIVOS

Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho*
Maria Betânia Pereira Toralles**

RESUMO: *A avaliação cromossômica em sangue periférico foi realizada a partir da cultura de linfócitos estimulados com Fitohemaglutinina e posterior bandamento GTG. As principais indicações para realização do exame foram: malformações congênitas, suspeita de síndrome de Down, retardo de crescimento e/ou desenvolvimento, falhas reprodutivas e desenvolvimento sexual anormal. O presente estuda avalia a freqüência de alterações cromossômicas em pacientes com risco aumentado para cromossomopatias. Foram estudados 804 casos no período de 3 anos, compreendido entre abril de 2001 e abril de 2004. As alterações cromossômicas estavam presentes em 13,5% dos pacientes. A síndrome de Down foi a trissomia mais freqüente, tendo sido encontrados casos com translocações robertsonianas, o que reforça a importância da avaliação citogenética também nestes pacientes. As alterações gonossômicas foram a segunda mais freqüente, tendo sido encontradas várias formas cariotípicas da síndrome de Turner. As alterações estruturais desequilibradas estavam presentes em 8,26% dos casos alterados, todos manifestando malformações congênitas e/ou retardo mental, enquanto as translocações equilibradas foram encontradas, principalmente em indivíduos com filhos malformados ou com dificuldades para conceber. A avaliação citogenética deve ser realizada em pacientes com malformações congênitas e/ou problemas reprodutivo.*

Palavras-chave: Cromossomo; Malformações congênitas; Sangue periférico

INTRODUÇÃO

Cerca de 5% dos nascidos vivos apresentam defeito congênito, considerado como “toda anomalia funcional ou estrutural do desenvolvimento embrionário devido a fatores originados antes do nascimento, sejam genéticos, ambientais ou desconhecidos, mesmo quando o defeito não seja aparente no recém-nascido e só se manifeste clinicamente mais tarde” (OMS, 1984). Nesta população, a freqüência de aberrações cromossômicas é de 0,6%. Das síndromes malformativas, as doenças cromossômicas são as que apresentam maior facilidade diagnóstica, já que podem ser confirmadas por um exame de laboratório. O estudo cromossômico (cariótipo) deverá ser feito pelo menos em todos os recém-nascidos nos quais se reconheçam malformações associadas sem etiologia conhecida (BRUNONI, 1981, 1985, 1986).

A infertilidade compreende a incapacidade de realizar a concepção ou manter a gestação até o nascimento. Diversas causas podem estar envolvidas neste processo, podendo ser devido a fatores masculinos, femininos ou a ambos. As alterações cromossômicas afetam pelo menos 7,5% de todos os conceptos, muitos dos quais são abortados espontaneamente (CONNOR & FERGUSON-SMITH, 1991). Cerca de 60% das perdas gestacionais do primeiro trimestre têm cariótipo anômalo, sendo que esta porcentagem cai para 25% no segundo trimestre e para 6% no terceiro trimestre (BOUÉ, et al., 1975).

* Bióloga, Mestre em Genética/UNIFESP. E-mail: acaciafc@ucsal.br.

** Médica, Doutora em Genética/UFBA. E-mail: toralles@uol.com.br.



A análise cromossômica em sangue periférico é importante no diagnóstico da infertilidade, particularmente no homem azoospermico ou severamente oligospermico que apresentam cerca de 12% de cariótipo anormal. Alterações dos cromossomos sexuais incluem XXY e XXY/XY no homem e síndrome de Turner e suas variantes cromossômicas na mulher. Rearranjos complexos, cromossomos em anel, inversões, translocações robertsonianas, translocações entre os cromossomos sexuais e autossomos podem estar envolvidos no processo de infertilidade (GARDNER & SUTHERLAND, 1996).

A incidência de aberrações cromossômicas entre casais inférteis, tanto no homem quanto na mulher, é bastante elevada se comparada à incidência da população geral (HENS et. al., 1988).

