

CITOGENÉTICA MÉDICA I: ESTUDOS NOS AUTOSSOMOS

Bernardo Erdtmann *

Margarete Suñé Mattevi **

SINOPSE: Rápida revisão sobre as técnicas empregadas no estudo dos cromossomos humanos, dando ênfase ao significado dessas investigações. Descrição dos cromossomos humanos, apresentando a notação atualmente em uso e as aberrações observadas, as principais síndromes patológicas devidas a distúrbios autossômicos, e aos achados citogenéticos em abortos e neoplasias. Algumas considerações sobre os estudos citogenéticos realizados no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1. INTRODUÇÃO

No ano de 1956 Tjio e Levan, na Suécia, e Ford e Hamerton, na Inglaterra, publicaram os resultados dos estudos que realizaram em cultivos de fibroblastos e de medula óssea, comprovando em definitivo que o número cromossômico na espécie humana era de 46, ao invés de 48 como até então se pensava. Eviden-

ciaram, também, serem os complementos sexuais do tipo XX na mulher e XY no homem. Desfez-se, assim, um erro que por dezenas de anos resistiu ao esforço persistente que os citologistas envidaram neste campo. Apesar dos resultados negativos, devidos principalmente a problemas de ordem técnica, grande foi o número de trabalhos que tentaram decifrar tanto o número como a morfologia dos cromossomos humanos. Estas dificuldades foram superadas graças, principalmente, ao emprêgo conjugado de quatro inovações:

a) Cultivo de células «in vitro», que permite ao citologista obter um índice muito maior de divisões celulares.

b) Pré-tratamento com Colchicina, substância que, quando usada em baixas concentrações, tem a propriedade de interromper as divisões mitóticas em metáfase, estágio ideal para a observação dos cromossomos.

c) Pré-tratamento com solução hipotônica que, devido ao fenômeno

* Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), realizando pós-graduação no Departamento de Genética do Inst. de Biociências, UFRGS.

** Professora Assistente do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, UFRGS. Mestre em Genética pela UFRGS.

da osmose, proporciona uma boa dispersão dos cromossomos dentro das células.

d) O método de secagem ao ar (air dried) para o espalhamento das células na lâmina.

A partir de 1959, quando foram identificadas as primeiras síndromes de etiologia cromossômica, este tipo de estudo começou a ser usado cada vez mais amplamente no campo da medicina. Desde que a frequência de anomalias cromossômicas foi estimada em 0.92% em recém-nascidos do sexo feminino e em 0.88% nos do sexo masculino (Court Brown, 1967) e com a descoberta de que em certos tipos de aberrações, como as translocações balanceadas, o risco de recorrência é extremamente alto, o exame citogenético passou a ser uma técnica quase que de rotina em centros hospitalares da Europa e EUA. Neste rápido apanhado sobre a citogenética médica pretendemos, além do aspecto informativo, acrescentar alguns dados sobre o que se faz e o que pode ser feito em nosso meio neste campo de investigação e sua utilidade como instrumento auxiliar na medicina aplicada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Uma vez que os cromossomos humanos podem ser individualizados e analisados com a devida precisão apenas em metáfase, necessita-se de um bom número de divisões celulares para se poder realizar um estudo dos mesmos. Os métodos de obtenção do material podem ser reunidos em dois grupos:

2.1 Preparações diretas

2.2 Cultivo de células «in vitro»

2.1 Preparações Diretas

O método da preparação direta só é possível de ser realizado em tecidos que apresentam grande número de divisões celulares, como, por exemplo, a medula óssea, testículos, ou tumores malignos de crescimento intenso. Este método, em si mais rápido e fácil, é menos empregado do que o cultivo, devido à dificuldade de se obter material e porque a coleta representa um maior trauma para o paciente. Contudo, para casos especiais, quando se deseja informações que reflitam com maior fidelidade o que ocorre no núcleo das células em estado natural, como por exemplo na leucemia e tumores malignos, ou a identificação de um possível mosaico testicular, utiliza-se este método. Uma descrição detalhada do mesmo pode ser encontrada em Egozcue (1971).

2.2 Cultivo de Célula «in vitro»

Os tecidos mais usados para o estudo dos cromossomos, por serem fáceis de cultivar «in vitro», são o sangue e a pele. As culturas de sangue são mais amplamente utilizadas do que as da pele por requererem menor tempo de incubação e por ser o sangue um material de mais fácil obtenção. As células que entram em mitose são os linfócitos e podem ser obtidos por duas técnicas:

a) as *macro-cluturas*, nas quais coleta-se aproximadamente 10 ml de sangue, do qual, após sedimentação

ou centrifugação, retiram-se os linfócitos junto com a camada superficial de leucócitos. O soro do indivíduo geralmente é misturado com outros meios de cultura, tais como soro fetal bovino e o TC199. Este método, além de necessitar de 10 ml de sangue, requer uma série de manipulações que são eliminadas nas b) **micro-culturas**. Os métodos de micro-culturas foram desenvolvidos inicialmente por Edwards e Young (1961), e Edwards (1962), e têm como maior vantagem o emprêgo de apenas 1-5 gotas de sangue total, sem pré-tratamento. Faremos abaixo um rápido apanhado sobre o material empregado para o cultivo de células do sangue, para depois descrevermos o método de micro-cultura de leucócitos por nós empregado, e que tem dado bons resultados.

Materiais para o Cultivo de Leucócitos

São essenciais para o cultivo, além da vidraria e outro aparelhamento técnico sobre o qual não nos deteremos, os produtos abaixo especificados:

Soro Protêico: Como meio de cultura as células necessitam de soro contendo, pelo menos, um nível de 10% de proteínas. Pode ser usado desde o soro do próprio indivíduo do qual se quer cultivar as células, de outra pessoa que não apresente incompatibilidade, ou até de outros mamíferos. É muito empregado o soro bovino fetal, que é de mais fácil obtenção e baixo custo em relação ao soro humano. Pode-se usar, tam-

bém, uma mistura de ambos. Já existem, meios de cultura disponíveis comercialmente, como por exemplo o TC199.

Antibióticos: O uso de antibióticos se faz necessário devido à facilidade com que os meios de cultura se contaminam, tanto devido às manipulações, como pelo próprio material que os compõe. Além disto, sem a proteção imunológica do organismo, as células nos tubos de cultura são muito mais susceptíveis às infecções. Normalmente usa-se apenas Penicilina e Estreptomicina ou Neomicina. A Tetraciclina e Kanamicina são usadas para evitar infecções de vírus e o Micostatin para combater infecções de fungos.

