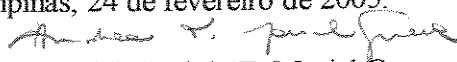


**“O diagnóstico de aberrações
cromossômicas estruturais:
aplicações da citogenética molecular
à resolução de casos indefinidos pelas
técnicas clássicas”**

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para
obtenção do título de Mestre em Ciências Médi-
cas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a)
Tânia Maria Vulcani de Freitas.

Campinas, 24 de fevereiro de 2005.


Prof(a). Dr(a). Andréa T. Maciel Guerra
Orientador(a)

Tânia Maria Vulcani de Freitas

Campinas

2005

i

U N I C A M P
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**“O diagnóstico de aberrações
cromossômicas estruturais:
aplicações da citogenética molecular
à resolução de casos indefinidos pelas
técnicas clássicas”**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Genética Médica.

Tânia Maria Vulcani de Freitas
Orientadora: Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra
FCM - UNICAMP

Campinas – SP
2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F884d Freitas, Tânia Maria Vulcani de
“ O diagnóstico de aberrações cromossômicas estruturais :
aplicações da citogenética molecular à resolução de casos indefinidos
pelas técnicas clássicas” / Tânia Maria Vulcani de Freitas. Campinas,
SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Andréa Trevas Maciel-Guerra
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Análise citogenética. 2. Citogenética. 3. Aberrações
cromossômicas. I. Maciel-Guerra, Andréa Trevas. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

DE BC
MADA UNICAMP
F884d
EX
BC/ 64576
6.P.00086.05
R
14.00
08/10/05
Bhd 359005

Banca examinadora da dissertação de Mestrado

Orientadora:

Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra (presidente)

Membros:

Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Profa. Dra. Maria Isabel Melaragno

**Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de
concentração Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 24/02/2005

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família: minha mãe, Ignez, meu irmão, Bruno, e ao meu grande amor, Renato que tanto me apoiaram e me ajudaram durante o período em que estive estudando.

In memoriam

Ao meu ídolo, meu pai, Luiz.

Agradecimentos

Agradeço:

Às Professoras: Dra Marlileila Varella Garcia (University of Colorado Health Sciences Center- Denver -EUA), Dra Sílvia Regina Caminada Toledo e Dra Maisa Yashimoto (Instituto de Oncologia Pediátrica – UNIFESP) pela atenção, pelos ensinamentos e pelo carinho.

À Profa Dra Andréa Trevas Maciel Guerra (Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP) pela confiança e pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos, realizando minhas pesquisas nos EUA.

À Profa Dra Christine Hackel (UNICAMP) pela amizade e pelo auxílio no contato com Profa Dra Marileila e pelas assistências concedidas no período em que estive fora.

Aos técnicos: Madalena (CBMEG- UNICAMP) e Erivaldo (Departamento de Microbiologia –UNICAMP) pela atenção e pela disposição em sempre me ajudar.

Ao meu grande amigo Tarsis Vieira (Mestrando em Ciências Médicas – FCM - UNICAMP) pela amizade e pela grande ajuda durante o período em que estive fora.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da UNICAMP: Henry, Jair, Jô, Nilma e Toninho, pelo aprendizado, pelas horas de descontração e pela grande ajuda dispensada no mês anterior a minha viagem. Do mesmo laboratório, agradeço com um carinho especial, meu grande amigo Daniel que sempre me ajudou nas horas mais difíceis e por quem tenho uma profunda admiração e respeito por sua determinação, garra e solidariedade.

À minha amiga Lucila (Mestranda em Ciências Médicas – FCM - UNICAMP) pela paciência, conforto nas horas difíceis e descontração.

À minha família: Ignez, Bruno e Renato pelo apoio e incentivo.

E à Deus por ter me dado forças e condições de seguir em frente com meus objetivos, e por ter colocado no meu caminho pessoas tão maravilhosas que se propuseram realizar alguns de meus maiores sonhos.

Sumário

I.	Introdução.....	12
I.1.	Anomalias cromossômicas.....	12
I.1.1	Definição e Classificação.....	12
I.1.1.1	Anomalias numéricas.....	12
I.1.1.2	Anomalias estruturais.....	13
I.1.2	Origem das anomalias.....	15
I.1.2.1	Anomalias numéricas.....	15
I.1.2.2	Anomalias estruturais.....	16
I.1.3.	Incidência das anomalias cromossômicas.....	22
I.2.	Fenótipos associados às anomalias cromossômicas.....	23
I.3.	Análise clássica do cariótipo humano.....	24
I.4.	Técnicas de citogenética molecular.....	25
I.4.1.	FISH.....	25
I.4.2	CGH.....	27
I.4.3.	SKY.....	27
I.5.	Indicações para análise cromossômica utilizando técnicas de citogenética molecular ...	28
I.6.	Importância de um diagnóstico rápido e preciso.....	29
II.	Objetivo.....	31
II.1.	Objetivo Geral.....	31
II.2.	Objetivos Específicos.....	31
III.	Material e Métodos.....	32
III.1.	Casuística.....	32
III.2	Métodos.....	34
III.2.1	FISH.....	34
III.2.1.1.	Grupo A.....	35
III.2.1.2.	Grupo B.....	35
III.2.1.3.	Grupo C.....	35
III.2.1.4.	Grupo D.....	36
III.2.2	CGH.....	37
III.2.3	SKY.....	37
IV.	Resultados.....	39
V.	Discussão.....	46
VI.	Conclusões.....	51
VII.	Referências bibliográficas.....	52
VIII.	Anexos.....	60

Lista de Abreviaturas

a	anos
add	adição
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> (Cromossomo Artificial Bacteriano)
BP	<i>Breakpoint</i> (Ponto de quebra)
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i> (Hibridação Genômica Comparativa)
CEN	centrômero
CMs	Cromossomos Marcadores
del	deleção
der	derivado
DNPM	Desenvolvimento Neuro-Psico-Motor
DU	Dissomia uniparental
dup	duplicação
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i> (Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência)
i	isocromossomo
ins	inserção
inv	inversão
ish	<i>in situ Hybridization</i> (Hibridação <i>in situ</i>)
LCH	Laboratório de Citogenética Humana
LCRs	<i>Low Copy Repeats</i> (Pequeno número de cópias repetidas)
mar	cromossomo marcador
mat	materno
Mb	Megabase
M-FISH	FISH Multicolor
PAC	<i>P1-derived Artificial Chromosome</i> (Cromossomo Artificial derivado-P1)
PBS	Solução tampão fosfato
pstk	aumento no comprimento do satélite no braço curto do cromossomo.
psu dic	pseudodicêntrico
r	anel
RCSWH	Região Crítica da Síndrome de Wolf-Hirschhorn
RDs	Recombinações Desiguais
RON	Região Organizadora de Nucléolo
SKY	<i>Spectral Karyotyping</i> (Cariotipagem Espectral)
SSC	Solução salina de citrato de sódio
SWH	Síndrome de Wolf-Hirschhorn
SWP/AS	Síndrome de Prader-Willi e/ou Angelman
t	translocação
tel	telômero
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i> (Cromossomo Artificial de Levedura)
WAGR	tumor de Wilms, Aniridia, anomalia Genito-urinárias e Retardo mental
WCPs	<i>Whole Chromosome Painting</i> ("pintura" de cromossomo inteiro)

Lista de Tabelas

Tabela 1	Descrição dos achados citogenéticos e das características clínicas dos pacientes incluídos no grupo A
Tabela 2	Descrição dos achados citogenéticos e das características clínicas dos pacientes incluídos no grupo B
Tabela 3	Descrição dos achados citogenéticos e das características clínicas dos pacientes incluídos no grupo C
Tabela 4	Descrição dos achados citogenéticos e das características clínicas dos pacientes incluídos no grupo D
Tabela 5	Resultados de análise por SKY
Tabela 6	Resultados de análise por FISH - sonda LSI SNRPN/ CEP 15
Tabela 7	Resultados de análise por FISH - sonda CEP 11
Tabela 8	Resultados de análise por FISH - sonda CEPX/ CEPY
1A	Análise de metáfases
1B	Análise de núcleos interfásicos
Tabela 9	Resultados de análise por FISH - sonda CEP8
2A	Análise de metáfases
2B	Análise de núcleos interfásicos
Tabela 10	Resultados de análise por FISH - sonda LSI WHS
3A	Análise de metáfases
3B	Análise de núcleos interfásicos
Tabela 11	Resultados de análise por FISH - sonda P60
4A	Análise de metáfases
Tabela 12	Resultados de análise por FISH - sonda FAT5
5A	Análise de metáfases
Tabela 13	Resumo dos resultados da avaliação citogenética molecular

Lista de figuras

- Figura 1** Anomalias estruturais equilibradas
- Figura 2** Anomalias estruturais desequilibradas
- Figura 3** Representação esquemática de recombinações desiguais entre seqüências de pequenos números de cópias repetidas LCRs
- Figura 4** Localização das LCRs
- Figura 5** Esquema de formação do inv dup (15) supranumerário, pseudodicêntrico e bissatelitado
- Figura 6** Mapa dos cosmídeos

Resumo

Este trabalho teve por objetivo demonstrar a aplicação das técnicas de citogenética molecular (FISH, CGH e SKY) na resolução de casos de anomalias estruturais e mixoploidias que não puderam ser solucionados pelas técnicas de citogenética clássica, e ainda de casos com suspeita de anomalias estruturais que não haviam sido comprovadas pelas mesmas técnicas. Para isso, foram estudados 23 pacientes pertencentes a 21 famílias, que foram divididos em quatro grupos de acordo com a técnica de citogenética molecular a ser utilizada para cada caso. A utilização das técnicas de citogenética molecular (FISH, CGH e/ou SKY) permitiu uma caracterização rápida e precisa ou, ao menos, uma interpretação mais aprofundada das aberrações cromossômicas estruturais em 10 dos 11 pacientes em que a citogenética clássica não havia sido suficiente para a correta definição dos segmentos cromossômicos envolvidos, devido à falta de um padrão de bandas coerentes e reconhecíveis. Além disso, permitiu a detecção de deleções sub-microscópicas em dois dos nove pacientes com quadro clínico sugestivo da síndrome de Wolf-Hirschhorn-SWH (deleção do braço curto do cromossomo 4) e afastou a hipótese de uma deleção envolvendo o gene *PAX6* em uma família cujo caso-índice apresenta aniridia e translocação equilibrada. As técnicas de citogenética molecular demonstraram ser poderosas ferramentas a serem incorporadas à rotina laboratorial, uma vez que permitiram uma visualização mais detalhada de toda a arquitetura genômica, resultando na identificação da origem de fragmentos de origem desconhecida, da estrutura de rearranjos cromossômicos complexos, e de pequenas alterações não reconhecíveis pela citogenética clássica.

Abstract

Unbalanced chromosome rearrangements comprise about 3% of all chromosome aberrations in newborns. Depending on the chromosome(s) involved in the rearrangement, they may lead to growth disturbance, mental and motor retardation, congenital anomalies, sterility and/or disorders of gonadal function. Diagnosis is made difficult due to the fact that classical cytogenetic studies do not allow detection of abnormalities with a DNA length of less than 5-10Mb. In addition, chromosome rearrangements with uncommon banding patterns, such as marker chromosomes or complex translocations involving many different breakpoints, are a difficult task to classical cytogenetic analysis. Molecular cytogenetic techniques (*fluorescence in situ hybridisation* – FISH, *comparative genomic hybridisation*-CGH and *spectral karyotyping*-SKY) became powerful tools to fast and accurate diagnosis of numeric and structural chromosome abnormalities. This work was carried out to demonstrate the usefulness of molecular cytogenetics to deal with cases which could not be solved by classical techniques. Twenty three individuals belonging to 21 families were analyzed in order to get an accurate diagnosis of numeric and structural chromosome rearrangements (11 cases); investigate the existence of a 4p deletion in individuals with the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) phenotype and normal karyotype; and to analyze in detail a family in which the index case has both aniridia and a balanced translocation inherited from the father and the mother, respectively. Molecular techniques were of great help to a precise identification or at least a better comprehension of numeric and structural chromosome rearrangements. In addition, in two of the nine patients with WHS phenotype a 4p16.3 deletion could be detected; in the other cases, an analysis of another critical region in the short arm of chromosome 4 would have to be performed. Concerning the family with both aniridia and balanced translocation, a *PAX6* gene deletion was not detected with the available probes, thus indicating a greater possibility of an intragenic mutation. This work was able to demonstrate the great applicability of molecular cytogenetic studies in the investigation of chromosome abnormalities, specially when preceded by a thorough clinical evaluation and a classical karyotype of good quality.

I. Introdução

I.1. Anomalias cromossômicas

I.1.1 Definição e Classificação

Anomalias cromossômicas são definidas como quaisquer alterações nos cromossomos que sejam visíveis, a partir de técnicas de citogenética clássica, ou mediante ao emprego de técnicas de citogenética molecular utilizada (STRACHAN & READ, 2002). Podem ser anomalias constitucionais, ou seja, presentes em todas as células de um organismo, ou anomalias somáticas, presentes apenas em algumas células ou tecidos. Sejam constitucionais ou somáticas, as anomalias cromossômicas são classificadas em três categorias: anomalias numéricas, que se referem a um número anormal de cromossomos, envolvendo ganho ou perda de cromossomos inteiros, anomalias estruturais, caracterizadas por alterações na estrutura de um ou mais cromossomos, e mixoploidia em que há a presença de duas ou mais linhagens de celulares em um mesmo indivíduo (STRACHAN & READ, 2002).

I.1.1.1 Anomalias numéricas

As anomalias numéricas são subdivididas em euploidias, nas quais há aumento ou diminuição de pelo menos um conjunto haplóide completo no genoma; aneuploidias, definidas como ganho ou perda de um ou mais pares de cromossomos, mas não de todos eles, as quais representam pelo menos 3 a 4% de todas as gestações clinicamente reconhecidas (NUSSBAUM, 2002).

Nas aneuploidias, o aumento do número de cromossomos homólogos denomina-se polissomia, incluindo trissomias, tetrassomias, pentassomias e assim por diante, conforme haja três, quatro, cinco ou mais homólogos. Na ausência de um homólogo a célula será denominada monossômica em relação àquele cromossomo, e na ausência dos dois elementos homólogos, nulissômica.

Entre as euploidias, por sua vez, estão incluídas as poliploidias, em que há ganho de conjuntos cromossômicos haplóides (n), como nas triploidias ($3n$) e tetraploidias ($4n$).

A mixoploidia inclui o mosaicismo e o quimerismo, caracterizados pela presença, em um mesmo indivíduo, de duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes. No mosaicismo as linhagens são derivadas de um único zigoto, enquanto no quimerismo são provenientes de zigotos diferentes. O mosaicismo pode ser numérico (o mais comum) ou estrutural (STRACHAN & READ, 2002).