O presente estudo avalia a frequência de alterações cromossômicas em pacientes com malformações congênitas, retardo de crescimento, desenvolvimento sexual anormal e problemas reprodutivos.

Realizamos análise citogenética em cultura de linfócitos estimulado com fitohemaglutinina, usando técnicas padronizadas (MOORHEAD et. al., 1960). O cariótipo foi determinado em todos os pacientes por bandamento GTG (CASPERSSON et. al., 1970) e foi utilizada a nomenclatura recomendada pelo *International System of Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 1995).

MATERIAL E MÉTODOS

Foi verificada a frequência de alterações cromossômicas no período de 3 anos, compreendido entre abril de 2001 e abril de 2004. Os pacientes foram atendidos em diversas Clínicas particulares e Hospitais da rede pública e privada da cidade de Salvador, interior da Bahia, região Metropolitana de Salvador e uma minoria de outros estados do Nordeste, como Alagoas, Sergipe e Pernambuco. Neste período, foram encaminhados para o DNA – Medicina Laboratorial Genética e Biologia Molecular, Salvador/Bahia - 804 amostras de sangue periférico para cariotipagem, colhidas em seringa BD previamente heparinizada, juntamente com os dados clínicos dos pacientes. As análises citogenéticas foram realizadas a partir de cultura de linfócitos estimulados com fitohemaglutinina e posterior bandamento GTG. Foram analisadas rotineiramente 15 metáfases, sendo que, em casos suspeitos de mosaicismo cromossômico, eram analisadas de 30 a 50 células, a depender da alteração envolvida. As metáfases foram fotografadas em todos os casos, utilizando o sistema de imagem Leica CW4000. Nos casos em que foram detectados cromossomos derivados ou cromossomos extras foi solicitado cariotipagem dos pais.

A amostra consiste de 804 pacientes com retardo mental e/ou malformações congênitas, retardo de crescimento, desenvolvimento sexual anormal, problemas de infertilidade e/ou história de abortamento, previamente identificados pelos médicos como apresentando risco para cromossomopatias.

RESULTADOS

As anormalidades cromossômicas foram encontradas em 109 pacientes (13,5%), dos quais 55 (50,4%) possuíam trissomias dos cromossomos autossomos, prevalecendo a síndrome de Down (83,6%), seguida da síndrome de Edward (trissomia 18) e síndrome de Patau (trissomia 13), enquanto as aneuploidias dos cromossomos sexuais estavam presentes em 29 pacientes (26,6%), sendo a síndrome de Turner (cariótipo 45,X e variantes) a mais frequente (55,1%), seguida da síndrome de Klinefelter (cariótipo 47,XXY), encontrada em 34,4% dos pacientes com alterações gonossômicas. As translocações equilibradas foram encontradas em 14 casos (12,8%),



e um deles envolvia o cromossomo X. Nove pacientes demonstraram alterações estruturais desequilibradas (8,2%), além de um caso com inversão do cromossomo 7 e outro com um isocromossomo de braço curto de 18 (tabela 1).

As principais indicações encontradas na amostra estudada foram malformações congênitas 49,9% (incluindo os casos com suspeita de Down, retardo de crescimento e/ou desenvolvimento e autismo), problemas reprodutivos 34,2% (casais com história de abortamento e dificuldades para conceber), desenvolvimento sexual anormal 8,4%, e outras indicações de menor frequência 7,5% (consangüinidade, filho com alteração cromossômica ou malformado, translocação equilibrada em um dos genitores). Em 30 casos não foi possível obter a indicação.

Tabela 1 – Resultados citogenéticos alterados de 109 pacientes encaminhados para o DNA – Medicina Laboratorial Genética e Biologia Molecular – demonstrando as anormalidades e respectivas frequências.