Heparina: Para as culturas de sangue é preciso usar um anticoagulante, sendo a Heparina a mais recomendada. Na micro-técnica a Heparina é acrescentada ao meio de cultura, sendo suficientes concentrações muito baixas, uma vez que são empregadas apenas 2-3 gotas de sangue. Pode-se, também, usar uma seringa heparinizada no caso de macro-culturas.

Agente Mitogênico: Os linfócitos em seu estado normal não se dividem, daí a necessidade de se induzir artificialmente as mitoses. Nowell (1960) foi o primeiro a evidenciar a propriedade mitogênica da fitohemaglutinina (PHA), uma proteína que é extraída do feijão (*Phaseolus vulgaris*) e que age, também, como aglutinógeno diferencial dos eritrócitos. Posteriormente, esta proprieda-

de mitogênica foi encontrada em outros antígenos (Hirschorn, 1963), tendo sido evidenciado que esta característica está correlacionada com fenômenos imunológicos.

Solução Hipotônica: Hsu (1952) observou, fortuitamente, que usando uma solução hipotônica antes de fixar as células, estas aumentavam de volume, permitindo uma melhor dispersão dos cromossomos na placa metafásica. Este método é hoje vastamente empregado, utilizando-se os mais diversos tipos de soluções hipotônicas. Há, além disto, soluções que causam efeitos característicos, como, por exemplo, a desespiralização dos cromossomos (Ohnuki, 1968), a melhor evidênciação das constrições secundárias (Hsu e Somers, 1961) e outras.

Fixadores: Relacionamos apenas alguns dos mais usados:

- a) Fixador de Carnoy: metanol com ácido acético, na proporção de 3:1.
- b) Ácido acético a 50%, ou a 60%.
- c) Etanol/ácido acético/clorofórmio, nas seguintes proporções:

Etanol absoluto:	45 ml
Ac. acético glacial:	15 ml
Clorofórmio:	1 ml

Corantes: Qualquer corante específico do núcleo pode ser usado para a coloração dos cromossomos. Citaremos alguns dos mais empregados:

- a) Orceína acética a 2%, é talvez a mais usada especialmente quando se trabalha com microscopia de contraste de fase.

- b) Giemsa a 10%, Azul de Toluidina a 1% e Feulgen, dependendo do tipo de estudo que se deseja realizar.

Micro-técnica para Cultura de Leucócitos

Descreveremos a técnica empregada em nosso Laboratório, a qual mantém basicamente os princípios estabelecidos por outros autores:

- 1) São empregados os tubos de cultura (5 ml) para micro-técnica da Grand Island Biological Company (Grande Island, New York 14072), que contém soro bovino fetal, heparina, antibióticos e fitohemoaglutina.
- 2) Cerca de 0,5 ml de sangue é coletado em condições de máxima assepsia, desinfetando-se a pele com éter, mertiolate e álcool.
- 3) Pingam-se 2-3 gotas no tubo de cultura, homogeneizando-se, a seguir, o meio.
- 4) Conserva-se a cultura, a 37°C, durante 3 dias.
- 5) Com 66-70 hs de cultivo, acrescenta-se 0,05 ml de uma solução de Colcemid 1 molar, deixando-se duas horas na estufa.
- 6) A seguir, passa-se a cultura para um tubo de centrifuga, centrifugando-se a 800 rpm/5 minutos.
- 7) Retira-se o sobrenadante, deixando-se 1 ml.
- 8) Choque hipotônico: Acrescentam-se 4 ml de água bidestilada, homogeneizando-se bem a solução. Deixar por 10 minutos a 37°C.

- 9) Centrifuga-se a 750 rpm/5 minutos, retirando-se a seguir todo o sobrenadante.
- 10) Fixação: Acrescentam-se 4 ml de fixador Carnoy, sem ressuspender as células. Deixa-se durante 24 horas a 4°C.
- 11) Ressuspendem-se as células, centrifuga-se, retira-se todo o sobrenadante e coloca-se novo fixador (0,5 a 1 ml).
- 12) Técnica de secagem ao ar: Pingam-se 3-5 gotas da suspensão de células sobre lâminas frias (1° — 4°C) e úmidas. Retira-se o excesso de água, nas bordas, com papel de filtro. Seca-se lentamente ao calor de uma chama de álcool.
- 13) Coloração: Colocam-se as lâminas secas em orceína acética a 2%, deixando-se de 2 a 2,30 hs. Convém filtrar a solução de orceína antes de usá-la.
- 14) Desidratação: Colocam-se as lâminas de 3-5 minutos em álcool 95° e de 1-2 minutos em álcool 100°.
- 15) Montagem: Monta-se a lâmina com uma pequena gota de Euparal. Pode-se também usar o Bálsamo de Canadá, utilizando-se, neste caso, xilol na desidratação e após álcool 100°. Este último apresenta o inconveniente de descorar o material a longo prazo.
- 16) Secagem: Para apressar a secagem do Euparal ou do Bálsamo, deixam-se as lâminas em estufa a 50°C, durante pelo menos 2 dias. Temperaturas mais elevadas produzem bolhas entre a lâmina e a lâminula.

O estudo ao microscópio geralmente consiste na contagem de 20 células por indivíduo, e a análise é feita através de fotografias, pareando-se de 3-5 células por linhagem.

3. IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMAS HUMANOS

3.1 Morfologia e Classificação

Os 44 autossomos são agrupados em pares de homólogos e numerados de 1 a 22, sendo que o par sexual é identificado à parte, pelas letras X e Y. De acordo com a posição de seus centrômeros, os cromossomos são classificados em: a) **metacêntricos** quando o centrômero ocupa uma posição intermediária (por exemplo, o primeiro par do grupo A, figuras 1 e 2); b) **submetacêntricos** quando o centrômero aproxima-se de uma das extremidades, dividindo, então, o cromossomo em braços curto e longo (ver, como exemplo, os cromossomos do grupo B, figuras 1 e 2); e, por último, c) **acrocêntricos**, quando o centrômero está colocado quase terminalmente (como no caso do grupo D, figuras 1 e 2). Os cromossomos são classificados, em ordem decrescente de tamanho e pela posição de seus centrômeros, em sete grupos, designados por letras de A a G (figuras 1 e 2), denominando-se de **cariótipo** ao conjunto dos autossomos e dos cromossomos sexuais. Temos assim:

Grupo A — pares 1-3: Os maiores cromossomos, com centrômeros aproximadamente medianos.