As anomalias numéricas são facilmente identificadas utilizando técnicas de citogenética clássica, embora algumas vezes a utilização das técnicas de citogenética molecular agilizem a análise.

1.1.1.2 Anomalias estruturais

As anomalias estruturais são consideradas equilibradas se não houver ganho nem perda de material cromossômico; caso contrário, são consideradas desequilibradas. Alguns rearranjos são estáveis durante as divisões celulares (meiose e mitose); outros, no entanto, são instáveis devido à falta de elementos funcionais normais, como um centrômero funcionante e dois telômeros.

As anomalias estruturais equilibradas (inversões, translocações recíprocas e translocações robertsonianas), demonstradas na figura 1, não costumam acarretar efeito fenotípico. Em alguns casos, porém, genes específicos podem ser truncados, deletados ou inativados no rearranjo cromossômico, levando a um fenótipo anômalo. Anomalias estruturais equilibradas associadas a fenótipos anômalos são observadas em cerca de 0,3% dos exames realizados em laboratórios de citogenética humana, e podem estar associadas a retardamento mental, esterilidade masculina ou feminina, quadros sindrômicos ou anomalias congênitas isoladas (BUGGE *et al.*, 2000).

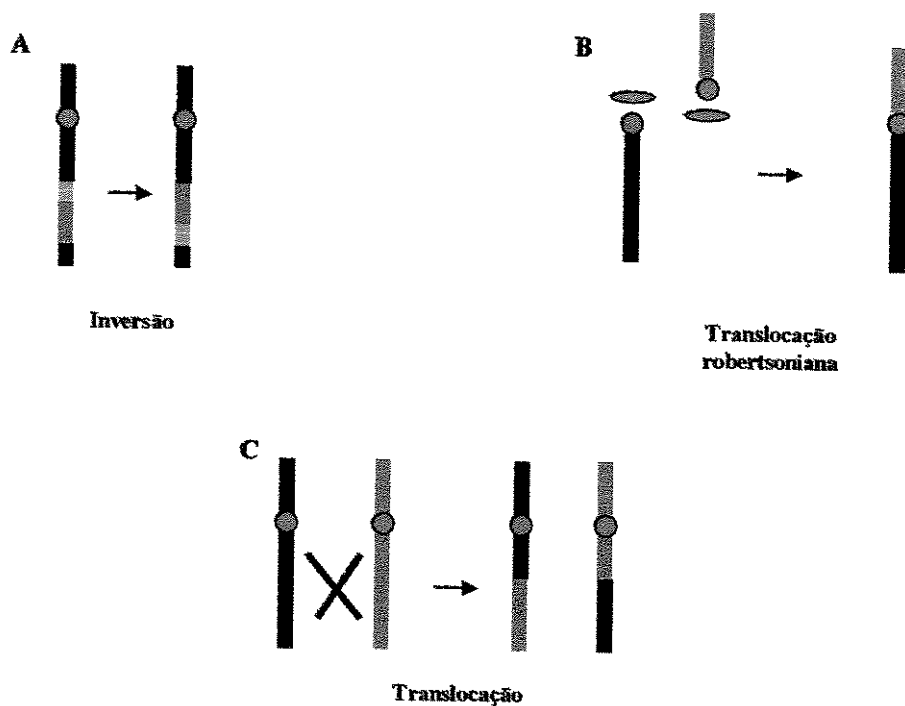


Figura 1: Anomalias estruturais equilibradas. A: Inversão. B: Translocação robertsoniana entre dois cromossomos acêntricos. C: Translocação entre cromossomos não homólogos.

As anomalias estruturais desequilibradas são, geralmente, associadas a fenótipos anômalos em decorrência de ganho ou perda de material genético nos cromossomos envolvidos. São classificadas em duplicações, deleções, inserções, sítios frágeis, isocromossomos, cromossomos marcadores, em anel e dicêntricos (Figura 2).

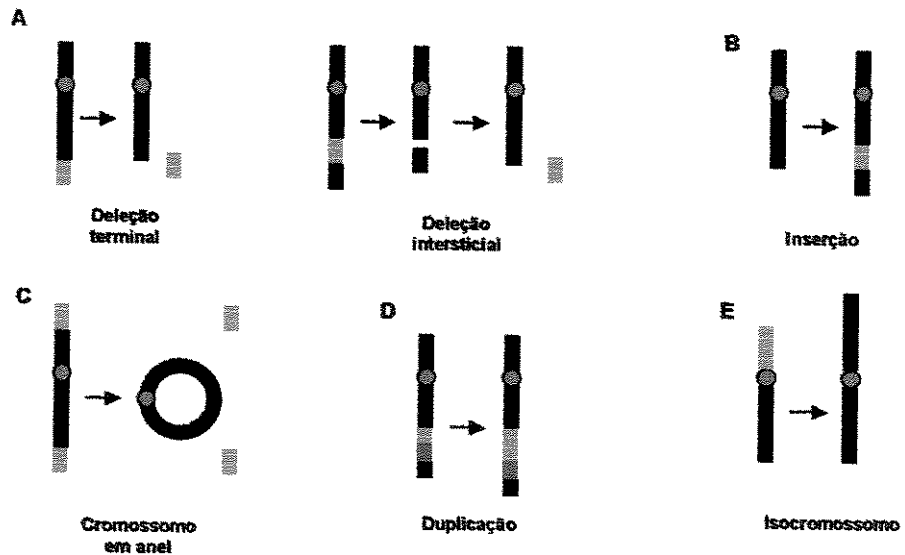


Figura 2: Anomalias estruturais desequilibradas. A: Deleções terminal e intersticial, cada uma gerando um fragmento acêntrico. B: Inserção de um fragmento de um cromossomo não homólogo. C: Cromossomo em anel com dois fragmentos acêntricos. D: Duplicação. E: Isocromossomo gerado a partir do braço longo do cromossomo.

Nas anomalias estruturais, diferentemente das numéricas, a identificação dos cromossomos ou bandas envolvidas no rearranjo é freqüentemente dificultada quando se utilizam somente técnicas de citogenética clássica, devido, muitas vezes, à ausência de um padrão de bandas coerentes e reconhecíveis. Por este motivo, técnicas de citogenética molecular estão sendo utilizadas a fim de facilitar e agilizar sua identificação.

I.1.2 Origem das anomalias

I.1.2.1 Anomalias numéricas

As anomalias numéricas devem-se, mais freqüentemente, ao mecanismo cromossômico denominado não disjunção, que pode ocorrer tanto na fase pré-zigótica (erros meióticos) quanto na pós-zigótica (erros mitóticos). Corresponde à não separação (ou segregação) dos cromossomos homólogos na meiose I ou das cromátides irmãs durante sua migração para polos opostos na meiose II ou na mitose, dando origem a duas

células aneuplóides, uma com ausência de um cromossomo e a outra com um cromossomo adicional.

Na fase pré-zigótica, durante a gametogênese, a não disjunção pode ocorrer na primeira ou segunda divisão meiótica. Se ocorrer na meiose I, o gameta com o cromossomo extra terá um homólogo de origem paterna e outro de origem materna. Por outro lado, se a não disjunção ocorrer na meiose II, o gameta com o cromossomo extra terá dois homólogos com a mesma origem, paterna ou materna. Acredita-se que a causa da segregação imprópria dos cromossomos durante a divisão celular seja uma falha no emparelhamento dos cromossomos na sua recombinação em ambas.

Além da não disjunção clássica, existe ainda a possibilidade da separação das cromátides irmãs ocorrer prematuramente durante a meiose I, evento esse que normalmente ocorre apenas na meiose II. As cromátides irmãs separadas prematuramente podem migrar para pólos opostos na anáfase I, gerando gametas com desequilíbrio do material cromossômico (THERMAN & MILLER, 2000).

Ocasionalmente, a não disjunção pode ocorrer tanto na meiose I quanto na meiose II, ou ainda, por acaso, simultaneamente nos gametas masculino e feminino. Isso resulta em um zigoto com número incomum de cromossomos, o que é extremamente raro em cromossomos autossômicos, mas não em cromossomos sexuais.

Embora os erros que dão origem às anomalias numéricas sejam mais freqüentes na divisão meiótica, essas anomalias também podem surgir na fase pós-zigótica. Esses erros mitóticos incluem a não disjunção das cromátides, já mencionada, e a perda cromossômica, que pode ser decorrente de atraso na migração da cromátide para um dos pólos do fuso durante a anáfase, ou ainda de aberrações estruturais que impeçam a viabilidade do cromossomo afetado. Se um desses eventos ocorrer em uma das primeiras divisões mitóticas do embrião, o mosaicismo deverá estar presente em todos os tecidos do organismo. Entretanto, se ocorrer em fase mais tardia, após o surgimento dos três folhetos embrionários, a linhagem celular anômala poderá ficar restrita a derivados de um único folheto.

I.1.2.2 Anomalias estruturais

As anomalias estruturais surgem quando quebras cromossômicas, devidas a dano no DNA por agentes clastogênicos químicos, físicos ou infecciosos, ou pelo mau funcionamento do sistema de recombinação, são reparadas incorretamente.

Os pontos de quebras que levam a rearranjos cromossômicos podem ocorrer em todo o genoma, porém são mais frequentes nas regiões pericentroméricas e subteloméricas, que são ricas em pequeno número de cópias repetidas (*low-copy repeats*, LCRs). As LCRs são seqüências repetidas com orientação direta ou invertida, de tamanho de 10 a 500 Kb e com mais de 95% de similaridade. Estão presentes em 5 a 10% do genoma humano em diferentes cromossomos e com freqüências diferentes. Há indicações de que a maioria das recombinações homólogas não alélicas (recombinações desiguais, RDs) ocorrem principalmente nas regiões das LCRs, o que sugere que os rearranjos cromossômicos não são aleatórios, mas sim resultado de uma predisposição determinada pela presença dessas repetições. Acredita-se que as LCRs gerem uma instabilidade genômica, induzindo a formação de deleções, duplicações, inversões, isocromossomos, cromossomos marcadores e translocações (LUPSKI, 1998; SHAFFER & LUPSKI, 2000; EMANUEL & SHAIKH, 2001; STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002a; STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002b; STANKIEWICZ *et al.*, 2003; SHAW & LUPSKI, 2004).

Segundo SHAFFER & LUPSKI (2000), WANDSTRAT & SCHARTZ (2000), EMANUEL & SHAIKH (2001) e STANKIEWICZ & LUPSKI (2002a), essas anomalias cromossômicas teriam origem em três formas de rearranjo baseadas nas LCRs: intercromossômica, intracromossômica e intracromátide. O rearranjo intercromossômico resultaria do emparelhamento desigual nas LCRs seguido de *crossing over* entre cromossomos homólogos ou não; no intracromossômico, o emparelhamento desigual ocorreria entre cromátides irmãs, e no intracromátide entre as LCRs na mesma cromátide. Em todas essas situações, o emparelhamento desigual daria origem à duplicação, deleção e inversão, dependendo da orientação das LCRs.

Caso o emparelhamento desigual ocorresse entre LCRs com orientação direta, por exemplo, teríamos, nos rearranjos inter e intracromossômicos, duplicação e deleção (Figura 3a e 3d), e caso ocorresse entre LCRs com sentido invertido haveria inversão com as três formas de rearranjo (Figura 3b, 3e e 3h). Um rearranjo intercromátide decorrente de emparelhamento desigual com orientação direta levaria, por sua vez, ao surgimento de deleções e cromossomos marcadores (Figura 3g). Se a forma intercromossômica ocorresse entre cromossomos diferentes, daria origem a translocação recíproca desde que os cromossomos estivessem alinhados (Figura 3a); ocorrendo entre cromossomos acrocêntricos, teríamos uma translocação robertsoniana.

As LCRs podem ainda emparelhar-se de forma complexa, dando origem a deleções, duplicações, inversões e a cromossomos marcadores (Figura 3c, 3f e 3i). Nota-se, ainda, a formação de fragmentos dicêntricos de duplicação invertida, denominados inv dup, muito frequentes nos cromossomos 15 e 22, cuja formação resulta de RD inter ou intracromossômica entre LCRs invertidas (Figura 3c e 3e).

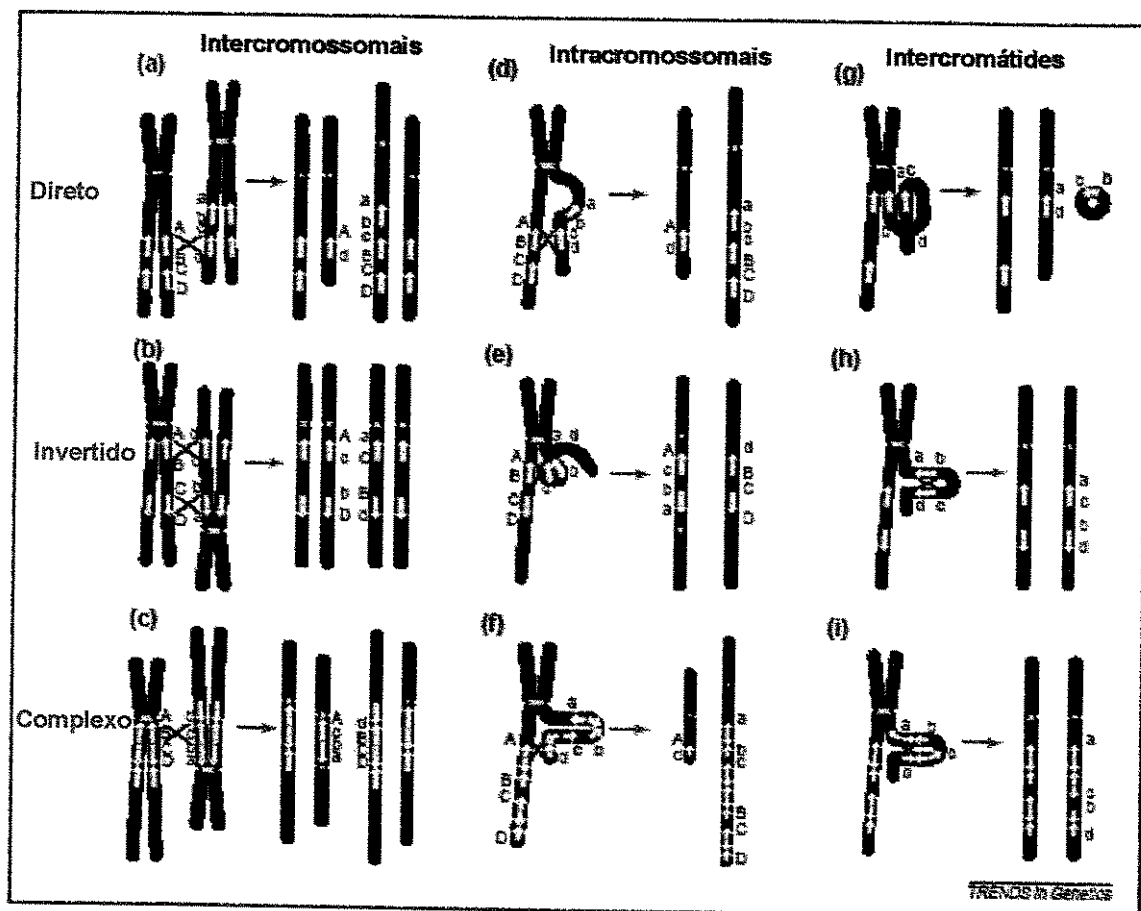


Figura 3: Representação esquemática de recombinações desiguais entre seqüências de pequeno número de cópias repetidas (LCRs) (adaptado de STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002a). (a): emparelhamento de cromossomos homólogos ou não de forma direta, (b) emparelhamento de cromossomos homólogos ou não de forma invertida, (c) emparelhamento de cromossomos homólogos ou não de forma complexa, (d) emparelhamento entre cromátides irmãs de forma direta, (e) emparelhamento entre cromátides irmãs de forma invertida, (f) emparelhamento de cromátides irmãs de forma complexa, (g) emparelhamento de LCRs dentro de uma mesma cromátide de forma direta, (h) emparelhamento de LCRs dentro de uma mesma cromátide de forma invertida e (i) emparelhamento de LCRs dentro de uma mesma cromátide de forma complexa.