<i>Anormalidade Cromossômica</i>	<i>Cariótipo</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Porcentagem</i>	
Alterações Autossômicas				
Síndrome de Down	47,XX,+21 ou 47,XY,+21	44		
	46,XY,der(21;21)(q10;q10) + 21	1		
	46,XY,der(14;21)(q10;q10) + 21	1	46	(83,63%)
Síndrome de Edward	47,XX,+18 ou 47,XY,+18	5		
Síndrome de Patau	47,XX,+13 ou 47,XY,+13	3		
	46,XX,+13,der(13;13)(q10;q10)	1		
		55	50,46%	
Alterações dos cromossomos sexuais				
Síndrome de Turner	45,X	4		
	45,X/46,XX	4		
	45,X/46,del(X),(p21)	1		
	45,X/46,del(X),(p10)	1		
	46,X,del(X)(q21)	1		
	45,X/46,X,i(X)(q10)	1		
	46,X,i(X)(q10)	2		
	45,X/46,X,r(X)	2	16	(55,17%)
Síndrome de Noonan	45,X/46,XY	1		
Síndrome de Klinefelter	47,XXY	10	10	(34,48%)
Mosaicismo com três ou mais linhagens celulares	47,XXX/48,XXXX/46,XX	1		
	45,X/47,XXX/48,XXX,+mar/46,XX	1		
		29	26,60%	
Alterações estruturais desequilibradas				
Cromossomo derivado	46,XX,der(4)t(4;16)(qter;q21)mat	1		
Síndrome de “Cri-du-chat”	46,XY,der(5)t(5;15)(p10;q10)mat	1		
Trissomia 5p	46,XX,der(15)t(5;15)(p10;q10)mat	2		
Deleções	46,XX,del(18)(q22→qter)	1		
	46,XX,del(18)(p11)	1		
Material extra não identificado	46,XY,add(21)(qter)	1		
	46,XY,add(11)(qter)	1		
Cromossomo em anel	46,XX,r(13)(p13q33 or q34)	1	9	8,26%
Inversões	46,XX,ins(7)(q32;p12p21)	1	1	0,92%
Cromossomos extras numerários				
Isocromossomo	47,XX,i(18)(p10)	1	1	0,92%
Alterações estruturais equilibradas (translocações)				
Autossomo/autossomo	45,XX,t(13;14)(q10;q10)	1		
	45,XY,t(13;14)(q10;q10)	1		
	45,XX,t(13;14)(q32;q24)	1		
	46,XX,t(4;16)(qter;q21)	1		
	46,XX,t(5;15)(p10;q10)	3		
	46,XY,t(3;10)(p26;q12)	1		
	46,XX,t(1;20)(q41;p12)	1		
	46,XX,t(12;13)(p10;q22)	1		
	46,XX,t(3;13)(p10;q10)	2		
	46,XY,t(1;7)(p10;q10)	1		
X/autossomo	46,X,t(X;10)(p22;q25)	1	14	12,84%
		Total	109	100%

DISCUSSÃO

As frequências de alterações cromossômicas, encontradas em diversos estudos, depende do critério de seleção dos pacientes. Aberrações cromossômicas respondem por 10 a 30% dos casos de retardo mental (GRIPENBERG et al., 1980). Santos et al. (2000) registraram uma prevalência de 26% de alterações cromossômicas em pacientes com malformações congênitas e/ou retardo mental, enquanto o presente estudo demonstrou uma taxa de 13,5% de cromossomopatias. Esta diferença se deve às características amostrais de cada trabalho. Nossos pacientes apresentavam malformações congênitas estruturais em 49,9% dos casos, sendo totalidade nos pacientes de Santos (2000). Um estudo realizado por Mahfouz et al.(2001), no qual os pacientes foram encaminhados por falhas reprodutivas (33%), malformações congênitas estruturais (14,1%) suspeita de síndrome de Down (9,6%), atraso de desenvolvimento (11,3%), desenvolvimento sexual anormal (8,16%) e outras categorias com menor frequência, apresentou 16% de cromossomopatias, mais próximo do encontrado no presente estudo (13,5%).