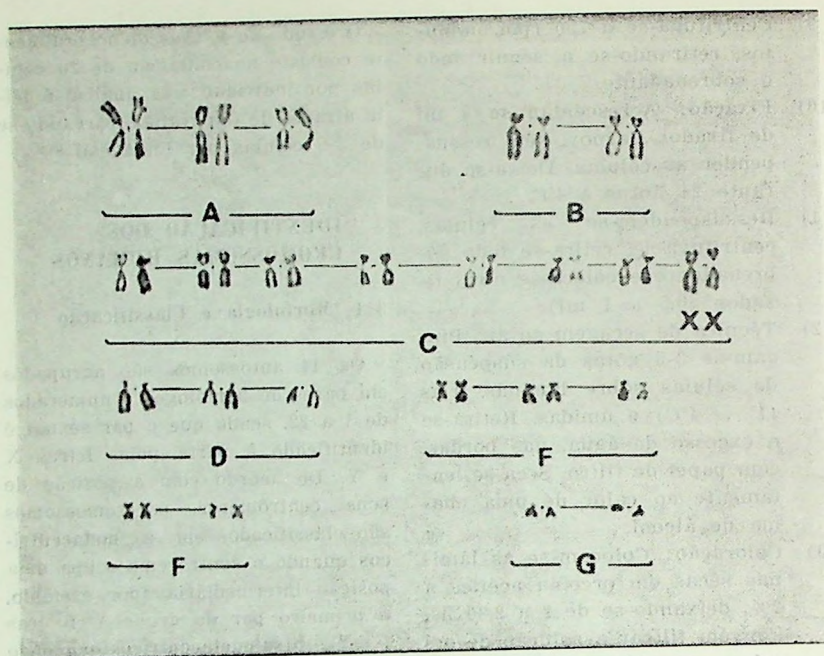


Figura 1 — Cariótipo feminino normal (46,XX)

Grupo B — pares 4-5: Cromossomos grandes, com centrômeros sub-medianos.

Grupo C — pares 6-12 e X: Cromossomos de tamanho médio com centrômeros sub-medianos. O cromossomo X pertence a este grupo, sendo um dos maiores e com o centrômero mais central.

Grupo D — pares 13-15: Cromossomos de tamanho médio com centrômeros quase terminais (acro-cêntricos). Frequentemente apresentam satélites que consistem numa pequena porção terminal do cromossomo ligada ao mesmo por uma constricção.

Grupo E — pares 16-18: Cromossomos relativamente pequenos, com centrômeros quase medianos (par 16) ou sub-medianos (pares 17/18).

Grupo F — pares 19-20: Cromossomos pequenos, com centrômeros quase medianos.

Grupo G — pares 21-22 e Y: Acrocêntricos pequenos, apresentando os pares 21 e 22, geralmente, satélites. O Y é um dos maiores deste grupo, não possui satélites e costuma manter paralelos os braços longos.

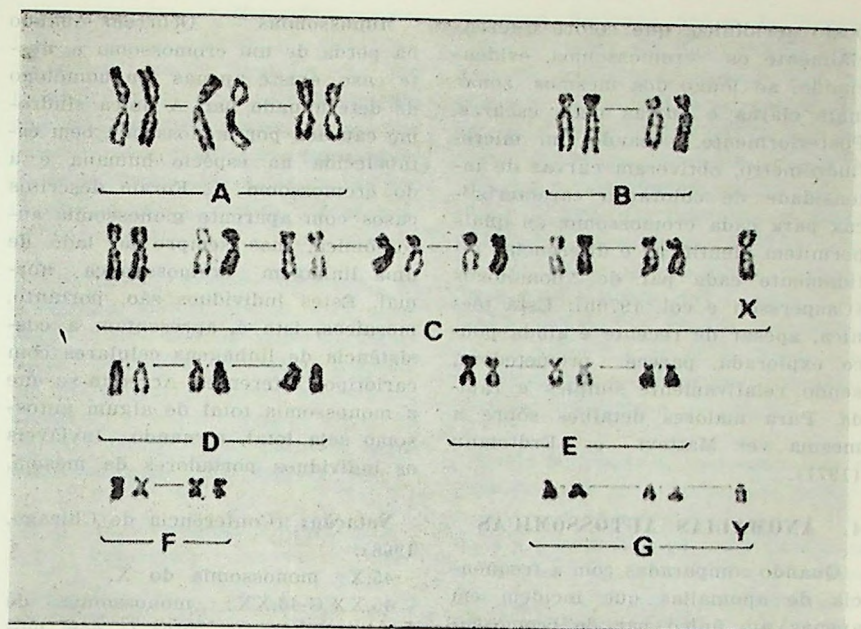


Figura 2 — Cariótipo masculino normal (46,XY)

3.2 Métodos Auxiliares para Identificação dos Cromossomos

Auto-radiografia: Este método é usado para a identificação dos cromossomos humanos, principalmente para diferenciar aqueles pares de um determinado grupo que apresentam semelhança morfológica muito grande. Consiste basicamente em acrescentar à cultura certa quantidade de nucleotídeo de timidina, precursor do DNA, contendo H^3 , que é radioativo. Este precursor, incorporado ao DNA do cromossomo, pode ser detectado colocando-se um filme sobre a lâmina, preparada pelo mé-

todo anteriormente descrito. Para a identificação dos homólogos, usa-se, além do critério morfológico, contar o número de grãos de H^3 incorporados em cada cromossomo. O método da auto-radiografia, contudo, é relativamente trabalhoso e demorado, devido ao tempo necessário para revelação, não sendo, por isso, usado como rotina em Citogenética Médica. Entretanto, para casos específicos ou de análise complicada, esta técnica pode ser de valia.

Coloração Fluorescente: Caspersen e col. (1968) descreveram o método de coloração fluorescente feita com quinacrina mustarda, um com-

posto acridínico, que colore diferencialmente os cromossomos, evidenciando, ao longo dos mesmos, zonas mais claras e outras mais escuras. Posteriormente, usando um microfluorômetro, obtiveram curvas de intensidade de coloração características para cada cromossomo, as quais permitem identificar e diferenciar nitidamente cada par de homólogos (Caspersson e col. 1970b). Esta técnica, apesar de recente e ainda pouco explorada, parece prometedora, sendo relativamente simples e rápida. Para maiores detalhes sobre a mesma ver Mattevi e Erdtmann (1971).