Além das formas já mencionadas, as deleções também podem surgir por meio de uma única quebra na região terminal de um determinado cromossomo muitas vezes

encoberta por repetições teloméricas (TTAGGG)_n como resultado de uma translocação crítica envolvendo regiões subteloméricas, o que é muito comum, ou ainda por ação da telomerase para evitar a instabilidade cromossômica, um fenômeno denominado captura telomérica (THERMAN & MILLER, 2000). As deleções podem surgir, ainda, a partir de duas quebras no mesmo braço de cromossomo, dando origem a uma deficiência intercalar e um segmento acêntrico, que se perde durante a divisão celular; ou ainda por segregação anormal na meiose de um portador de uma translocação equilibrada ou de uma inversão. As deleções, portanto, podem ser terminais ou intersticiais.

Assim como a deleção, as duplicações também podem ser originadas a partir da segregação anormal de uma translocação equilibrada ou de uma inversão. Por sua vez, as inversões surgem quando duas quebras ocorrem no mesmo cromossomo e o segmento entre as quebras é reconstituído de forma invertida o que, como já foi visto, pode ser decorrente de emparelhamento desigual entre LCRs com orientação invertida. Há dois tipos de inversões: as paracêntricas (sem envolver o centrômero) e as pericêntricas (que incluem o centrômero).

Os cromossomos em anel formam-se quando um cromossomo sofre duas quebras, pericêntricas ou paracêntricas, e as extremidades fraturadas do cromossomo se unem em forma de um anel, ou, como já foi mencionado, quando há RD entre LCRs de uma mesma cromátide, formando um cromossomo em anel acêntrico (Figura 3g). Se a quebra for pericêntrica, formar-se-á um cromossomo em anel contendo um centrômero, podendo ser mitoticamente estável; se for paracêntrica, ou seja, sem a presença de um centrômero, ele se perderá durante a divisão celular.

Em relação aos isocromossomos, embora sua origem ainda não seja bem esclarecida, existem dois possíveis mecanismos. O primeiro seria a divisão anômala do centrômero durante a divisão celular, levando a uma separação transversal, e não longitudinal, dos elementos centroméricos. Isso provocaria a separação dos dois braços cromossômicos ao invés das cromátides irmãs. O outro, e possivelmente mais comum, seria por translocação envolvendo o braço de um cromossomo e seu homólogo (ou cromátide irmã) na região pericentromérica (SHAFFER & LUPSKI, 2000).

O mais comum dos isocromossomos é aquele formado a partir do braço longo do cromossomo X, cuja frequência em seres humanos é de 1:13.000 indivíduos (SHAFFER & LUPSKI, 2000). Devido a sua inativação preferencial, são evitados efeitos de dosagem gênica anormal; por outro lado, a haploinsuficiência de genes presentes no braço curto do

cromossomo X e que escapam à inativação determina o fenótipo da síndrome de Turner. Os isocromossomos de braço longo do cromossomo X são, em sua maioria, dicêntricos, com pontos de quebra mapeados na região Xp11.21, na qual há várias LCRs. A possível explicação para sua origem seria por meio de um mecanismo de reunião em forma de U entre as cromátides irmãs ou entre cromossomos homólogos, ou através do emparelhamento desigual entre LCRs com sentido invertido (STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002a). No entanto, acredita-se que o mecanismo em forma de U seja o mais comum; essa hipótese baseia-se em estudos realizados com marcadores genéticos que permitiram a observação de homozigose dos mesmos ao longo dos braços longos do cromossomo X que constituem o isocromossomo (SHAFFER & LUPSKI, 2000).

Outros isocromossomos frequentemente observados são os formados a partir de cromossomos acrocêntricos, incluindo o Y, pois a ausência do braço curto desses cromossomos não afeta sua viabilidade (THERMAN & MILLER, 2000). Nesses casos, a origem dos isocromossomos “de novo” pode ser tanto paterna quanto materna na mesma proporção, com exceção, logicamente, dos derivados de Y. Entretanto, os isocromossomos derivados de autossomos que surgem por meio de translocações robertsonianas são quase que exclusivamente de origem materna. Embora exista a hipótese de que a maioria dos isocromossomos seja de origem pós-zigótica, alguns pesquisadores acreditam que sejam formados a partir de uma recombinação durante a meiose. De acordo com essa última hipótese, os isocromossomos originar-se-iam por um mecanismo de reunião em forma de U entre as cromátides irmãs na porção proximal do braço curto ou dentro da região centromérica que contém DNA α satélite, o que levaria à formação de isocromossomos dicêntricos ou monocêntricos, respectivamente (SHAFFER & LUPSKI, 2000).

No caso dos cromossomos marcadores, eles aparecem com maior frequência em mosaico e há uma proporção relativamente alta de derivados dos cromossomos 15, 22 e X. Curiosamente, alguns cromossomos marcadores não apresentam seqüências de DNA centromérico identificáveis, o que deveria torná-los instáveis. No entanto, eles possuem fragmentos de braços cromossômicos que, geralmente, estavam a uma pequena distância do centrômero normal e que inexplicavelmente adquirem atividade centromérica (THERMAN & MILLER, 2000).

A origem da maioria dos cromossomos marcadores (CMs) é ainda indefinida. Entretanto, no caso especial dos CMs derivados do cromossomo 15, estudos têm revelado que este cromossomo possui várias regiões de LCRs (LCR15 –BP1, LCR15 –BP2,

LCR15 –BP3 e LCR15 –BP4) que seriam responsáveis pelos inúmeros rearranjos que dariam origem a essas anomalias estruturais (STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002a) (Figura 4).

O emparelhamento desigual nessas regiões, seguido de *crossing over* entre cromossomos homólogos, cromátides irmãs ou em uma mesma cromátide, seria a causa da presença de uma variedade de tamanhos desses marcadores. Assim, dependendo da quantidade de eucromatina envolvida, os CMs poderiam envolver regiões importantes, como 15q11-q13 (associada às síndromes de Prader-Willi e Angelman) ou regiões sem importância quanto à expressão fenotípica. Desse modo, tanto podem estar associados a fenótipos normais quanto a quadros que incluem retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, hipotonia, anomalias congênitas, distúrbios de comportamento e convulsões. Além disso, tem sido detectada uma frequência alta de CMs derivados do cromossomo 15 entre homens com oligo ou azoospermia (WANDSTRAT & SCHWARTZ, 2000; YONGGANG *et al.*, 2000; EGGERMANN *et al.*, 2002). O cromossomo 15 possui, ainda, vários genes que sofrem *imprinting*, o que aumenta o risco de surgimento de anomalias decorrentes de dissomias uniparentais (SHAFFER & LUPSKI, 2000; EGGERMANN *et al.*, 2002).

cromossomo 15



Figura 4: Localização das LCRs no cromossomo 15.

TEL: Telômero; RON: Região organizadora de nucléolo; CEN: Centrômero; LCR: Pequeno número de cópias repetidas; BP: *Breakpoint* (Ponto de quebra)

Uma das formas mais comuns de CMs é o inv dup (15), que compreende cerca de 50% de todos os CMs (WANDSTRAT & SCHWARTZ, 2000; EGGERMANN *et al.*, 2002). Esse cromossomo marcador é comumente classificado como grande ou pequeno, baseado no seu tamanho e na presença ou na ausência dos loci responsáveis pelas síndromes de Prader Willi e/ou Angelman (SPW/SA). O primeiro grupo possui a região

crítica responsável pelas SPW/SA (15q11-q13), dois satélites e pode ser mono ou dicêntrico. O outro grupo não possui a região crítica responsável pela SPW/SA (SHAFFER & LUPSKI, 2000; SHIM *et al.*, 2001). Tanto no primeiro quanto no segundo grupo, a maioria dos inv dup (15) é dicêntrico com um dos centrômeros inativo, ou seja, pseudodicêntrico (psu dic). Os portadores de inv dup (15) pequeno possuem, geralmente, fenótipo normal. Entretanto, ocasionalmente, esse cromossomo marcador extra tem sido descrito com fenótipos semelhantes às SPW/SA. Isso pode ser resultado de dissomia uniparental de dois cromossomos 15 morfologicamente normais ou de deleção de um dos cromossomos homólogos (SHIM *et al.*, 2001). Já o primeiro grupo, que possui região crítica responsável pelas SPW/SA, está associado a fenótipos clínicos que incluem retardo mental e de crescimento, convulsões e dismorfismos.

Quanto à formação desse tipo de CM, o inv dup (15) origina-se por meio de emparelhamento desigual inter ou intracromossômico entre LCRs invertidas seguido de *crossing over*, como visto anteriormente. (YONGGANG *et al.*, 2000; STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002a) (Figura 5). As quebras cromossômicas no cromossomo 15 para dar origem ao inv dup (15) pequeno podem ocorrer em dois pontos em igual frequência, que são os pontos de quebra proximais ao centrômero. Já os inv dup (15) grandes originam-se a partir de pontos de quebra distais ao centrômero (SHAFFER & LUPSKI, 2000; WANDSTRAT & SCHWARTZ, 2000).

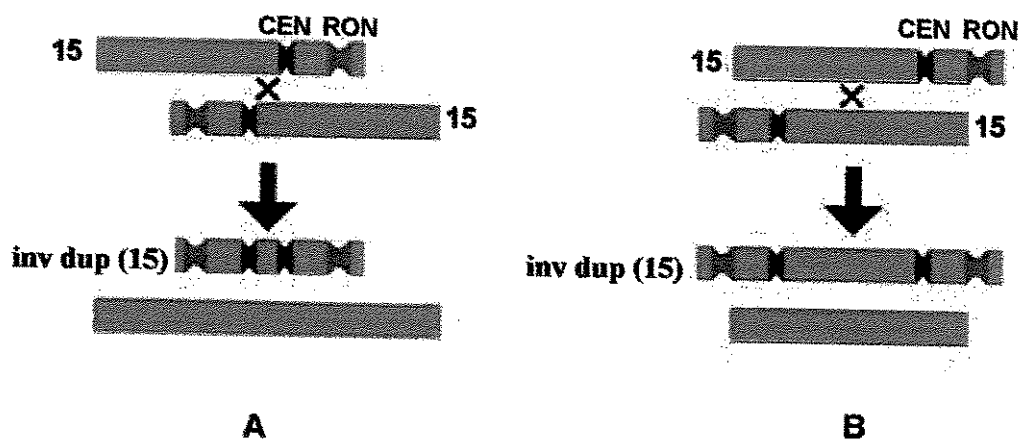


Figura 5: Esquema da formação do inv dup (15) supranumerário, pseudodicêntrico e bissatelitado. Forma A: inv dup (15) pequeno que não apresenta região de eucromatina clinicamente significativa, podendo ser compatível com fenótipo normal. Forma B: inv dup (15) grande que possui região de eucromatina clinicamente significativa, levando a retardo mental e anomalias congênitas.

CEN = centrômero e RON = região organizadora de nucléolo.

1.1.3. Incidência das anomalias cromossômicas

Estima-se que 15% das gestações reconhecidas clinicamente terminam em aborto espontâneo antes da 20ª semana de gestação; em aproximadamente metade dos casos (47,9%) há anomalias cromossômicas detectáveis (THERMAN & MILLER, 2000; ROBINSON *et al.*, 2001). Entre as anomalias cromossômicas encontradas as mais comuns são as anomalias numéricas, em particular as trissomias (aproximadamente 30% do total de perdas), seguidas pela monossomia de cromossomos sexuais (10%) (ROBINSON *et al.*, 2001). Entre as trissomias destacam-se as autossômicas, envolvendo os cromossomos 13, 14, 15, 16, 21 e 22 (RUBIO *et al.*, 2003).

No entanto, a frequência de anomalias específicas depende da idade materna na casuística estudada. De fato, a frequência das trissomias aumenta consideravelmente com o aumento da idade materna, o que já não se observa em relação à monossomia de cromossomos sexuais e às poliploidias, cuja frequência é semelhante à do cariótipo 45,X (10%) (ROBINSON *et al.*, 2001). Além disso, com o aumento da idade gestacional a frequência de anomalias cromossômicas tende a diminuir, de tal forma que são encontradas em aproximadamente 6% dos natimortos e em 0,6% dos nativos, como tem ocorrido para a maioria das trissomias (RUBIO *et al.*, 2003).

A incidência de anomalias cromossômicas em neonatos é de aproximadamente 1 em 160 nascimentos (0,7%) (NUSSBAUM, 2002). Estima-se que a incidência em recém-nascidos das trissomias mais frequentes, dos cromossomos 21, 18 e 13, seja 1/750, 1/6000 e 1/12000, respectivamente (THERMAN & MILLER, 2000). Quanto à síndrome de Turner (45,X), anomalia isolada mais comumente observada em abortos espontâneos, esta corresponde a menos de 1% dos nativos cromossomicamente anormais. Já as demais aneuploidias de cromossomos sexuais são muito comuns entre nativos cromossomicamente anormais (3 em cada 10) e mais raras entre os abortos com aberrações cromossômicas (4/750) (NUSSBAUM, 2002).

Quanto às anomalias estruturais, os rearranjos equilibrados são encontrados em 1:500 indivíduos na população, enquanto que os rearranjos desequilibrados correspondem a 3% de todas as anomalias cromossômicas encontradas em nativos (SHAFFER & LUPSKI, 2000).