Alterações autossômicas

A síndrome de Down é o distúrbio cromossômico mais comum e mais bem conhecido, sendo a causa genética mais frequente de retardo mental moderado. Cerca de 1800 crianças nascem afetadas por esta síndrome e, entre crianças nativas ou fetos de mães com idade de 35 anos ou mais, a incidência é ainda maior (MILUNSKY, 1999). Na amostra analisada, a síndrome de Down representou 83% de todas as trissomias autossômicas, sendo encontrados 3 cariótipos não usuais apresentando translocações robertsonianas, estas presentes em cerca de 4% dos casos de síndrome de Down (THOMPSON & WILLARD, 2002). Nestes casos, faz-se necessária a cariotipagem dos pais para posterior aconselhamento genético.

Alterações gonossômicas

As aneuploidias dos cromossomos sexuais, X e Y, estão entre os mais comuns de todos os distúrbios genéticos humanos com uma prevalência de 1400 a 500 nascimentos, sendo o tipo trissômico mais comum (XXY, XXX, XYY). Foram encontrados 10 cariótipos 47,XXY. Em contraste, a monossomia X é a alteração gonossômica menos comum em nativos, sendo encontrada com mais frequência em aborto espontâneo. Foram observados 4 cariótipos 45,X. No entanto os mosaicismos gonossômicos são mais frequentes do que os mosaicismos autossômicos. Estavam presentes 12 casos de mosaicismos. O isocromossomo de braço longo do cromossomos X, que representa 15% dos casos de síndrome de Turner, visto na forma completa e mosaico (Milunsky, 1999), estava presente em 3/16 casos de Turner.

Alterações estruturais equilibradas

Rearranjos entre autossomos

As anomalias da estrutura cromossômica não são excepcionais. Na população geral, um, em cada 300 indivíduos, é portador de uma alteração estrutural equilibrada (BOUÉ, 1981). Os rearranjos cromossômicos, quando citogeneticamente equilibrados, via de regra não levam a nenhum efeito fenotípico, o que faz com que indivíduos considerados normais não se percebam do fato, vindo a tomar conhecimento somente após gerar um filho com uma anomalia cromossômica estrutural desequilibrada ou após várias tentativas frustradas de gravidez (THOMPSON & WILLARD, 1991). Nos casos encontrados, no presente estudo (tabela 1), as translocações (13;14) (3;10) (1;20) envolviam casais com história de abortamento, as



translocações envolvendo os cromossomos (4;16) (5;15) e (3;13) foram detectadas após o nascimento de progênie com malformações congênitas, enquanto as translocações (1;7) e (12;13) estavam presentes em crianças com atraso de desenvolvimento.

Rearranjos entre X e autossomo

Este tipo de rearranjo difere dos rearranjos autossômicos, devido ao processo de inativação do cromossomo X. Existe uma tendência a anormalidades físicas e falhas reprodutivas em portadores deste tipo de rearranjo balanceado (SCHINZEL, 1984). No presente estudo, encontramos uma adolescente com t(X;10), que apresenta retardo mental e alteração no desenvolvimento sexual. O fenótipo é resultado de uma deleção autossômica funcional, envolvendo o cromossomo 10 (tabela 1), em consequência da inativação do X aleatória.

Alterações estruturais desequilibradas

Casais nos quais um dos membros é portador de uma translocação equilibrada têm risco mais elevado de gerar filhos cromossomicamente anormais. O risco para translocação desequilibrada é de 10,2% e para translocação equilibrada é de 37,3% (CARON, TIHY, DELLAIRE, 1999). No presente estudo, encontramos 4 pacientes com malformações congênitas, apresentando cromossomos derivados, resultado de translocações equilibradas em um dos genitores (tabela 1). Os cromossomos envolvidos foram (4;16) e (5;15).