4. ANOMALIAS AUTOSSÔMICAS

Quando comparadas com a frequência de anomalias que incidem em apenas um único par de cromossomos, o par sexual (0,36% em recém-nascidos, Court Brown, 1967), são relativamente poucas as aberrações que ocorrem nos 22 pares de autossomos (0,64%, Court Brown, 1967). Estudos feitos em abortos têm sugerido ser este fato devido, provavelmente, à maior letalidade ocasionada pelas anomalias autossômicas, tornando altamente inviáveis os zigotos portadores das mesmas. As aberrações que têm sido detectadas na homem podem ser classificadas em:

- 4.1 numéricas
- 4.2 estruturais

4.1 Aberrações Numéricas

Aneuploidias: Consistem na perda ou ganho de um ou de alguns cromossomos e subdividem-se em:

Monossomias — Ocorrem quando há perda de um cromossomo e, neste caso, existe apenas um homólogo de determinado par. A única síndrome causada por monossomia bem estabelecida na espécie humana é a do cromossomo X. Foram descritos casos com aparente monossomia autossômica, mas sempre ao lado de uma linhagem cromossômica normal. Estes indivíduos são, portanto, **mosaicos**, isto é, apresentam a coexistência de linhagens celulares com cariótipos diferentes. Acredita-se que a monossomia total de algum autossomo seja letal, tornando inviáveis os indivíduos portadores da mesma.

Notação: (Conferência de Chicago, 1966).

45,X: monossomia do X.

45,XX,C-46,XX: monossomia de um autossomo do grupo C, com mosaicismo.

Trissomias: consistem no ganho de um cromossomo, resultando três homólogos em um mesmo par. As trissomias são, talvez, as aberrações autossômicas mais frequentes descritas na espécie humana, estando, entre elas, as síndromes que descreveremos mais adiante:

trissomia do par 21 (Síndrome de Down),

trissomia do par 18 (Síndrome de Edwards),

trissomia do grupo D₁ (Síndrome de Patau).

Notação dos exemplos acima citados:

47,XX,21+ ou 47,XX,G+

47,XY,18+ ou 47,XY,E₁+

47,XX,D₁+

Tetrassomia e polisomia: consistem no ganho de dois ou mais cromossomos, respectivamente, de um mesmo par. Somente a primeira foi descrita nos autossomos, apenas em casos raros e, todos eles, apresentando mosaicismo. Entretanto ambas são observadas com relativa frequência no par sexual.

Aneuploidia dupla: consiste na ocorrência simultânea de duas alterações numéricas em pares de homólogos diferentes. As mais frequentes são as que envolvem um par autossômico e o par sexual, embora também tenham sido descritos casos restritos apenas aos autossomos.

4.1.1 As Trissomias: Síndromes Principais

Síndrome de Down (Trissomia do 21)

Apesar da impropriedade do termo Mongolismo na designação desta síndrome, tanto geneticistas como pediatras costumam usá-lo. Mais apropriada seria a denominação síndrome de Down, dada em homenagem a Langdon Down (1866) que foi o primeiro a tentar caracterizar esta entidade patológica. Inicialmente a mesma foi classificada como uma forma de idiotia ou cretinismo, devido ao retardo mental acentuado que estes pacientes costumam apresentar. A relação das características clínicas encontradas neste tipo de doentes é extensa, estando as mais frequentes relacionadas na tabela I.

Frequência e Sobrevivência: A frequência de indivíduos afetados com a síndrome de Down encontra-se ao redor de 1 em cada 600-700 recém-

nascidos. Segundo dados de Record e Smith (1955), 8% dos afetados morrem na primeira semana, 28% no primeiro mês e 55% no primeiro ano. Já Collmann e Stoller (1963), em estudos feitos na Austrália, observaram uma percentagem de morte em torno de 24% nos primeiros 6 meses e de 31% no primeiro ano de vida. Foi verificado que a maior mortalidade ocorre antes dos 5 anos e há outro período de grande mortalidade ao redor dos 40 anos. Nesta síndrome ambos os sexos parecem estar afetados na mesma proporção.

Idade Materna: É bem conhecida a existência de uma correlação positiva entre o aumento da idade materna e o nascimento de indivíduos com a síndrome de Down. Mães com menos de 30 anos tem uma probabilidade muito baixa (entre 0,5% a 0,7%) de terem filhos afetados. Já na faixa etária dos 30 até os 40 anos esta probabilidade aumenta numa percentagem de 1 até 1,5, estando ao redor dos 2% depois dos 40 anos.

Dados Citogenéticos: Lejeune e col. (1959) e Jacobs e col., (1959), independentemente, foram os primeiros a descobrir a etiologia cromossômica da síndrome, observando nas células dos indivíduos afetados a presença de um pequeno acrocêntrico adicional que, mais tarde, foi identificado como pertencente ao par 21. Embora a trissomia do 21 seja característica da síndrome de Down, foram também observados outros cariótipos, como, por exemplo, mosaicismos e translocações (ver alterações estruturais).

TABELA I

Características mais frequentes das principais síndromes de etiologia autossômica

Área afetada	Trissomia — 21*	Trissomia — 18*	Trissomia — D ₁ (13)*	Deleção — 5p —**
Geral	Hipotonia Deficiência mental	Morte antes de 6m. (89%) Polihidramnios Placenta reduzida Peso ao nascer reduzido Hipertonia	Morte antes de 3m. (69%) Hemangioma capilar	Choro semelhante ao miado do gato Retardo motor
Cabeça	Crânio : Olhos : Orelhas : Nariz : Boca : Pescoco:	Ocípital achatado Microftalmia Prega mongólica Prega epicântica Iris maculada Pequenas Hélices sup. anormais Hipoplasia do osso nasal Língua protuberante e fissurada Nuca larga e curta	Microcefalia Microftalmia Coloboma da íris Baixa implantação Hélices anormais Palato fendido Lábio leporino	Braquicefalia, microcefalia Hipertelorismo Prega epicântica Facies em lua cheia Baixa implantação Hipoplasia do osso nasal Micrognatismo Retrognatismo
Membros	Mãos : Pés :	Abdução defeituosa dos quadris Plexões anormais dos dedos Arco nos desenhos digitais Dorsiflexão do hálux Calcanhar proeminente Largo com esterno curto	Prega simiesca Polidactilia Unhas hiperconvexas	Prega simiesca
Tórax				
Sistemas:				
Cardiovascular :	Malformações diversas	Perfuração do septo ventricular Malformações renais Criptorquidismo	Malformações diversas	Malformações diversas
Renal e genital:	Pênis reduzido		Criptorquidismo Esacro anormal Útero bicornado parcial	
Digestivo :	Díscase do reto	Divertículo de Meckel		

* — Retirado de Bartalos e Baramkl (1967)

** — Retirado de Turpin e Lejeune (1965)

Síndrome de Edwards (Trissomia do 18)

Esta síndrome foi descrita pela primeira vez por Edwards e col. (1960) em um recém-nascido com malformações múltiplas, tendo sido estabelecida como a etiologia da mesma a ocorrência de uma trissomia do par 18. As malformações que ocorrem nos afetados, com freqüências superiores a 50%, encontram-se relacionadas na tabela I. Como pode ser observado nesta tabela, são típicas desta síndrome a ocorrência de alta percentagem de arcos nos desenhos digitais (6 ou mais), bem como as flexões muito rígidas dos dedos, características estas que incidem em 90% ou mais dos afetados, sendo, pois, indicadores bastante seguros no diagnóstico da síndrome.