Entre as anomalias estruturais desequilibradas, vale ressaltar a frequência dos cromossomos marcadores de 0,14 a 0,72/ 1000 nascimentos (WANDSTRAT & SCHWARTZ, 2000; EGGERMANN *et al.*, 2002; YARON *et al.*, 2003). Como já foi dito, em metade desses casos o marcador é derivado do cromossomo 15 (COCKWELL *et al.* 2001; EGGERMANN *et al.*, 2002), e sua forma mais comum é cromossomo de duplicação invertida, ou seja, inv dup (15) (SHAFFER & LUPSKI, 2000; WANDSTRAT & SCHWARTZ, 2000). Também é elevada a frequência de marcadores derivados de cromossomos sexuais (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

I.2. Fenótipos associados às anomalias cromossômicas

As aneuploidias são, sem dúvida, as anomalias cromossômicas mais significativas em termos clínicos, e estão associadas a distúrbios de crescimento, retardo mental e(ou) neuromotor e anomalias congênitas. As aneuploidias autossômicas mais frequentes em nativos são as trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21, porém apenas a trissomia do 21 é compatível com uma sobrevivência longa na grande maioria dos casos.

Enquanto que a maioria das aneuploidias autossômicas determina desequilíbrios do material genético incompatíveis com a sobrevivência do embrião, as aneuploidias dos cromossomos sexuais têm expressão fenotípica bem menos grave, o que as torna muito mais frequentes. Entre elas estão as trissomias 47,XXX, 47,XXY e 47,XYY e a monossomia do X (45,X); clinicamente, manifestam-se principalmente por esterilidade e por distúrbios da função gonadal e do crescimento.

Quanto às anomalias estruturais, a expressão clínica depende de haver ou não desequilíbrio do material genético. As anomalias estruturais equilibradas geralmente não determinam qualquer efeito fenotípico em seus portadores. Em alguns casos, porém, genes específicos envolvidos na alteração estrutural são truncados, deletados ou inativados, levando, assim, a retardamento mental, esterilidade, quadros sindrômicos ou anomalias isoladas (TOMMERUP, 1993; COLLINS, 1995; WIRTH *et al.*, 1999; BUGGE *et al.*, 2000).

O grande risco representado pelas anomalias estruturais equilibradas refere-se à geração seguinte, pois seus portadores produzem gametas desequilibrados em proporção elevada e, por este motivo, têm maior possibilidade de ter uma prole anormal. Quanto às anomalias desequilibradas, o fenótipo anormal deve-se ao efeito de dosagem do material

genético a mais ou a menos. Nesses casos, as manifestações clínicas mais freqüentemente observadas envolvendo cromossomos autossomos são retardo de crescimento intra-uterino e pós-natal; sinais dismórficos, especialmente de face, membros e genitais; malformações múltiplas; retardamento neuropsicomotor e, principalmente, deficiência mental. Já nas anomalias estruturais desequilibradas envolvendo cromossomos sexuais, as manifestações clínicas, à semelhança do que ocorre com as aneuploidias, são menos graves; destacam-se os distúrbios da função gonadal e do crescimento (alta ou baixa estatura).

I.3. Análise clássica do cariótipo humano

Estudos de rotina com a utilização de técnicas de citogenética clássica, especialmente a técnica de bandamento G, permitem detectar tanto anomalias numéricas quanto estruturais. Entretanto, alterações envolvendo menos do que 5-10 Mb de DNA são difíceis ou impossíveis de serem identificadas por esta técnica, principalmente se os cromossomos analisados não forem profásicos ou prometafásicos, ou seja, se não apresentarem distensão ao nível de 500 a 2000 bandas. Em alguns casos, mesmo as técnicas de distensão cromossômica não permitem um diagnóstico citogenético pelas técnicas clássicas. Além disso, rearranjos cromossômicos com padrões de bandas incomuns, tais como cromossomos marcadores ou translocações complexas envolvendo muitos pontos de quebra, são de difícil interpretação. Finalmente, o número de metáfases para análise torna-se um fator limitante para detecção de linhagens em mosaico (KEARNEY, 2001; TANEMURA *et al.*, 2001).

Apesar de todas essas desvantagens, ainda assim a análise clássica é de extrema importância por permitir uma avaliação geral dos cromossomos humanos de modo simples e barato. Além disso, sua associação com o estudo do quadro clínico do paciente pode direcionar a investigação para a utilização de técnicas de citogenética molecular mais apropriada ao caso, possibilitando um diagnóstico mais rápido e preciso.

I.4. Técnicas de citogenética molecular

As técnicas de citogenética molecular baseadas em hibridação *in situ* por fluorescência (*fluorescence in situ hybridisation*-FISH) tornaram-se poderosas ferramentas para o diagnóstico rápido e preciso de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais.

Após a técnica de FISH, a hibridação genômica comparativa (*comparative genomic hybridisation*-CGH) e a cariotipagem espectral (*spectral karyotyping*-SKY) surgiram, consecutivamente, com a finalidade de facilitar cada vez mais a identificação de anomalias cromossômicas e de sanar as dificuldades que cada uma delas apresenta em casos específicos. Dessa forma, em alguns casos elas se tornaram ferramentas diagnósticas complementares.

I.4.1. FISH

Esta técnica baseia-se na capacidade de hibridação de sondas de DNA marcado por fluorescência às seqüências que lhes são complementares no DNA genômico, permitindo que elas sejam visualizadas e analisadas. Essas sondas, que são altamente específicas para seus alvos, podem ser utilizadas para o estudo de um sítio específico no cromossomo, ou mesmo para a identificação de um cromossomo inteiro. Podem ser classificadas em quatro tipos principais: as sondas específicas para um determinado gene, as que identificam seqüências repetitivas, as sondas de “pintura” cromossômica e aquelas que identificam todo um DNA genômico.

O primeiro tipo de sonda tem como alvo seqüências específicas de um cromossomo. Essas seqüências são clonadas em uma variedade de vetores tais como plasmídeos (1-10Kb), cosmídeos (30-40Kb) e vetores maiores como *Bacterial artificial chromosome* (BAC), *yeast artificial chromosome* (YAC) e *P1-derived artificial chromosome* (PAC) (80Kb-1Mb). Tais sondas são úteis no estudo de deleções e síndromes de microdeleções e para análise de translocações, inversões e duplicações específicas (McNEIL & RIED, 2000).

As sondas específicas para seqüências repetitivas ligam-se a regiões ricas em determinadas repetições de pares de bases, como os centrômeros, ricos em repetições AT em *tandem*, e os telômeros, reconhecidos pelas seqüências repetidas curtas TTAGGG. As sondas centroméricas são aplicadas na identificação de cromossomos supranumerários de origem indefinida em metáfases e na pesquisa de anomalias cromossômicas numéricas em núcleos interfásicos. Por sua vez, as sondas teloméricas e subteloméricas são geralmente utilizadas na identificação de translocações cromossômicas críticas, tais como aquelas que ocorrem em casos de retardo mental de causa desconhecida (McNEIL & RIED, 2000).

As sondas de “pintura” cromossômica (*whole-chromosome painting-WCPs*) são sondas complexas derivadas de um único tipo de cromossomo; entre elas encontram-se as “pinturas” específicas para um braço cromossômico (*chromosome arm-specific paints*). Essas sondas são muito úteis no esclarecimento de rearranjos cromossômicos numéricos e estruturais em células em metáfase. Entretanto, não têm utilidade na análise de núcleos interfásicos (McNEIL & RIED, 2000).

Finalmente, as sondas que identificam todo um DNA genômico (*whole-genomic DNA*) detectam ganhos e perdas de material genômico e são usadas para a técnica de CGH, que será apresentada adiante (McNEIL & RIED, 2000).

Embora seja muito eficaz na detecção de alterações cromossômicas sutis, o emprego da técnica de FISH exige o conhecimento prévio da provável localização da região envolvida na anomalia para que seja utilizada a sonda mais adequada, o que nem sempre é possível. Outro problema difícil de ser solucionado por essa técnica é a identificação de cromossomos marcadores, que geralmente não possuem padrões de bandas reconhecíveis. Nesses casos, a saída seria a utilização de WCPs, o que implicaria em gasto de tempo, reagentes e do material biológico do paciente.

1.4.2 CGH

Essa técnica consiste, inicialmente, em marcar todo o DNA genômico do paciente e de um indivíduo controle normal, cada um com uma cor diferente. Em seguida, as duas soluções são misturadas e hibridadas em uma lâmina contendo metáfases de outro controle normal. Nessa lâmina, as duas sondas irão competir pela mesma região; as regiões de desequilíbrio serão detectadas pela diferença no índice de cores, que por sua vez será quantificada por um *software* por meio de gráficos representando cada cromossomo e indicando, assim, ganho ou perda de material genômico de no mínimo 10Mb.

Essa técnica tem sido muito útil não apenas para identificar a origem de rearranjos cromossômicos desequilibrados e segmentos cromossômicos de origem desconhecida mas também para detectar microdeleções e duplicações difíceis de serem identificadas pelas técnicas convencionais (NESS *et al.*, 2002). Além disso, é de grande utilidade na detecção de ganhos e perdas em regiões teloméricas (RIGOLA *et al.*, 2002).

Apesar de todas essas vantagens, a CGH é uma técnica muito trabalhosa e não tem sensibilidade para detecção de pequenas anomalias estruturais desequilibradas; além disso, é incapaz de detectar rearranjos equilibrados (BAYANI & SQUIRE, 2001)

I.4.3. SKY

A técnica de SKY é baseada na hibridação simultânea de um “coquetel” de 24 sondas cromossomo-específicas gerado a partir da combinação de cinco fluorocromos espectralmente distintos; dessa maneira, cada cromossomo possui uma única “assinatura” espectral.

A imagem espectral é adquirida pela combinação de um microscópio de fluorescência, um espectroscópio Fourier e uma câmera com dispositivo de carga acoplada (*charge coupled device* - CCD). Assim, com uma simples emissão de luz numa imagem inteira é criada uma imagem espectral devida à produção de um interferograma para cada *pixel* que é específico para cada fluorocromo ou combinação de fluorocromos. Com base nessa imagem espectral criada, cada cromossomo é identificado pela emissão de *pixels* provenientes de todas as regiões cromossômicas que são medidos por um programa de computador (SCHRÖCK et al., 1997; HADDAD et al., 1998; BAYANI & SQUIRE, 2001; BAYANI & SQUIRE, 2002).

Dessa maneira, podem ser visualizados todos os cromossomos em um único experimento, e a sensibilidade na detecção de anomalias cromossômicas é, segundo SCHRÖCK *et al.* (1997), HADDAD *et al.* (1998) e FAN *et al.* (2000), da ordem de 1 a 2Mb. Com isso, essa técnica tem sido muito útil para identificação de anomalias cromossômicas estruturais, principalmente translocações (equilibradas e desequilibradas), inserções e cromossomos supranumerários.

I.5. Indicações para análise cromossômica utilizando técnicas de citogenética molecular

A técnica de FISH tem sido aplicada na identificação de anomalias cromossômicas associadas a fenótipos anômalos, tais como deleções, duplicações ou translocações; na determinação da origem de cromossomos marcadores a partir de uma correlação genótipo-fenótipo que permita direcionar a análise para determinados cromossomos; na busca de anomalias específicas em núcleos interfásicos quando não houver metáfases disponíveis para análise; no monitoramento da progressão de doenças, como nos casos de pacientes com câncer sob tratamento; e no monitoramento do sucesso de transplantes de medula óssea (KEARNEY, 2001).

Por sua vez, a técnica de CGH é altamente útil não apenas na identificação de rearranjos cromossômicos desequilibrados, mas também para identificar deleções, duplicações, amplificações, cromossomos marcadores e até mesmo mosaicismo, quando as anomalias aparecerem, no mínimo, em mais do que 50% das metáfases (NESS *et al.*, 2002). Finalmente, a técnica de SKY é apropriada para identificação de anomalias cromossômicas sutis, tais como translocações envolvendo regiões teloméricas, cromossomos marcadores pequenos e outras anomalias complexas, como amplificações (McNEIL & RIED, 2000; TRASK, 2002).

No âmbito das pesquisas científicas, essas técnicas têm auxiliado no mapeamento de genes (FISH); na identificação de novas anomalias não aleatórias (FISH e SKY); na identificação de regiões de amplificação e deleção (CGH); na identificação de pontos de quebras em translocações; na caracterização de regiões comumente deletadas (M-FISH); na determinação do envolvimento de linhagens celulares de células clonais (Imuno-FISH); na avaliação da expressão gênica em bases de célula por célula (FISH); no estudo da organização cromossômica em três dimensões nos núcleos interfásicos; e, finalmente, na avaliação do processo de encurtamento de telômeros (FISH) (KEARNEY, 2001).

1.6. Importância de um diagnóstico rápido e preciso

A presença de determinadas alterações cromossômicas pode ser responsável pelo aumento considerável do risco de desenvolvimento de câncer. É o caso de pacientes com distúrbios da diferenciação gonadal, incluindo a síndrome de Turner, a disgenesia gonadal mista e casos de ambigüidade genital com anomalias estruturais do cromossomo Y, em que o risco de desenvolvimento de tumores gonadais, como gonadoblastoma e disgerminoma, pode chegar a 30%. O diagnóstico rápido e preciso é, portanto, fundamental para a indicação de gonadectomia profilática nesses casos (ABULHASAN *et al.*, 1999; GIBBONS *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2000; RANKE & SAENGER, 2001; KIM *et al.*, 2002; ALVAREZ-NAVA *et al.*, 2003; CANTO *et al.*, 2004a; CANTO *et al.*, 2004b; RÖPKE *et al.*, 2004).

Outro exemplo é o da síndrome de genes contíguos WAGR (tumor de Wilms, Aniridia, anomalias Genito-urinárias e Retardamento mental), decorrente de microdeleção da região 11p13, em que é alto o risco de ocorrência de nefroblastoma e nefropatia com insuficiência renal progressiva. Nesses casos, é essencial o cuidadoso acompanhamento

clínico e laboratorial (CROLLA *et al.*, 1997; JR. LLERENA *et al.*, 2000; CROLLA & HEYNINGEN, 2002; MUTO *et al.*, 2002).

Logicamente, em todas as outras situações em que está indicada a análise cromossômica, e não apenas naquelas associadas a risco de surgimento de neoplasias, a obtenção de um diagnóstico citogenético preciso por meio das técnicas de citogenética molecular permite o estabelecimento do prognóstico individual e fornece subsídios para o aconselhamento genético da família.