Dois recém-nascidos malformados, que faleceram logo após o nascimento, apresentavam material adicional extra nos cromossomos 21 e 11. O cariótipo dos pais foi realizado apenas no caso do derivado do cromossomo 21, os quais apresentaram cariótipos normais. A análise citogenética clássica não foi suficiente para determinar a origem do material extra, sendo necessário a realização de técnicas moleculares.

O isocromossomo de 18 já foi descrito em mais de duas dúzias de casos em pacientes com malformações e distúrbios neurológicos (SCHINZEL, 1984). A correlação cariótipo-fenótipo da paciente, descrita na tabela 1, condiz com os dados da literatura científica.

A avaliação citogenética deve ser realizada quando houver suspeita de síndromes genéticas e/ou história de infertilidade conjugal. Na literatura, assim como no presente trabalho, está claro o envolvimento das cromossomopatias na etiologia destas patologias. O diagnóstico citogenético é importante para avaliação de riscos de ocorrência e recorrência, funcionando como ferramenta indispensável a um Aconselhamento Genético preciso e eficiente, tanto no nível Pré-natal, quanto no de Reprodução Assistida.

REFERÊNCIAS

BOUÉ, A. – Antenatal diagnosis of chromosomal disorders. Presented on the Sixth International Congress of Human Genetics. Jerusalém, 1981.

BOUÉ, J.; BOUÉ A.; LAZAR, R. The epidemiology of human spontaneous abortions with chromosomal anomalies. In *Aging gametes*. Ed. by R.J. Blandau, Basel, pp 330-348, 1975.

BRUNONI, D. – Anomalias congênitas: conceito e conduta. *In RN*. Segre CAM; Armellini P., pp 64-67, Sarvier, 1985.

BRUNONI, D. – Gravidez e RN de Alto Risco. *Alto Risco Genético. Aspectos Neonatais*. Ped. Mod. XXI (8):447-515, 1986.

BRUNONI, D. – Os estados intersexuais na infância. *Clin. Pediat.* 5:8-24, 1981.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. – Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 60: 315-319, 1970.

CONNOR, J.M. & FERGUSON-SMITH, M.A. – *Essential Medical Genetics*. 3rd edn. Blackwell Scientific Publications, London.

CARON, L.; TIHY, F.; DELLAIRE, L. – Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: over 20 years of cytogenetic analyses in on laboratory. *Am. J. Med. Genet.*, 82: 149-54, 1999).

GARDNER, R.J.M.; SUTHERLAND, G.R.; - *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 2a. Ed. Oxford University Press, 1996.

GRIPENBERG, U.; HONGELL, K.; KUUTILA, S. – A chromosome survey of 1062 mentally retarded patients; evolution of a long-term study at the Rinnekoti Institution. Finland. *Hereditas*. 92:223-228, 1980.

HENS, L.; BONDUELLE, M.; LIEBAERS, I.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. – Chromosome aberrations in 500 couples referred for in vitro fertilization or related fertility treatment. *Hum. Reprod.*, 3:451-457, 1988.

ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. F. Mitelman. ed., S. Karger Publishers, Inc., Basel, 1995.

MAHFOUZ, R.; AL-OREIBI, G.; DARWICHE, N.; EL-KHECHEN, S.; ZAHED, L. Constitutional abnormalities among patients referred for blood karyotype analysis: a 5-year study at the AUBMC. *J med Liban*; 49(1): 6-12, 2001.

MILUNSKY, A. – *Genetic Disorders and the Fetus; Diagnosis, Prevention, and Treatment*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D. – chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20: 613-616, 1960.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Prevenção e controle de Enfermidades Genéticas e Defeitos Congênitos*. Publicação Científica n° 460, 1984.

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. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (4) 703-707, 2000.

SCHINZEL, A. – *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*. Walter de Gruyter, 1984.

THOMPSON, M.W., McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. – *Genética Médica* 6th edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