Incidência e Sobrevivência: A incidência é muito baixa, permitindo apenas cálculos aproximados, que giram em torno de 1 em 4.000 a 5.000 nascimentos. A proporção de recém-nascidos do sexo feminino afetados é nitidamente superior, estando a relação ao redor de 3:1. Crê-se que isto se deva a uma maior sobrevivência durante a gestação, uma vez que, após o nascimento, a média de vida para o sexo feminino é de 9 meses e apenas de 2 meses para o sexo masculino.

Idade Materna: A idade média das mães de filhos com trissomia do 18 é superior à da população em geral (Conen e Erkman, 1968), havendo, portanto, uma maior probabilidade de nascerem filhos afetados à medida que aumenta a idade materna.

Dados Citogenéticos: É típica desta síndrome a trissomia do par cromossômico 18 (ver figura 3). Usa-se, por convenção, o termo trissomia- E_1 para diferenciá-la de outras entidades descritas no grupo E e que, no entanto, não constituem uma entidade clínica definida.

Síndrome de Patau (Trissomia D_1)

Patau e col. (1961) identificaram um cromossomo acrocêntrico de tamanho médio, pertencente ao grupo D, em excesso numa criança com malformações múltiplas. Desta maneira, foram os primeiros a determinar a etiologia desta entidade clínica, já definida como tal anteriormente. As malformações que os portadores da trissomia D_1 apresentam são graves e reduzem em muito sua viabilidade, estando as mais freqüentes relacionadas na tabela I.

Freqüência e Sobrevivência: É difícil fazer um cálculo exato da incidência desta trissomia em recém-nascidos, devido à baixa freqüência com que ocorre e à alta incidência de morte prematura que ocasiona. Cálculos aproximados indicam uma freqüência de 1.7.000 nascimentos. A vida média dos indivíduos portadores de trissomia D_1 está ao redor dos 3 meses, sendo uma das mais baixas quando comparada com a de outras síndromes cromossômicas. A proporção sexual, tanto ao nascer como entre os sobreviventes, parece não estar alterada; entretanto, as meninas apresentam vida média ligeiramente superior.

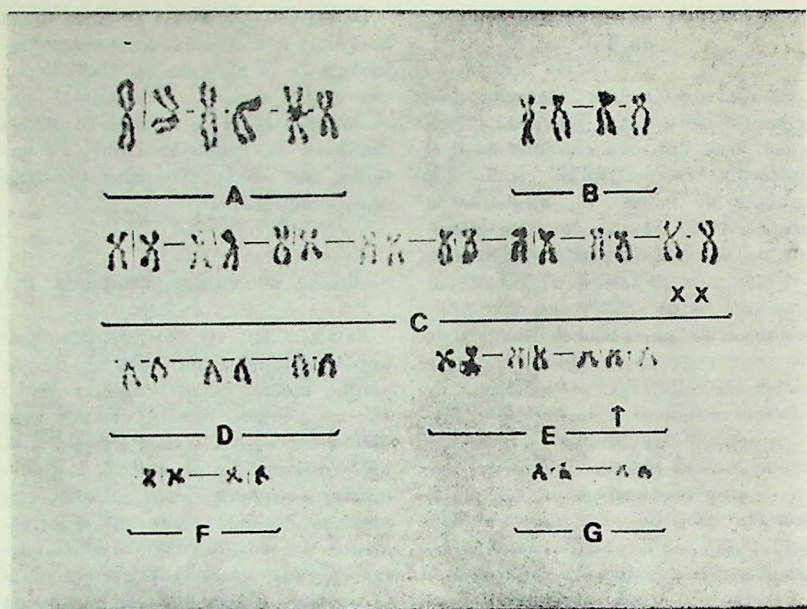


Figura 3 — Cariótipo apresentando trissomia do par 18, característica da síndrome de Edwards (47,XX,13+ dados não publicados de B. Erdtmann e A. Palombini).

Idade Materna: Inicialmente não se observou nenhuma correlação com a idade das mães e o aumento de nascimentos de crianças com trissomia do D_1 , contudo dados mais extensos revelaram uma maior probabilidade de mães com idade avançada terem filhos afetados, embora este fenômeno não seja tão acentuado como na síndrome de Down.

Dados Citogenéticos: É característica desta síndrome a trissomia de um cromossomo do grupo D (13-15).

Estudos auto-radiográficos demonstraram ser este cromossomo de incorporação tardia, dados estes que indicam pertencer o mesmo ao par 13. Devido ao fato de diversos autores terem descrito trissomias do grupo D em indivíduos que não apresentam as características patológicas da síndrome de Patau, convencionou-se denominar esta trissomia de D_1 , por ter sido a primeira a ser descrita neste grupo.

c) **Cromossomo em anel** — é um cromossomo cujas extremidades (telômeros) foram perdidos, seguindo-se a junção posterior das duas pontas livres. A formação dos cromossomos em anel implica sempre em perda de material cromossômico e, por isso, eles podem ser considerados como um caso especial de deleção. Este tipo de cromossomo é de ocorrência muito rara pois, devido à sua estrutura complicada, apresenta sérios problemas na divisão celular. As síndromes de «cri-du-chat», da deleção-18 ou da deleção-D₁, são muitas vezes devidas à presença de um cromossomo em anel. Sua **notação** é relativamente simples: é referido o cromossomo no qual ocorreu esta anomalia, seguido da letra r (ring). Exemplo: 46,XX,5 r = indivíduo com 46 cromossomos, sendo um dos cromossomos do par 5 em anel.

d) **Inversões** — são mudanças que ocorrem devido a duas quebras em uma parte do cromossomo, originando, como indica o nome, uma inversão na seqüência dos genes. As técnicas citogenéticas atualmente em uso só permitem detectar as inversões nas quais esteja envolvido o centrômero (pericêntricas) e que alterem a sua posição. Como somente são observadas as inversões pericêntricas, a **notação** sempre se refere às mesmas, como seja:

46,XY,inv(Dq+q—)

= inversão pericêntrica de um cromossomo do grupo D, em que o tamanho do braço curto está aumentando (p+) e o do braço longo está diminuindo (q—).

e) **Isocromossomos** — resultam da divisão transversal do centrômero, que origina dois cromossomos cujos braços são simétricos e imagens especulares um do outro. Isocromossomos do X e Y são os observados com mais freqüência na espécie humana. Os isocromossomos dos autosomos têm sido descritos raramente e, principalmente, em casos de abortos espontâneos. A **notação**: é feita pela identificação do cromossomo e do braço do qual originou-se o isocromossomo, seguida da letra i. Exemplo: 46,XXqi = isocromossomo do braço longo do X, cariótipo este encontrado em pessoas de sexo feminino com disgenesia gonadal.