É o caso, por exemplo, entre várias condições da síndrome de Wolf-Hirschhorn, determinada por deleção do braço curto do cromossomo 4 e caracterizada clinicamente por retardo mental grave, microcefalia, deficiência de crescimento, dismorfismos faciais e anomalias esqueléticas, entre outras (MARCELIS, *et al.*, 2001; SYRROU, *et al.*, 2001; ZANKL, *et al.*, 2001; ZOLLINO *et al.*, 2003). Microdeleções envolvendo a região 4p16.3, responsável pelo fenótipo anômalo, podem ser imperceptíveis na análise cromossômica convencional. O diagnóstico preciso por meio das técnicas moleculares permite o estabelecimento do prognóstico do paciente, tanto no que se refere à investigação de anomalias associadas quanto ao estabelecimento de terapias de apoio para minimizar o retardo neuropsicomotor. Além disso, o risco de recorrência familiar poderá ser estabelecido na medida em que houver uma definição sobre a origem, herdada ou não herdada, da anomalia estrutural.

II. Objetivo

II.1. Objetivo Geral

Demonstrar a aplicação das técnicas de citogenética molecular (FISH, CGH e SKY) na resolução de casos que não puderam ser solucionados pelas técnicas citogenéticas clássicas.

II.2. Objetivos Específicos

Obter o diagnóstico preciso de rearranjos cromossômicos estruturais e mixoploidias.

Investigar a presença de microdeleção do braço curto do cromossomo 4 em indivíduos com quadro clínico sugestivo da síndrome de Wolf-Hirschhorn cujo exame de cariótipo clássico teve resultado normal.

Analisar detalhadamente uma família em que há coincidência, no propósito, de aniridia e translocação equilibrada herdadas pelo lado paterno e materno, respectivamente.

III. Material e Métodos

III.1. Casuística

A casuística foi composta por 23 pacientes cujos exames de cariótipo, realizados por meio da análise citogenética clássica com bandamento G e resolução de 500 a 600 bandas no Laboratório de Citogenética Humana (LCH) do Departamento de Genética Médica da UNICAMP, não haviam sido suficientes para que se chegasse a um diagnóstico definitivo.

A análise citogenética molecular (técnicas de FISH e SKY) foi realizada no *Cytogenetics Cancer Core, University of Colorado Health Sciences Center* sob supervisão da Profa. Dra. Marileila Varella Garcia. Por sua vez, a técnica de CGH foi realizada no Laboratório de Citogenética do Instituto de Oncologia Pediátrica na UNIFESP sob a supervisão das Profas. Dras. Sílvia Regina C. Toledo e Maisa Yashimoto.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (parecer projeto 028/2002) e os dados foram coletados durante o período de julho de 2003 a setembro de 2004. O sigilo das informações foi obtido mediante a criação de um número para a identificação de cada um dos pacientes, preservando sua privacidade, conforme as normas da Declaração de Helsinque.

Para a definição da técnica de citogenética molecular a ser utilizada em cada caso os pacientes foram divididos em quatro grupos.

Grupo A: pacientes com anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais sem indicação clínica do(s) cromossomo(s) envolvido(s) (Tabela 1).

Grupo B: pacientes com anomalias cromossômicas mixoplóides com indicação clínica do(s) provável(is) cromossomo(s) envolvido(s) (Tabela 2).

Grupo C: pacientes com cariótipo aparentemente normal, porém com sinais clínicos sugestivos da síndrome de Wolf-Hirschhorn (deleção do braço curto do cromossomo 4) (Tabela 3).

Grupo D: família em que o probando apresenta aniridia isolada herdada pelo lado paterno, e uma translocação recíproca equilibrada herdada da mãe (Tabela 4).

Tabela 1: Descrição dos achados citogenéticos e das características clínicas dos pacientes incluídos no grupo A.

Paciente	Idade	Cariótipo por Banda G	Principais características clínicas
A1	22a	47,XY,+mar[50]	Criptorquia e dificuldade de reprodução
A2	5a	46,XX,add(X)(p22.3)[16]	Atraso no DNPM
A3	10a	47,XX,+mar[11]	Anomalias congênitas múltiplas (cardiopatia, fissura palatina e apêndices pré-auriculares)
A4	8a	46,XY,ins(11;?)(p11;?)[16]	Atraso no DNPM e hiperatividade
A5	1a	46,XX,add(9)(p24)[16]	Atraso no DNPM
A6	23a	46,XY,ins(22;?)(p11.1;?)	Fenótipo normal, esposa com história de abortos espontâneos e filho com anomalias congênitas

DNPM: Desenvolvimento Neuro-Psico-Motor; [n]: número de metáfases analisadas; a: anos.

Tabela 2: Descrição dos achados citogenéticos e das características clínicas dos pacientes incluídos no grupo B.

Paciente	Idade	Cariótipo por Banda G	Principais características clínicas
B1	8a	45,X[20]/ 46,X,+mar[30]	Sinais clínicos compatíveis com a síndrome de Turner.
B2	14a	45,X[2]/ 46,X,i(Yq)/ 46,X,+mar[14]	Ambigüidade genital (micropênis, hipospádia peniana, bolsa escrotal bifida), gônada disgenética e testículo rudimentar, e baixa estatura
B3	13a	45,X[20]/ 46,X,+mar[30]	Sinais clínicos compatíveis com a síndrome de Turner
B4	4a	45,X[6]/ 46,X,+mar[38]/ 47,X,+2mar[6]	Atraso no DNPM e fala, hipotireoidismo, suspeita de Síndrome Kabuki*
B5	16a	46,XY[42]/ 47,XY,+mar[8]	Sinais clínicos compatíveis com a síndrome Kabuki*

DNPM: Desenvolvimento Neuro-Psico-Motor; [n]: número de metáfases analisadas; a: anos

*síndrome Kabuki: aparência facial peculiar, retardo mental moderado a grave, retardo de crescimento pós-natal, anomalias esqueléticas e padrões dermatoglíficos incomuns (MILUNSKI *et al.* 2003; NAOMICHI & NIKAWA, 2003)

Tabela 3: Descrição dos achados citogenéticos e das características clínicas dos pacientes incluídos no grupo C.

Paciente	Idade	Cariótipo por Banda G	Principais características clínicas
C1	5a	46,XX[16]	Atraso no DNPM, cardiopatia, nefropatia, hipotonia generalizada, glabella proeminente e hipertelorismo
C2	10a	46,XX[16]	Atraso no DNPM, hipotonia e hipertelorismo.
C3	7a	46,XX[16]	Atraso no DNPM e trigonocefalia
C4	7a	46,XY[16]	Atraso no DNPM, palato alto, filtro nasolabial curto, hipertelorismo e refluxo gastro-esofágico
C5	7a	46,XX[16]	Atraso na fala, refluxo gastro-esofágico, crises convulsivas, glabella proeminente, hipertelorismo e filtro curto
C6	17a	46,XY[16]	Atraso no DNPM, sopro cardíaco, crises convulsivas, hipertelorismo e fenda palatina
C7	18a	46,XX[16]	Sinais faciais da SWH
C8	4a	46,XY[16]	Atraso de desenvolvimento sem dismorfismos relevantes
C9	8a	46,XY[16]	Atraso no DNPM e musculatura hipotônica

DNPM: Desenvolvimento Neuro-Psico-Motor; SWH: síndrome de Wolf-Hirschhorn; [n]: número de metáfases analisadas; a: anos.

Tabela 4: Descrição dos achados citogenéticos e das características clínicas dos pacientes incluídos no grupo D.

Paciente	Idade	Cariótipo por Banda G	Característica clínica
D	24a	46,XY,t(5;11)(p15.3;q22)mat[16]	Aniridia
DP	48a	46,XY[16]	Aniridia
DM	50a	46,XX,t(5;11)(p15.3;q22)[16]	Fenotipicamente normal, 3 abortos espontâneos

DP: pai do caso índice; DM: mãe do caso índice; [n]: número de metáfases analisadas; a: anos.

III.2 Métodos

III.2.1 FISH

Para a técnica de FISH, foram utilizadas suspensões de leucócitos de sangue periférico cultivados para preparações citogenéticas clássicas; essas células, previamente estocadas em solução de metanol e ácido acético 3:1 a -20°C, foram utilizadas para a preparação das lâminas.

Antes do procedimento, as lâminas permaneceram à temperatura ambiente em média por 3 dias; em seguida, foram deixadas por pelo menos 1 hora em solução de 2XSSC (pH 7,0) a 37°C. A composição desta solução, bem como das demais soluções utilizadas neste trabalho, encontram-se no Anexo 1. As lâminas passaram, então, por reidratação em uma série de etanóis (70%, 85% e 100%) por 2 minutos cada. Logo a seguir, foram colocadas em uma solução de ácido acético 70% por 20 a 25 segundos, e em 1XPBS (pH 7,2) por 1 minuto. Na sequência, foram lavadas em solução 1XPBS quatro vezes por 4 minutos cada antes de passarem novamente pela série de etanóis.

A seguir, foram incubadas em uma solução de pepsina 0,08% e HCl 0,01M a 37°C por 3 a 5 minutos; lavadas em 1XPBS por 5 minutos; incubadas em solução de formamida 1% e PBS (pH 7,2) à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos; lavadas novamente em PBS e reidratadas em uma série de etanóis. Nesta etapa foi aplicada a sonda em uma área previamente selecionada e marcada com caneta diamante, e a área de hibridação foi coberta com uma laminula e selada com cola especial (*rubber cement*).

As lâminas foram então incubadas a 80°C por 6 a 7 minutos para desnaturação dos cromossomos e do DNA da sonda. A hibridação ocorreu em uma caixa umedecida a 37°C por 24 horas (para sondas comerciais) ou 48 horas (para cosmídeos). Na pós-hibridação, foi realizada uma série de lavagens das lâminas até chegar à aplicação do contra-corante DAPI. Inicialmente utilizou-se a solução de formamida 50% e 2XSSC (pH 5,4) a 46°C três vezes por

6 minutos cada. Em seguida, as soluções 2XSSC (pH 7,0) a 46°C por 6 minutos; 2XSSC (pH 7,0) e 0,1% NP-40 a 46°C por 6 minutos; e 2XSSC (pH 7,0) à temperatura ambiente por 1 minuto. Finalmente, foram aplicados 14µl do contra-corante Vectashield DAPI (0,15µg/µl) e a lâmina foi coberta com lamínula e deixada a 4°C. A análise foi feita em microscópio de fluorescência ZEISS equipado com o *software* Genus (Cytovision 3.1).

III.2.1.1. Grupo A

No Grupo A, os pacientes A1 e A3 foram analisados pela técnica de FISH para confirmação de resultados obtidos por SKY. Nesses dois casos foi utilizada a sonda conjugada LSI SNRPN/CEP 15 (Vysis/Abbott), que cora a região crítica das síndromes de Prader-Willi e Angelman (15q13-q15) e a região 15q22 em laranja, enquanto que a região 15p11.2 (CEP15 - D15Z1) cora-se em verde. Além disso, também utilizamos a sonda centromérica CEP11 (p11.1-q11.1) para a análise do paciente A3. Foram analisadas apenas células em metáfase (30 no caso A3 e 50 no A1).

III.2.1.2. Grupo B

Quanto aos pacientes do Grupo B, com quadro clínico e citogenético sugestivo de que o cromossomo marcador supranumerário fosse derivado de um dos cromossomos sexuais, utilizamos sonda CEPX (DXZ1)/CEPY (DYZ1) (Vysis/Abbott), em que o centrômero do cromossomo X (região p11.1-q11.1) é marcado com um sinal fluorescente vermelho e a região heterocromática Yq12 com um sinal fluorescente verde. Foram analisados 100 metáfases e 500 núcleos interfásicos de cada paciente. Neste mesmo grupo, o paciente B5 foi analisado por meio da sonda CEP8, uma vez que há indicações da participação de aberrações envolvendo este cromossomo em alguns casos de síndrome Kabuki (MILUNSKY & HUANG, 2003). Neste caso, foram analisados 50 metáfases e 500 núcleos interfásicos.

III.2.1.3. Grupo C

No Grupo C foi utilizada sonda conjugada LSI WHS/ WOLF-HIRSCHHORN (Vysis/Abbott), que é específica para a região crítica da Síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p16.3). Com o uso dessa sonda, a região 4p16.3 é corada em laranja e o centrômero do

cromossomo 4 (CEP4 – região p11.1-q11.1) em verde. Para esta análise, utilizamos 20 metáfases e 100 núcleos interfásicos de cada paciente.

III.2.1.4. Grupo D

No Grupo D, utilizamos duas das quatro sondas originadas de cosmídeos [B2.1(WT1), P60, FAT5(PAX6) e FO2121] gentilmente cedidas pelo Dr. John A. Crolla do laboratório *Wessex Regional Genetics* e pela Profa Verônica van Heyningen da *MRC Human Genetics Unit* para a investigação de uma possível deleção no gene da aniridia (*paired box gene-6*, *PAX6*), localizado na região 11p13 ou em regiões próximas a ele (Figura 4). As sondas que vieram a ser efetivamente utilizadas foram P60 e FAT5, sendo que esta última representa o gene *PAX6* (CROLLA & HEYNINGEN, 2002). Para essa análise, utilizamos somente metáfases (20 para cada paciente, D e DP).

Neste último caso, as sondas foram obtidas após o cultivo das bactérias *E. coli* (vetor utilizado para inserir os cosmídeos) em 15ml de meio LB com canamicina (30µg/ml), antibiótico utilizado para fazer a seleção das bactérias geneticamente transformadas.

Após deixar que a cultura crescesse por 8 horas em agitação, foram inoculados 15ml de cada cultura em 250ml de meio LB já com o antibiótico, deixando por 12 a 16 horas, também em agitação. Para a extração do DNA contido nas bactérias, foi utilizado o Kit de extração e purificação Nucleobond Low Copy Plasmid/Cosmid/P1/BAC/PAC Purification. Obtido o DNA, a marcação foi feita por meio do Kit de nick-translation (Vysis) com nucleotídeos conjugados com fluoróforos. O cosmídeo FAT5 foi marcado pelo espectro vermelho, e o P60 pelo espectro verde.

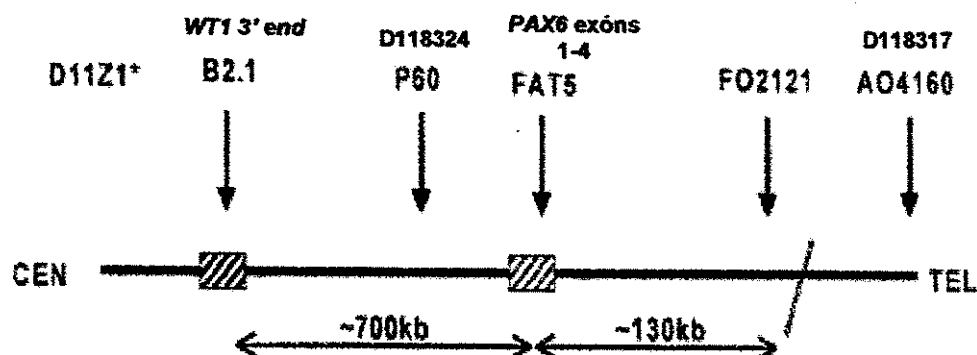


Figura 6: Mapa dos cosmídeos utilizados, gentilmente cedidos por Dr. John A. Crolla e Profa Verônica van Heyningen (CROLLA & HEYNINGEN, 2002).