4.2.1 Anomalias Estruturais: Principais Síndromes

Síndrome do «Cri-du-chat»

Esta síndrome é causada por uma perda parcial ou quase total do braço curto de um dos cromossomos do grupo B. Esta anomalia cromossômica foi detectada pela primeira vez por Lejeune e col. (1963) e por eles denominada de síndrome do «cri-du-chat» (devido à semelhança do choro da criança afetada, nos primeiros meses, com o miado do gato, anomalia originada por uma malformação da laringe). Esta entidade clínica ocasiona inúmeros estigmas, estando os mais comuns relacionados na tabela 1.

Dados Citogenéticos — Embora a anomalia cromossômica padrão nesta síndrome seja a perda do braço curto do 5, varia muito, de caso para

caso, o tamanho da parte perdida. Foram feitos estudos com a finalidade de evidenciar possíveis correlações entre a proporção do cromossomo perdido e a intensidade das características clínicas apresentadas pelos afetados (Miller e cols., 1969). Entretanto, não foi possível estabelecer-se uma correlação positiva entre os dois eventos. A síndrome parece ser sempre causada por uma deleção, pois Warburton e col. (1969) usando medidas de alta precisão em pacientes com a síndrome do «cri-du-chat» e cariótipos aparentemente normais, conseguiram evidenciar perdas muito diminutas no braço curto de um dos cromossomos do grupo B. Ocorrem, além disto, dificuldades adicionais na distinção dos cromossomos do par 4 e 5, dificuldades estas que são superadas pelo uso do método auto-radiográfico ou, então pelo emprego da coloração fluorescente com quinacrina mustarda. Convmencionou-se que o cromossomo que incorpora tardiamente a timidina tri-tiada, cuja deleção do braço curto é responsável pela síndrome do «cri-du-chat», seria o do par número 5. Foram também descritas deleções supostas do par 4, entretanto as características clínicas que os afetados apresentam não são bem definidas, sendo difícil sua diferenciação da síndrome do «cri-du-chat» (Falk, 1970).

Síndrome da Deleção do braço curto do cromossomo 18 (18p—)

São relativamente recentes as tentativas feitas para definir esta enti-

dade clínica como uma síndrome, pois é de ocorrência muito rara e, portanto, são poucos os casos descritos na literatura. Pfeiffer (1968) reuniu 14 casos, relatados na bibliografia, de deleções do braço curto do cromossomo 18 ou de cromossomos 18 em anel, verificando que os indivíduos afetados apresentam malformações bastante semelhantes entre si. Os pacientes com deleção do braço curto costumam apresentar retardo mental, epicaneto, hipertelorismo, palato ogival e/ou fendido e malformações no conduto auditivo, além de outras.

A idade média das mães não parece estar aumentada e não foram feitas estimativas da sobrevivência dos pacientes, sendo que a idade média daqueles examinados está ao redor dos 5 1/2 anos.

Síndrome da deleção do braço longo do cromossomo 13 (13q—)

Nesta síndrome, igualmente rara, são estudados em conjunto os indivíduos que apresentam deleções do braço longo do cromossomo 13 e aqueles em que este cromossomo está sob a forma de um anel, devido à estreita similaridade das malformações que apresentam. Allderdice e cols. (1969), num estudo retrospectivo da literatura, reuniram 23 casos, observando como características mais marcantes: microcefalia, trigonocefalia, incisivos superiores protuberantes, micrognatia, orelhas grandes e malformadas, osso nasal largo e proeminente e hipertelorismo com assimetria facial.

4.2 Cromossomos em Abortos

A ocorrência de abortos espontâneos é uma questão que tem preocupado médicos e pesquisadores desde os mais remotos tempos. A descoberta de que as aberrações cromossômicas ocasionam graves e múltiplas malformações congênitas levou os citogeneticistas a suspeitarem de que as mesmas seriam uma das causas de perda fetal, principalmente em casos de recorrência. As técnicas de análise cromossômica em abortos são mais elaboradas que a cultura de leucócitos, e foram inicialmente desenvolvidas por Lejeune e col. .. (1960). Apesar das dificuldades apresentadas em tais culturas (considera-se 50% um nível ótimo de sucesso), numerosos estudos já foram levados a efeito neste campo. As aberrações cromossômicas encontradas em abortos são bem mais frequentes do que as observadas ao nascer. Por exemplo, trissomias de grupo A e B, triploidias e tetraploidias, raríssimas em recém-nascidos, aparecem com relativa frequência em fetos abortados. Esta incidência varia muito entre os diversos estudos feitos, e a análise dos resultados obtidos por vários autores fornece uma frequência média de 27,9% (Bartalos e Baranki, 1967), extremamente alta quando comparada com a estimada em recém-nascidos. Carr (1965) lembra, também, que estes resultados devem ser uma subestimativa, pois a grande maioria dos abortos espontâneos ocorre nas primeiras semanas de gestação (Hertig e col., 1959), período no qual é mais difícil realizar estudos citogenéticos. A idade das

mães que abortam fetos com anomalias cromossômicas parece não ser superior à da população em geral, exceto no caso de abortos com trissomias. Por outro lado, Arakaki e Waxman (1970), realizando estudos cromossômicos em endométrios, encontraram quatro amostras que apresentaram anomalias, tanto nos endométrios como nos fetos. Este fato sugere a ocorrência de interações materno-fetais. Influências dos raios X e de certas drogas também já foram evidenciadas. Carr (1967) observou, por exemplo, anomalias cromossômicas em seis abortos, num total de oito estudados, cujas mães haviam tomado anticoncepcionais regularmente antes de concepção. São necessários, ainda, dados mais extensos para a avaliação exata dos efeitos e condições em que certas drogas podem prejudicar os cromossomos dos conceitos.

4.3 Cromossomos em Neoplasias

Embora hoje em dia prevaleça a idéia de que os tumores malignos sejam causados por agentes específicos, tais como vírus ou produtos químicos, estudos cromossômicos feitos nos mesmos têm revelado a presença de inúmeras anomalias.