CEN: centrômero, TEL: telômero.

III.2.2 CGH

Esta técnica, realizada apenas para a análise do paciente D, baseou-se na utilização do DNA do paciente e de um DNA controle (um indivíduo normal). Os DNAs foram obtidos a partir de sangue periférico por meio da técnica de extração por fenol e diluídos em água. Em seguida, foram marcados por *nick-translation*, sendo o DNA teste (do paciente) marcado com biotina e o DNA de referência (controle) com digoxigenina.

Lâminas preparadas a partir de suspensão de leucócitos de sangue periférico de um indivíduo controle (normal) foram submetidas a um pré-tratamento com pepsina. Antes de ser iniciada a desnaturação, as lâminas foram fixadas em solução de formaldeído a 1% por 3 minutos à temperatura ambiente. Na sequência, foram lavadas em 1XPBS por 5 minutos em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanóis (70%, 80% e 100%) por 2 minutos cada.

Na etapa de desnaturação, as lâminas foram incubadas em solução pré-aquecida de formamida 70% e 2XSSC a 70°C por 60 segundos; a seguir, foram desidratadas de imediato em uma série de etanóis gelados (70%, 80% e 100%) por 2 minutos cada. Na hibridação, foram adicionados 30µl de sonda em área previamente selecionada na lâmina; a região foi

coberta com laminula de vidro, vedada com *rubber cement* e incubada em câmara úmida durante 72 horas à temperatura de 37°C.

Após a hibridação, as lâminas foram lavadas três vezes em solução de formamida 50% e 2XSSC a 45°C durante 5 minutos. Em seguida, foi realizado o mesmo processo com solução 2XSSC, sob as mesmas condições. Na sequência, as lâminas foram incubadas com 100µl de solução BSA 3% e Tween 20 0,1% a uma temperatura de 37°C durante 30 minutos; os haptenos das sondas foram detectados com FITC/avidina e rodamina anti-digoxigenina, durante 30 minutos a 37°C. Em seguida, procedeu-se a 3 lavagens das lâminas em 4XSSC e Tween 20 0,1% por 5 minutos cada, aplicação do contra-corante DAPI e, para finalizar, cobertura com laminula. Para a análise, foram capturadas 10 metáfases. As imagens foram obtidas por intermédio do microscópio Olympus BX51 e o *software* utilizado foi Cytovision versão 2.7.

III.2.3 SKY

Todos os pacientes do Grupo A foram analisados pela técnica SKY, uma vez que suas características clínicas não permitiam que se estabelecesse uma hipótese sobre a origem de seus cromossomos marcadores supranumerários. Para isso, assim como na técnica de FISH, foram utilizadas para a preparação das lâminas suspensões de linfócitos de sangue periférico cultivadas para estudo de cariótipo e estocadas em solução de metanol e ácido acético 3:1 a -20°C.

As lâminas sofreram um pré-tratamento antes de se iniciar a desnaturação e a hibridação a fim de eliminar o citoplasma nas células e facilitar o anelamento das sondas. Para isso, foram incubadas em solução de pepsina 0,08% e HCl 0,01M a 37°C por, em média, 3 minutos, e em solução de formaldeído 1% e PBSMgCl₂ à temperatura ambiente por 10 minutos; esses procedimentos foram alternados por lavagem em solução de 1XPBSMgCl₂ à temperatura ambiente por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas em 1XPBS (pH 7,2) à temperatura ambiente por 5 minutos e reidratadas em uma série de etanóis (70%, 85% e 100%) por 2 minutos cada.

A partir de então, foi iniciado o processo de desnaturação das lâminas em formamida 70% e 2XSSC a 70°C por 1 a 2 minutos, seguido de reidratação em série de etanóis gelados (70%, 85% e 100%) por 2 minutos cada. Neste momento, foram aplicados

de 6 a 10µl de *cocktail* de sonda (Human Spectral Karyotyping Reagent - #1 -ASI), seguindo-se cobertura com laminula e vedação com cola especial (*rubber cement*).

Em seguida, as lâminas foram incubadas por toda a noite em uma caixa umedecida a 37°C. Na etapa após a hibridação, foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em solução de formamida 50% e 2XSSC (pH 7,0) a 45°C; 2 vezes por 5 minutos em 1XSSC a 45°C; e 4XSSC e Tween 20 0,1% pH 7,0 à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, foi aplicado um reagente bloqueador de proteínas inespecíficas (#2 – ASI) e as lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara umedecida.

Após 3 lavagens em 4XSSC e Tween 20 0,1% pH 7,0 a 45°C por 5 minutos, foi aplicado o anticorpo Cy5-avidina (#3 – ASI), que detecta seqüências de sondas com biotina, e as lâminas foram incubadas mais uma vez a 37°C por 45 minutos em caixa umedecida. Na seqüência, foram novamente lavadas por 3 vezes em 4XSSC e Tween 20 0,1% pH 7,0 a 45°C por 5 minutos e foi aplicado o anticorpo anti-digoxigenina de rato Cy5.5 (#4 – ASI), que detecta as seqüências de sondas com digoxigenina, incubando-se a 37°C por 45 minutos em caixa umedecida. Pela última vez, foram lavadas por 3 vezes em 4XSSC e Tween 20 0,1% pH 7,0 a 45°C por 5 minutos. Finalmente, foram aplicados 14µl do reagente DAPI-anti-fade (#5 – ASI).

As imagens foram obtidas pelo microscópio de fluorescência Olympus BX60 equipado com o programa Case Date Manager Image Acquisition Expo 21.1 e o *software* para aquisição de imagens ASI - Imagen Acquisition (Spectral Imaging 2.6); para análises de SKY, foi utilizado o *software* ASI – Analysis (SKYView 2.1).

IV. Resultados

A utilização de técnicas de citogenética molecular (FISH, CGH e/ou SKY) permitiu uma caracterização rápida e precisa ou, ao menos, uma interpretação mais aprofundada das aberrações cromossômicas nulissômicas e/ou estruturais em 10 dos 11 pacientes (grupos A e B) em que a citogenética clássica não havia sido suficiente para a correta definição dos segmentos cromossômicos envolvidos devido à falta de um padrão de bandas coerentes e reconhecíveis. Além disso, permitiram a detecção de deleções sub-microscópicas em dois casos (grupo C) e afastaram a hipótese de uma deleção envolvendo o gene *PAX6* no propósito do grupo D. Os resultados obtidos, agrupados de acordo com a técnica e o tipo de sonda utilizada, encontram-se nas Tabelas 5 a 12.

No Grupo A, dentre os seis pacientes com aberrações cromossômicas estruturais, dois apresentavam cromossomos marcadores e os demais eram portadores de adições (nos braços curtos dos cromossomos X, 11 e 9 e na região centromérica do 22). Testados pela técnica de SKY, em todos os casos houve sucesso (parcial ou total) na identificação dos cromossomos envolvidos nas anomalias cromossômicas (Tabela 5).

Os pacientes com adições nos cromossomos 11 e 9 possuíam uma duplicação nos respectivos cromossomos; infelizmente, por esta técnica não foi possível identificar a banda duplicada. Quanto ao paciente com adição no X, tratava-se de uma inversão pericêntrica ou um outro rearranjo deste cromossomo que somente por esta técnica não foi possível identificar com exatidão. No último caso analisado de adição havia, além de uma região de heterocromatina muito grande na região centromérica, a duplicação de alguma banda do próprio cromossomo 22 que também não foi possível identificar.

Quanto aos cromossomos marcadores, um era derivado do cromossomo 15, o que foi confirmado por meio de FISH com a sonda SNRPN (Tabela 6). Além de confirmar o resultado de SKY, esta técnica demonstrou que o fragmento era dicêntrico. O outro cromossomo marcador, por sua vez, mostrou-se pela técnica de SKY como derivado do cromossomo 22. Sua região centromérica era proveniente deste cromossomo, aparentemente em rearranjo com o cromossomo 11; em algumas células analisadas, porém, aparentava ser derivado do cromossomo 15. Na tentativa de obter resultados mais detalhados foi empregada a técnica de FISH, utilizando sonda centromérica do cromossomo 11 e a sonda SNRPN para o cromossomo 15 (Tabelas 6 e 7).

No Grupo B, os quatro pacientes estudados pela técnica de FISH utilizando a sonda CEPX/CEPY apresentavam cromossomos com rearranjos derivados de cromossomos sexuais (Tabela 8); em três deles tratava-se de anéis de X e no outro (B2) foi confirmada a presença de um isocromossomo do braço longo do Y que já havia sido identificado pela técnica de banda G; neste último caso, diferentemente do ocorrido no exame clássico, não foram encontrados cromossomos marcadores ao exame citogenético molecular. Finalmente, no caso do paciente B5, testado não só com a sonda CEP8 (Tabela 9) mas também com a sonda CEPX/CEPY (Tabela 8), não foi possível identificar o cromossomo marcador.

No Grupo C, dois dos nove pacientes que apresentavam sinais clínicos sugestivos da Síndrome de Wolf-Hirschhorn (C1 e C6) apresentaram a deleção na região crítica referente à síndrome (Tabela 10).

O estudo da família do Grupo D iniciou-se com a aplicação da técnica de CGH na análise dos pacientes D e DP a fim de detectar alguma deleção; no entanto, não foi identificada qualquer alteração. Por esse motivo, a família foi analisada por FISH utilizando as sondas provenientes dos cosmídeos P60 e FAT5 com a finalidade de detectar deleção no gene *PAX6*, que determina aniridia isolada (a paciente DM foi utilizada como controle). Não houve qualquer alteração nos dois pacientes, ou seja, eles não apresentavam deleção nessas duas regiões (Tabelas 11 e 12).

A tabela 13 resume todos os achados e as figuras referentes aos resultados estão no anexo 2.

Tabela 5: Resultados de análise por SKY

Grupo A	
Paciente	Cariótipo
A1	47,XY,+del(15)(q?)
A2	46,XX,dup(X)(p?)
A3	47,XX,+der(22)t(11;22)(?:q11.1)
A4	46,XY,dup(11)(p?)
A5	46,XX,dup(9)(p?)
A6	46,XX,22pstk+,der(22)t(22;22)(p13;?)

Tabela 6: Resultados de análise por FISH - sonda LSI SNRPN/CEP 15

Grupo A		
Paciente	Cariótipo	Nº de metáfases
A1	47,XY,+mar.ish inv dup(15)(pterq11.2)(LSI SNRPN -, D15Z1++)	50
A3	47,XX,+mar.ish (LSI SNRPN -,D15Z1-)	31

Tabela 7: Resultados de análise por FISH - sonda CEP11

Grupo A		
Paciente	Cariótipo	Nº de metáfases
A3	47,XX,+mar. ish 11q11.1 -	30

Tabela 8: Resultados de análise por FISH - sonda CEPX/CEPY

A: Análise de metáfases

Grupo B		
Paciente	Cariótipo	Nº de metáfases
B1	45,X[71]/46,X,+mar[29].ish r(X)(p11.1-q11.1)(DXZ1+)	100
B2	45,X[85]/46,X,i(Yq)/46,X,+mar[15].ish i(Y)(q12)(DYZ1++)	100
B3	45,X[66]/46,X,+mar[37].ish r(X)(p11.1-q11.1)(DXZ1+)	103
B4	45,X[18]/46,X,+mar[83].ish del(X)(p11.1-q11.1)(DXZ1+)	101
B5	46,XY/47,XY,+mar.ish (DXZ1-, DYZ1-)	50

B: Análise de núcleos interfásicos

Grupo B							
Paciente	Nº de células	Sinais encontrados					
		%2R	%1R	%1R1G	%1R2G	%3R	%2R1G
B1	515	27,4	72,6				
B2	503	0,6	81,3	13,32	4,77		
B3	512	26	73,4			0,6	
B4	501	72,1	25			3	
B5	500			99,8			0,2

R: sinal fluorescente vermelho; correspondente ao centrômero do cromossomo X; G: sinal fluorescente verde, correspondente à região Yq12

Tabela 9: Resultados de análise por FISH - sonda CEP8

A: Análise de metáfases

Grupo B		
Paciente	Cariótipo	Nº de metáfases
B5	46,XY/47,XY,+mar.ish 8q11.1 -	50

B: Análise de núcleos interfásicos

Grupo B				
Paciente	Nº de células	Sinais encontrados		
		%2G	%1G	%3G
B5	500	98,6	1,2	0,2

G: sinal fluorescente verde, correspondente ao centrômero do cromossomo 8.

Tabela 10: Resultados de análise por FISH - sonda LSI WHS

A: Análise de metáfases

Grupo C		
Paciente	Cariótipo	Nº de metáfases
C1	46,XX.ish del(4)(p16.3)(LSI WHS-)	20
C2	46,XX.ish 4p16.3(LSI WHSx2)	20
C3	46,XX.ish 4p16.3(LSI WHSx2)	20
C4	46,XY.ish 4p16.3(LSI WHSx2)	20
C5	46,XY.ish 4p16.3(LSI WHSx2)	20
C6	46,XY.ish del(4)(p16.3)(LSI WHS-)	20
C7	46,XX.ish 4p16.3(LSI WHSx2)	20
C8	46,XY.ish 4p16.3(LSI WHSx2)	20
C9	46,XY.ish 4p16.3(LSI WHSx2)	20

B: Análise de núcleos interfásicos

Grupo C									
Paciente	Nº de células			Sinais encontrados					
		%1R2G	%1R3G	%2R1G	%2R2G	%2R3G	%2R4G	%3R2G	%4R2G
C1	100	93	2		5				
C2	100			1	94			5	2
C3	100				95	2		1	5
C4	100				96				4
C5	100	2		1	98	2		5	4
C6	100	91	2		7				
C7	100	2			89		2	5	5
C8	100	1		2	83			6	8
C9	100			2	87	1		8	7

R: sinal fluorescente laranja, correspondente à região 4p16.3; G: sinal fluorescente verde correspondente ao centrômero do cromossomo 4

Tabela 11: Resultados de análise por FISH - sonda P60

A: Análise de metáfases

Grupo C		
Paciente	Cariótipo	Nº de metáfases
D	46,XY,t(5;11)(p15.3;q22)mat. ish 11p13(P60 +)	20
DP	46,XY. ish 11p13(P60 +)	20
DM	46,XX,t(5;11)(p15.3;q22). ish 11p13(P60 +)	20

DP: pai do caso índice; DM: mãe do caso índice; [n]: número de metáfases analisadas

Tabela 12: Resultados de análise por FISH - sonda FAT5

A: Análise de metáfases

Grupo C		
Paciente	Cariótipo	Nº de metáfases
D	46,XY,t(5;11)(p15.3;q22)mat. ish 11p13(FAT5 +)	20
DP	46,XY. ish 11p13(FAT5 +)	20
DM	46,XX,t(5;11)(p15.3;q22). ish 11p13(FAT5 +)	20

DP: pai do caso índice; DM: mãe do caso índice; [n]: número de metáfases analisadas

Tabela 13: Resumo dos resultados da avaliação citogenética molecular

Pacientes	Cariótipo convencional	Indicação	Técnica(s) empregada(s)	Resultados	Pacientes	Cariótipo convencional	Indicação	Técnica(s) empregada(s)	Resultados
A1	cromossomo marcador extranumerário	identificação da origem do marcador	SKY e FISH, utilizando sonda SNRPN/CEP 15	inv dup (15)	C1	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	deleção na região 4p16.3
A2	adição no braço curto do cromossomo X	identificação da origem do segmento adicional	SKY	inversão pericêntrica ou outro rearranjo do mesmo cromossomo X	C2	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	não possui deleção nessa região
A3	cromossomo marcador extranumerário	identificação da origem do marcador	SKY e FISH, utilizando sonda SNRPN/CEP 15 e CEP11	rearranjo entre os cromossomos 11 e 22	C3	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	não possui deleção nessa região
A4	adição no braço curto do cromossomo 11	identificação da origem do segmento adicional	SKY	duplicação de alguma banda do cromossomo 11	C4	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	não possui deleção nessa região
A5	adição no braço curto do cromossomo 9	identificação da origem do segmento adicional	SKY	duplicação de alguma banda do cromossomo 9	C5	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	não possui deleção nessa região
A6	adição na região pericentromérica do cromossomo 22	identificação da origem do segmento adicional	SKY	região de heterocromatina aumentada com duplicação de alguma banda do cromossomo 22	C6	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	deleção na região 4p16.3
B1	duas linhagens celulares, uma delas com cromossomo marcador extranumerário	identificação da origem do marcador	FISH, utilizando sonda CEPXY (Yq12)	marcador derivado do cromossomo X	C7	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	não possui deleção nessa região
B2	três linhagens celulares, uma delas com cromossomo marcador extranumerário	identificação da origem do marcador	FISH, utilizando sonda CEPXY (Yq12)	marcador derivado do cromossomo Y	C8	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	não possui deleção nessa região
B3	duas linhagens celulares, uma delas com cromossomo marcador extranumerário	identificação da origem do marcador	FISH, utilizando sonda CEPXY (Yq12)	marcador derivado do cromossomo X	C9	suspeita de deleção na região 4p16.3	verificação da deleção	FISH, utilizando sonda LSI WHS (4p16.3)/ CEP4	não possui deleção nessa região
B4	três linhagens celulares, duas delas com cromossomo marcador extranumerário	identificação da origem do marcador	FISH, utilizando sonda CEPXY (Yq12)	marcador derivado do cromossomo X	D	suspeita de deleção na região 11p	verificação da deleção	FISH, utilizando sondas provenientes dos cosmídeos P60 e FAT5	não possui deleção nessas regiões desses cosmídeos
B5	duas linhagens celulares, uma delas com cromossomo marcador extranumerário	identificação da origem do marcador	FISH, utilizando sonda CEPXY (Yq12) e CEP8	não foi possível descobrir sua origem	DM	suspeita de deleção na região 11p	verificação da deleção	FISH, utilizando sondas provenientes dos cosmídeos P60 e FAT5	não possui deleção nessas regiões desses cosmídeos
					DP	suspeita de deleção na região 11p	verificação da deleção	FISH, utilizando sondas provenientes dos cosmídeos P60 e FAT5	não possui deleção nessas regiões desses cosmídeos

V. Discussão

As aberrações cromossômicas, presentes em 0,5 a 0,6% dos recém-nascidos, são causa freqüente de retardo mental e defeitos congênitos. Embora as aneuploidias sejam identificadas em maior número, as aberrações estruturais também contribuem para uma fração significativa desses casos. Para a investigação dessas anomalias estruturais, as técnicas de citogenética molecular revelaram-se poderosas ferramentas, uma vez que permitem uma visualização mais detalhada de toda a arquitetura genômica, resultando na identificação da origem de fragmentos não identificados, da estrutura de rearranjos cromossômicos complexos, e de pequenas alterações não reconhecíveis pela citogenética clássica.

Em nosso estudo, dos 21 casos-índices 12 tinham anomalias estruturais identificadas pela análise clássica por bandamento G (em um dos casos, o do paciente D, desvinculada do fenótipo) e nove tinham quadro clínico sugestivo da presença de uma anomalia estrutural específica não reconhecível pelas técnicas usuais.

No grupo A, nos pacientes A1 e A3, foi possível definir por SKY a origem do cromossomo marcador. Em A1, o marcador era derivado do cromossomo 15; esta é a origem mais freqüente dos cromossomos marcadores (cerca de 50% do total), sendo o inv dup (15) a forma mais comum (WANDSTRAT & SCHWARTZ, 2000; EGGERMANN *et al.*, 2002). Uma vez que o resultado da análise identificou que o fragmento derivado do cromossomo 15 era dicêntrico, há uma grande possibilidade de tratar-se, de fato, de um inv dup (15) neste caso. Além disso, podemos classificar este CM como pequeno já que não possui a região crítica das SPW/SA.

Segundo SHIM *et al.* (2001), uma das possíveis explicações para este paciente apresentar somente o fenótipo de criptorquidia e dificuldade de reprodução estaria na possibilidade de ocorrer dissomia uniparental de dois cromossomos 15 morfologicamente normais ou de deleção de um dos cromossomos homólogos. Entretanto, análise de *imprinting* não foi realizada nesse paciente pois seus pais já haviam falecido.

No paciente A3, o resultado de SKY revelou um cromossomo marcador derivado de uma translocação entre a região centromérica do cromossomo 22 e parte do cromossomo 11 ou do 15, uma vez que em algumas das 14 metáfases analisadas havia a indicação da presença do cromossomo 15. Sabe-se que na técnica de SKY existe um efeito denominado “sanduíche” em que a sobreposição de fluorocromos derivados de cromossomos diferentes proporciona uma combinação de comprimento de freqüências que pode levar o sistema a identificar a

região como sendo de outro cromossomo (VARELLA-GARCIA, 2004, comunicação pessoal). Por este motivo, foi necessário complementar o estudo com FISH utilizando sondas para os cromossomos 11 e 15; todos esses resultados foram negativos. Embora seja possível haver outra região do cromossomo 15 envolvida no rearranjo, esta hipótese parece ser remota. Por outro lado, o fato de o resultado para a sonda utilizada para o cromossomo 11 também ter sido negativo demonstra apenas que a região presente no cromossomo marcador não é a região centromérica do cromossomo 11, sem descartar a possibilidade do envolvimento de outra região deste cromossomo.

Outro fato que nos leva a acreditar que esta região pertence ao cromossomo 11 é o da origem desse cromossomo marcador e o da semelhança do quadro clínico de A3 com a síndrome der(22)t(11;22). Marcadores der(22)t(11;22) são originados, na maioria dos casos, a partir da segregação 3:1 e de não-disjunção durante a meiose I em portadores de t(11;22) equilibrada (PETKOVIC *et al.*, 1996; KULHARYA *et al.*, 2002), que é a translocação não-Robertsoniana mais freqüente em humanos (EDELMANN *et al.*, 1999; KURAHASHI *et al.*, 2000; HILL *et al.*, 2000; TAPIA-PÁEZ *et al.*, 2001; KULHARYA *et al.*, 2002). O fenótipo dos portadores do cromossomo extra-numerário der(22) t(11;22) consiste, principalmente, em retardo mental moderado, anomalias craniofaciais e defeitos cardíacos congênitos, resultado da trissomia das regiões 11q23-qter e 22pter-q11 (EDELMANN *et al.*, 1999; KURAHASHI *et al.*, 2000; HILL *et al.*, 2000). Embora não tenha sido possível realizar o cariótipo do pai, sendo a mãe cromossomicamente normal e frente à semelhança do quadro clínico de A3 com a síndrome der(22) temos fortes indícios para acreditar que o marcador de A3 seja um cromossomo extra-numerário der(22)t(11;22) de origem paterna. Entretanto, para confirmar essa hipótese será necessário realizar FISH utilizando sondas provenientes de BAC com seqüências das regiões acima mencionadas.

Quanto aos demais pacientes do grupo A, que apresentavam adição detectável pela citogenética clássica nos cromossomos X, 11, 9 e 22, os rearranjos puderam ser identificados ou melhor interpretados por SKY. No caso do paciente com adição no cromossomo X, interpretada pela técnica molecular como uma inversão pericêntrica ou outro rearranjo deste cromossomo, a realização de estudo com bandamento G de alta resolução seria um dos caminhos indicados para observar com maior clareza seu padrão de bandas na tentativa de melhor definir a alteração.

No caso da duplicação do cromossomo 22, pela morfologia do fragmento pode-se supor que se trate de uma duplicação invertida a partir do centrômero, porém para

confirmação teríamos que realizar FISH utilizando uma sonda loco-específica para a região logo abaixo do centrômero. Nos dois últimos casos (referentes aos cromossomos 11 e 9), a técnica de SKY revelou duplicações que não haviam sido corretamente identificadas pela análise clássica. A associação do quadro clínico dos pacientes aos resultados obtidos por SKY e a busca de casos semelhantes relatados na literatura científica pode oferecer mais informações quanto às regiões envolvidas, a fim de que seja possível realizar FISH com sondas loco- específicas para a identificação dessas regiões.

No grupo B, dos 5 pacientes estudados apenas em um não foi possível identificar a origem do cromossomo marcador (B5). Para este paciente, também está indicado um estudo mais detalhado do quadro clínico associado à busca de casos semelhantes na literatura na tentativa de definir uma região ou banda no cromossomo 8 ou em outro cromossomo que permita a realização de FISH de forma mais específica. Estaria indicada, ainda, a realização de SKY ou de FISH com sonda do cromossomo 15, já que 50% dos cromossomos marcadores têm origem neste cromossomo.

No paciente B2 não foram encontradas linhagens com cromossomo marcador, como havia sido observado no exame de cariótipo, mas apenas isocromossomo de braço longo do Y, i(Yq). Neste paciente, pode-se supor que os cromossomos marcadores encontrados por bandamento G fossem, na verdade, i(Yq) não identificados devido à baixa resolução. Outro fato importante a ser discutido em relação a esse paciente é a diferença encontrada entre a análise de núcleos interfásicos, e a análise de metáfases. Na análise de núcleos interfásicos foram encontrados 13% de núcleos com um sinal fluorescente verde, correspondente à região Yq12, e 5% de núcleos com dois sinais, representando o i(Yq). Embora seja possível que os núcleos com um único sinal fluorescente verde sejam correspondentes à linhagem com um Y estruturalmente normal, não detectada na análise de metáfases, esse fato ilustra dificuldades técnicas que podem ocorrer na análise de núcleos interfásicos. De fato, o próprio rearranjo cromossômico apresentado por este paciente pode dificultar a análise, uma vez que os sinais gerados pelas seqüências do isocromossomo, quando parcialmente superpostos ou muito próximos, são frequentemente interpretados como sinais únicos.

De modo semelhante ao que ocorreu no paciente B2, no caso B4, não foram encontradas linhagens com dois cromossomos marcadores, ocorrência que poder ser explicada pela instabilidade desses cromossomos, cuja tendência é de serem perdidos com o passar dos anos durante as sucessivas divisões celulares. Por outro lado, a linhagem com um único cromossomo marcador pôde ser identificada, tendo origem no cromossomo X. Os demais

pacientes, B1 e B3, tiveram seus cromossomos marcadores provenientes do cromossomo X. Nos pacientes B1 a B4, a associação do fenótipo característico aos achados citogenéticos clássicos indicaram com precisão os possíveis cromossomos envolvidos (X e Y), o que foi muito importante para a definição da sonda a ser utilizada.

No grupo C, dos nove pacientes analisados com suspeita de síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH) apenas dois, C1 e C6, apresentavam deleção na região crítica 4p16.3 com o uso da sonda comercial da Vysis®. Entretanto, segundo ZOLLINO *et al.* (2003), esta sonda não é suficiente para detectar todos os pacientes com SWH. A sonda da Vysis® cobre apenas 90Kb do intervalo de 165Kb em 4p16.3 responsável pela região crítica desta síndrome, conhecida como RCSWH. Além disso, esses mesmos autores comprovaram a existência de uma outra região, próxima à RCSWH, que também seria responsável pelo fenótipo típico da SWH associado a convulsões, que não são observadas em pacientes com deleções envolvendo apenas RCSWH. Esta região, RCSWH-2, estaria localizada em um intervalo de 300-600Kb dentro de 4p16.3 logo após RCSWH, e inclui o gene *LETMI* (candidato a responsável pela presença de convulsões).

Entre os pacientes por nós estudados, C5, C6 e C7 apresentavam crises convulsivas; destes, apenas em C6 foi obtido resultado positivo, ou seja, com deleção, utilizando a sonda da Vysis®. Assim sendo, podemos supor que o paciente C6 apresente uma deleção grande, abrangendo as regiões RCSWH e RCSWH-2, o que é muito comum entre os pacientes com SWH (ZOLLINO *et al.*, 2003). Já os outros dois pacientes, C5 e C7, por apresentarem crises convulsivas, são candidatos à realização de FISH com sondas que incluam a RCSWH-2. Quanto aos outros pacientes que também tiveram resultados negativos com sonda da Vysis®, não podemos descartar a hipótese de que haja alterações em uma das regiões não detectadas por essa sonda. Por este motivo, há a necessidade de um estudo mais abrangente a fim de confirmar ou não a suspeita da SWH.

Quanto ao grupo D, mesmo realizando CGH no probando e FISH com sondas provenientes dos cosmídeos P60 e FAT5 em toda a família, não foi detectada deleção do gene *PAX6* responsável pela aniridia no probando e em seu pai; assim sendo, o mais provável é que o quadro ocular seja decorrente de uma mutação intragênica. De todo modo, segundo CROLLA & HEYNINGEN (2002), a análise completa por FISH para detectar todas as deleções na região 11p13 responsáveis pelo fenótipo da aniridia deve incluir não só as sondas provenientes dos cosmídeos B2.1, P60, FAT5 e FO2121, mas também dos cosmídeos A1280,

GO453, C1170 e H1281, que cobrem uma região aproximadamente de 180Kb a 3' do gene *PAX6*.