Nos tumores sólidos tem se observado uma alta incidência de aberrações cromossômicas, que não apresentam um padrão constante, pois variam não apenas de tumor para tumor, mas também de uma célula para outra. Nestes tumores é comum ocorrerem, as chamadas formações clonais, as quais são linhagens celu-

lares com uma determinada característica cromossômica.

As neoplasias dos sistemas hematopoietico e linfático apresentam, em traços gerais, as mesmas características cromossômicas dos tumores sólidos. Nelas ocorre, no entanto, um fenômeno incomum aos outros tipos de câncer, que é a associação de determinada anomalia cromossômica com um tipo específico de tumor. Trata-se do cromossomo Philadelphia (Ph_1), encontrado na medula óssea e sangue periférico de pacientes com leucemia mielóide crônica. O cromossomo Ph_1 foi observado pela primeira vez por Nowell e Hungerford (1960), na Filadelfia, daí esta denominação. Este cromossomo é um acrocêntrico pequeno, menor que os do grupo G, ao qual pertence. Caspersson e cts. (1970a) analisando o mesmo através da microfluorometria, uma técnica por eles desenvolvida, identificam-no como sendo produto de uma deleção de um dos homólogos do par 22. O papel exato do cromossomo Ph_1 na leucemia mielóide crônica é ainda obscuro. Embora alguns pesquisadores atribuam ao mesmo uma função no desencadeamento da doença, parece mais aceitável a idéia de que ele seja um produto do processo patológico. Foi notado que este cromossomo aparece com maior frequência na medula óssea do que no sangue periférico dos pacientes, onde até pode estar ausente. Em cultivos «in vitro» o Ph_1 sofre, igualmente, uma seleção celular, podendo desaparecer completamente. Por este motivo, para a análise deste cromossomo, sempre aconselhável fazer preparações diretas da medula óssea.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As síndromes clínicas, acima descritas, com suas respectivas aberrações cromossômicas, são exemplos característicos de anomalias do material genético que produzem alterações no desenvolvimento ontogenético. Além destas, está se tentando delimitar várias outras síndromes, porém os dados não são ainda suficientes para que seja possível delineá-las com precisão. Fala-se, por exemplo, nas possíveis síndromes de deleção do cromossomo do par 4, ou então nas trissomias do grupo C, do grupo F, e na trissomia G_2 . Além destas, existem as ocorrências isoladas, que embora não possam dar grandes informações sob o ponto de vista clínico, fornecem novos dados para correlações cariótipo-fenótipo.

Os estudos citogenéticos são ainda pouco empregados em nosso meio. Isto é compreensível, uma vez que tais análises exigem, geralmente, pessoal altamente especializado e são de custo elevado. Apenas com relação aos cromossomos sexuais, somando-se as novas técnicas às já existentes, tornou-se fácil realizar o estudo numérico dos mesmos, tanto do X como do Y, em células da interfase. (Maiores detalhes em Mattevi e Erdtmann, 1971). Quanto aos estudos dos autossomos, permanecem as dificuldades técnicas. O Laboratório de Genética Humana do Departamento Genético do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do R. G. do Sul vem se dedicando, desde 1965, ao estudo cromossômico de indivíduos portadores de malformações congênitas. A filosofia que nor-

teia estas pesquisas não é a de realizar-se simples análises rotineiras, mas sim desenvolver investigações em que não interessa apenas o padrão cariótico de determinada pessoa, mas o relacionamento deste padrão com o desenvolvimento e características anatômicas e fisiológicas deste indivíduo e seus familiares. Neste sentido estamos realizando um trabalho com médicos e clínicos que, não só de Porto Alegre, como também do interior do Estado, se valem de nossa colaboração. Um exemplo do fruto desta colaboração pode ser verificado em Erdtmann e cols. (1971).

Mantemos um critério de seleção das pessoas para o estudo citogenético, devido a limitações de ordens diversas, algumas das quais já foram citadas. Estes critérios são os seguintes:

- 1) Ocorrência de malformações congênitas graves no paciente;
- 2) Não ser possível o enquadramento dessas malformações dentro de uma síndrome de etiologia conhecida; e
- 3) Quando se trata de suspeita de síndrome de etiologia cromossômica conhecida, somente se realiza o estudo para:
 - a) elucidar aspectos importantes para o diagnóstico; ou
 - b) aconselhamento genético.

RESUMO: São revisadas as técnicas usadas no estudo dos cromossomos humanos, dando ênfase à significância destas investigações. A descrição do cariótipo humano, segue-se informação sobre a nomenclatura padrão ora em uso e uma curta descrição das principais síndromes envolvendo distúrbios nos autossomos. Dados sobre os achados citogenéticos nos abortos e câncer são mencionados. Apresenta-se os pontos básicos da pesquisa em citogenética humana presentemente desenvolvida no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SUMMARY A review of the techniques used in the study of human chromosomes is given, stressing the significance of these investigations. The description of the human karyotype is followed by information about the standard nomenclature now in common usage and a short delineation of the main syndrome involving disturbances in the autosomes. Data about the cytogenetic findings in abortions and cancer are mentioned. The basic guidelines of the research in human cytogenetics presently being developed at the Genetics Department of the Federal University of Rio Grande do Sul are also presented.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 — ALLDERDICE, P. W. et alii. The 13q — deletion syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 21(5):499-512, 1969.
- 2 — ARAKAKI, David T. & WAXMAN, Sorrell H. Cytogenetics of spontaneous abortion; the chromosomes of decidua. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 107(8):1199-204, Aug. 15, 1970.

- 3 — BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. *Medical Cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. 419p.
- 4 — CARR, David H. Chromosomes after oral contraceptives. *The Lancet*, 2(7520):830-1, Oct. 14, 1967 [Letters to the editor]
- 5 — CARR, David H. Chromosome studies in spontaneous abortions. *Obstetrics and Gynecology*, 26(3):308-26, Sept. 1965.
- 6 — CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Experimental Cell Research*, 62(2/3):490-2, Oct. 1970.
- 7 — CASPERSSON, T. et alii. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research*, 49(1):219-22, Jan. 1968.
- 8 — CASPERSSON, T. et alii. Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Experimental Cell Research*, 63(1):238-40, Nov. 1970.
- 9 — CHICAGO Conference: Standardization in human cytogenetics. *Birth Defects: Original Article Series*, 2(2):1-21, Dec. 1966.
- 10 — COLLMANN, R. D. & STOLLER, A. A life table for mongols in Victoria, Australia. — *J. ment. Defic. Res.* 7, 53(1963), apud PFEIFFER, Rudolf Arthur. *Karyotyp und phänotyp der autosomalen chromosomenaberrationen beim menschen*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1968. p.260.
- 11 — CONEN, Patrick E. & ERKMAN, Bayzar. Frequency and occurrence of chromosomal syndromes. II. Etrisomy. *The American Journal of Human Genetics*, 18(4):387-98, July 1966.
- 12 — COURT BROW, W. M. *Human population cytogenetics*. Amsterdam, North-Holland, 1967. 107p.
- 13 — DOWN, J. L. Observations on an ethnic classification of idiots, *London Hosp. Clin. Lect. Res.* 3:259, 1866, apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «Chromosomal anomalies of group G21-22.» In: Id. *Medical Cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. cap. 17, p.294.
- 14 — EDWARDS, J. H. Chromosome analysis from capillary blood. *Cytogenetics*, 1:90, 1962, apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «Study of the human chromosomes.» In: Id. *Medical Cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. cap. 2, p.50.
- 15 — EDWARDS, J. H. & YOUNG, R. B. Chromosome analysis from small volumes of blood. *The Lancet*, 2(7192):48-9, July 1, 1961 [Letters to the editor]
- 16 — EDWARDS, J. H. et alii. A new trisomic syndrome. *The Lancet*, 1(7128):787-9, Apr. 9, 1960.
- 17 — EGOZCUE, Jose. *Técnicas en citogenética*. Barcelona, Espaxs, 1971. 144p.

- 18 — ERDTMANN, B. et alii. Klinefelter's Syndrome and G trisomy. *Journal of Medical Genetics*, 8:364, 1971.
- 19 — FALK, K. A Comparison of the syndromes associated with a partial deletion of the short arms of chromosomes 4 and 5. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 37(1):60-6, 1970.
- 20 — FORD, C. E. & HAMERTON, J. L. The chromosomes of man. *Nature*, 178(4541):1020-3, Nov. 10, 1956.
- 21 — HERTIG, A. T. et alii. Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility; a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics*, 23(1,p.2):202-11, Jan. 1959.
- 22 — HIRSCHHORN, Kurt et alii. Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science*, 142(3596):1185-7, Nov. 29, 1963.
- 23 — HSU, T. C. Mammalian Chromosomes in vitro. I. The karyotype of man. *The Journal of Heredity*, 43(4):167-72, July/Aug. 1952.
- 24 — HSU, T. C. & SOMERS, Carolyn E. Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47(3):396-403, March 1961.
- 25 — JACOBS, Patricia A. et alii. The Somatic chromosomes in monogolism. *The Lancet*, 1(7075):710, Apr. 4, 1959.
- 26 — LEJEUNE, J.; TURPIN, R.; GAUTIER, M. — 1960c. Etude des chromosomes somatiques humains. Technique de culture de fibroblastes «in vitro». *Rev. Franc. Et. Clin. Biol.* 5, 406-8, apud TURPIN, Raymond & LEJEUNE, Jérôme. *Les chromosomes humains (caryotype normal et variations pathologiques)*. Paris, Gauthier-Villars, 1965. p.477.
- 27 — LEJEUNE, J.; TURPIN, R.; GAUTIER, M. — 1959h. Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann. Génét. (Paris)*, 1, 41.9, apud TURPIN, Raymond & LEJEUNE, Jérôme. *Les chromosomes humains (caryotype normal et variations pathologiques)*. Paris, Gauthier-Villars, 1965. p.477.
- 28 — LEJEUNE, J.; LAFOURCADE, J.; BERGER, R.; VIALATTE, J.; BOESWILLWALD, M.; SERINGE, P. et TURBIN, R. — 1963b. Trois cas de délétion partielle du bras court d'un chromosome 5. *C. R. Acad. Sci.* 257, 3098-102, apud TURPIN, Raymond & LEJEUNE, Jérôme. *Les chromosomes humains (caryotype normal et variations pathologiques)*. Paris, Gauthier-Villars, 1965. p.477.

- 29 — MATTEVI, Margarete S. & ERDTMANN, Bernardo. *Genética Médica II: Os cromossomos sexuais e suas anomalias. Revista de Medicina ATM*, 6: 163-179, 1971.
- 30 — MILLER, D. A.; Warburton, Dorothy; MILLER, O. J. Clustering in deleted short-arm length among 25 cases with a Bp-chromosome. *Cytogenetics*, 8(2):109-16, 1969.
- 31 — NOWELL, P. C. — 1960a. Phytohaemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer res.*, 20, 462, apud TURPIN, Raymond & LEJEUNE, Jérôme. *Les chromosomes humains (caryotype normal et variations pathologiques)*, Paris, Gauthier-Villars, 1965. p.492.
- 32 — NOWELL, Peter C. & HUNGERFORD, David A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132 (3438):1497, Nov. 18, 1960 [Abstracts]
- 33 — OHNUKI, Yasushi. Structure of chromosomes. I. Morphological studies of the spiral structure of human somatic chromosomes. *Chromossoma*, 25(4):402-28, Dec. 1968.
- 34 — PATAU, K.; THERMAN, E.; SMITH, D. W. et MARS, R. I. de — 1961f. Trisomy for chromosome nº 18 in man. *Chromosome (Berl.)* 12, 280-5, apud TURPIN, Raymond & LEJEUNE, Jérôme. *Les chromosomes humains (caryotype normal et variations pathologiques)*. Paris, Gauthier-Villars, 1965. p.495.
- 35 — PFEIFFER, Rudolf Arthur. *Karyotyp und phänotyp der autosomalen chromosomenaberrationen beim menschen*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1968. 295p.
- 36 — RECORD, R. S. & SMITH, A. Incidence, mortality and sex distribution of mongoloid defectives. *Brit. J. prev. soc. Med.*, 9, 10 (1955), apud PFEIFFER, Rudolf Arthur. *Karyotyp und phänotyp der autosomalen chromosomenaberrationen beim menschen*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1968. p.285.
- 37 — TJIO, Joe Hin & LEVAN, Albert. The chromosome number of man. *Hereditas*, 42(1/2):1-6, 1956.
- 38 — TURPIN, Raymond & LEJEUNE, Jérôme. *Les chromosomes humains (caryotype normal et variations pathologiques)*. Paris, Gauthier-Villars, 1965. 535p.
- 39 — Warburton, Dorothy et alii. Detection of minute deletions in human karyotypes. *Cytogenetics*, 8(2):97-108, 1969.

Mostardeiro, 483 — 90000 — Pôrto Alegre — RS — Brasil.