Um outro aspecto importante a ser observado a partir da análise de núcleos interfásicos nos pacientes que fazem parte desta casuística é a presença de alterações sem relação com a análise de metáfases, e que teoricamente poderiam representar uma aberração que deveria ser investigada. Entretanto, como aparecem em uma frequência baixa, essa diferença é explicada levando-se em conta as fases G1, S e G2 nos núcleos interfásicos. Apesar desses núcleos serem encontrados com maior frequência na fase G1 e S, eles também são encontrados na fase G2, quando os cromossomos aparecem duplicados, o que explica o aparecimento, durante a análise, de sinais duplicados ou resultados inesperados (Varella-Garcia, 2004, comunicação pessoal). A figura que explica este evento está no anexo 2.21.

Neste trabalho, portanto, pôde ser observada a grande aplicabilidade dos estudos de citogenética molecular à investigação de anomalias cromossômicas estruturais. Os resultados dessa investigação dependem, porém, não só de uma análise clínica prévia extensa e aprofundada, de modo a indicar a técnica mais adequada a cada caso (e, quando estiver indicado o FISH, a sonda a ser utilizada), mas também da qualidade do exame citogenético clássico com bandamento G. O trabalho interdisciplinar é, portanto, fundamental em todos os casos.

VI. Conclusões

As técnicas de citogenética molecular são ferramentas poderosas para a resolução de casos que não podem ser solucionados pelas técnicas clássicas, particularmente quando sua utilização é precedida de análise clínica e de exame citogenético clássico adequados.

As técnicas de FISH e SKY são realmente de grande auxílio na identificação precisa ou, ao menos, na interpretação mais aprofundada de rearranjos cromossômicos numéricos e estruturais; os resultados são mais evidentes nos casos em que já existe suspeita prévia do(s) cromossomo(s) envolvido(s) nesses rearranjos.

Dois dentre nove indivíduos com quadro clínico sugestivo da síndrome de Wolf-Hirschhorn (deleção do braço curto do cromossomo 4) cujo exame de cariótipo clássico havia tido resultado normal apresentavam, de fato, ao estudo com FISH, deleção da região crítica 4p16.3 com a sonda utilizada. Quanto aos demais casos, a análise de outra região crítica no braço curto do cromossomo 4 é necessária para completar a investigação.

A análise, por CGH e FISH, de uma família em que há coincidência, no propósito, de aniridia e translocação equilibrada (herdadas pelo lado paterno e materno, respectivamente) não detectou deleção do gene *PAX6* (responsável pela aniridia) com as sondas utilizadas, o que sugere mais provavelmente uma mutação intragênica.

VII. Referências bibliográficas

- ABULHASAN, S. J.; TAYEL, S. M.; AL-AWADI, S. A. et al. Mosaic Turner syndrome: cytogenetics versus FISH. **Ann Hum Genet** **63**: 199-206, 1999.
- ÁLVARES-NAVA, F.; SOTO, M.; MARTÍNEZ, M. C.; PRIETO, M. et al. FISH and PCR analyses in three patients with 45,X/46,X,idic(Y) karyotype: clinical and pathologic spectrum. **Ann Génèt** **46**: 443-448, 2003.
- BAYANI, J.; SQUIRE, J.A. Advances in the detection of chromosomal aberrations using spectral karyotyping. **Clin Genet** **59**: 65-73, 2001.
- BAYANI, J. M.; SQUIRE, J.A. Applications of SKY in cancer cytogenetics. **Cancer Invest** **20(3)**: 373-386, 2002.
- BUGGE M.; BRUUN-PETERSEN G.; BRONDUM-NIELSEN K. et al. Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. **J Med Genet** **37**:858-865, 2000.
- CANTO, P., KOFMAN-ALFARO, S.; JIMÉNEZ, A. L. et al. Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences. **Cancer Genet Cytogenet** **150**: 70-72, 2004a.

- CANTO, P.; GALICIA, N.; SÖDERLUND, D. et al. Screening for mutations in the SRY gene in patients with mixed gonadal dysgenesis or with Turner syndrome and Y mosaicism. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 115: 55-58, 2004b.
- COCKWELL, A. E.; DÁVALOS, I. P.; RIVERA, H. R. et al. FISH characterization of dynamic mosaicism involving an inv dup(15) in patient with mental retardation. **Am J Med Genet** 103: 289-294, 2001.
- COLLINS, F.S.: Positional cloning moves from perditional to traditional. **Nat Genet** 9(4):347-50, 1995.
- CROLLA, J. A.; CAWDERY, J. E.; OLEY, C. A. et al. A FISH approach to defining the extent and significance of deletions at the WAGR locus. **J Med Genet** 34: 207-212, 1997.
- CROLLA, J. A.; HEYNINGEN, V. Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. **Am J Hum Genet** 71: 1138-1149, 2002.
- EDELMANN, L.; SPITERI, E.; MCCAIN, N. et al. A common breakpoint on 11q23 in carriers of the constitutional t(11;22) translocation. **Am J Hum Genet** 65: 1608-1616, 1999.
- EGGERMANN, K.; MAU, U. A.; BUJDOSÓ, G. et al. Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. **Clin Genet** 62: 89-93, 2002.

- EMANUEL, B.S.; SHAIK, T.H. Segmental duplications: an “expanding” role in genomic instability and disease. **Nat Genet 2**: 791-800, 2001, review.
- FAN, Y. S.; SIU, V. M.; JUNG J. H. et al. Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements. **Genet Test 4**: 9-14, 2000.
- FERNÁNDEZ-GARCIA, R.; GARCIA-DOVAL, S.; COSTOYA, S. et al. Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of “hidden” mosaicism. **Clin Genet 58**: 201-208, 2000.
- GIBBONS, B.; TAN, S.; YU, C. et al. Risk of gonadoblastoma in female patients with Y chromosome abnormalities and dysgenetic gonads. **J Paediatr Child Health 35**: 210-213, 1999.
- HADDAD, B. R.; SCHRÖCK, E.; MECK, J. et al. Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. **Hum Genet 103**: 619-625, 1998.
- HILL, A.S.; FOOT, N.J.; CHAPLIN, T.L. et al. The most frequent constitutional translocation in humans, the t(11;22)(q23;q11) is due to a highly specific Alu-mediated recombination. **Hum Mol Genet 9(10)**: 1525-1532, 2000.
- JR. LLRENA, J. C.; CABRAL DE ALMEIDA, J. C.; BASTOS, E. et al. FISH studies in girl with sporadic aniridia and an apparently balanced *de novo* t(11;13)(p13;q23) translocation detect a microdeletion involving the WAGR region. **Genet Mol Biol 23(3)**: 535-539, 2000.
- KEARNEY, L. Molecular cytogenetics. **Best Pract Res Clin Haematol 14(3)**: 645-668, 2001.

- KIM, K.; KWON, Y; JOUNG, J. Y. et al. True hermaphroditism and mixed gonadal dysgenesis in young children: a clinicopathologic study of 10 cases. **Mod Pathol** **15(10)**: 1013-1019, 2002.
- KULHARYA, A.S.; LOVELL, C.M.; FLANNERY, D.B. Unusual mosaic karyotype resulting from adjacent 1 segregation of t(11;22): importance of performing skin fibroblast karyotype in patients with unexplained multiple congenital anomalies. **Am J Med Genet** **113**: 367-370, 2002.
- KURAHASHI, H.; SHAIKH, T.H.; HU, P. et al. Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). **Hum Mol Genet** **9(11)**: 1665-1670, 2000.
- LUPSKI, J. R. Genomic disorders: structural features of genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. **Trends in Genet** **14(10)**:417-422, 1998, review.
- YARON, Y.; CARMON, E.; GOLDSTEIN, M. et al. The clinical application of spectral karyotyping (SKY) in the analysis of prenatally diagnosed extra structurally abnormal chromosomes (ESACs). **Prenat Diagn** **23**: 74-79, 2003.
- YONGGANG, J.; EICHER, E. E.; SCHWARTZ, S. et al. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. **Genome Res** **10**: 597-610, 2000, review.

- MARCELIS, C.; SCHRANDER-STUMPEL, C.; ENGELEN, J. et al. Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome in adults. **Genet Couns** **12**: 35-48, 2001.
- MILUNSKY, J. M.; HUANG, X.L. Unmasking Kabuki syndrome: chromosome 8p22-8p23 duplication revealed by comparative genomic hybridization and BAC-FISH. **Clin Genet** **64(6)**: 509-516, 2003.
- McNEIL, N.; RIED, T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. Disponível em: < <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk> > Acesso em setembro 2000.
- MUTO, R.; YAMAMORI, S.; OHASHI, H. et al. Prediction by FISH analysis of the occurrence of Wilms tumor in aniridia patients. **Am J Med Genet** **108**: 285-289, 2002.
- NAOMICHI, M.; NIIKAWA, N. Kabuki make-up syndrome: a review. **Am J Med Genet** **117C**: 57-65, 2003.
- NAUSSBAUM, R. L.; McINNES, R.R.; HUNGTINGTON, F.W. **Genética Médica**. Cap 9, sixth edition, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.
- NESS, G. O.; LYBAEK, H.; HOUGE, G. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. **Am J Med Genet** **113**: 125-136, 2002.
- RANKE, M. B.; SAENGER, P. Turner's syndrome. **Lancet** **358**: 309-314, 2001.

- RIGOLA, M. A.; CARRERA, M.; RIBAS, I. et al. A comparative genomic hybridization study in a 46, XX male. **Fertil Steril** **78(1)**: 186-188, 2002.
- ROBINSON, W. P.; McFADDEN, D. E., STEPHENSON, M. D. The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. **Am J Hum Genet** **69**: 1245-1254, 2001.
- RÖPKE, A.; PELZ, A.; VOLLETH, M. et al. Sex chromosomal mosaicism in the gonads of patients with gonadal dysgenesis, but normal female or male karyotypes in lymphocytes. **Am J Obstet Gynecol** **190**: 1059-1062, 2004.
- RUBIO, C.; SIMÓN, C.; VIDAL, F. et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. **Hum Reprod** **18(1)**: 182-188, 2003.
- SCHRÖCK, E.; VELDMAN, T.; PADILLA-NASH, H. et al. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. **Hum Genet** **101**: 255-262, 1997.
- SHAFFER, L. G.; LUPSKI, J. R. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. **Annu Rev Genet** **34**: 297-329, 2000.
- SHAW, C. J.; LUPSKI, J. R. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. **Hum Mol Genet** **13(1)**: R57-R64, 2004, review.
- SHIM, S. H.; LEE, C.; PARK, Y. J. et al. Two inv dup (15) chromosomes in a woman with repeated abortions. **Am J Med Genet** **104**: 303-306, 2001.
- SYRROU, M.; BORGHGRAEF, M.; FRYNS, J.P. Unusual chromosomal mosaicism in Wolf-Hirschhorn syndrome. **Am J Med Genet** **104**: 199-203, 2001.

- STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. **Trends in Genet** 18(2): 74-82, 2002a, review.
- STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. **Curr Opin Genet Develop** 12: 312-319, 2002b.
- STANKIEWICZ, P.; SHAW, C. J. DAPPER, K. W. et al. Genome architecture catalyses nonrecurrent chromosomal rearrangements. **Am J Hum Genet** 72: 1101-1116, 2003.
- STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. Cap. 2, segunda edição, Ed. Artmed, São Paulo, 2002.
- TANEMURA, M.; SUZUMORI, K., NISHIKAWA, N. et al. Multicolour spectral karyotyping for complex chromosomal rearrangements in repeated abortion or congenital anomalies. **Prent Diagn** 21: 1123-1128, 2001.
- TAPIA-PÁEZ, I.; KOST-ALIMOVA, M. HU, P. et al. The position of t(11;22)(q23;q11) constitutional translocation breakpoint is conserved among its carriers. **Hum Genet** 109: 167-177, 2001.
- THERMAN, E.; MILLER, O. J. **Human Chromosomes**. Cap 11, fourth edition, Ed. Springer-Verlag, New York, 2000.
- TOMMERUP, N. Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with Mendelian Disorders. **J Med Genet** 30:713-27, 1993.
- TRASK, B. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. **Nat Genet** 3: 769-778, 2002, review.

- ZANKL, A.; ADDOR, M.C.; MAEDER-INGVAR, M. et. al. A characteristic EEG pattern in 4p-syndrome: case report and review of the literature. **Eur J Pediatr** **160**: 123-127, 2001.
- ZOLLINO, M.; LECCE, R.; FISCHETTO, R. et al. Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSRC-2. **Am J Hum Genet** **72**: 590-597, 2003.
- WANDSTRAT, A. E.; SCHWARTZ, S. Isolation and molecular analysis of inv dup(15) and construction of a physical map of a common breakpoint in order to elucidate their mechanism of formation. **Chromosoma** **109**: 498-505, 2000.
- WIRTH, J.; NOTHWANG, H. G.; VAN DER MAAREL, S. et al. Systematic characterization of disease associated balanced chromosome rearrangements by FISH: cytogenetically and genetically anchored YACs identify microdeletions and candidate regions for mental retardation genes. **J Med Genet** **36**(4): 271-8, 1999.

VIII. Anexos

Anexo 1 - Composição de todas as soluções

Soluções

Etanol 100%

50 ml

Etanol 85%

42,5 ml etanol 100%

7,5 ml água destilada estéril

Etanol 70%

35 ml etanol 100%

15 ml água destilada estéril

Ácido acético 70%

35 ml ácido acético 100%

15 ml água destilada estéril

Solução 20xSSC pH 5,3 – Solução mãe

175,34 g NaCl;

88,24 g citrato de sódio;

Dissolver o NaCl e o citrato de sódio em 800 ml de água destilada, ajustar o pH com HCl 1M e depois colocar 200 ml de água destilada (volume final 1000 ml) ajustando novamente o pH para 5,3, filtrar e conservar em geladeira (2 °C – 8°C). Descartar após 6 meses.

Solução 2xSSC

10 ml 20xSSC;

90 ml água destilada estéril;

Misturar 10 ml 20xSSC pH 5,3 com 85 ml água destilada estéril, ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M e depois colocar 5 ml de água destilada estéril (volume final 100 ml). Conservar em geladeira (2 °C – 8 °C). Descartar após 6 meses. Obs.: receita para duas vezes.

Solução PBS 10X pH 7,4 (Solução mãe)

80 g NaCl;

2 g KCl;

14,4 g Na₂HPO₄;

2,4 g KH₂PO₄;

Dissolver todos os reagentes até 1l de água destilada, ajustar o pH com HCl 1M , filtrar e conservar em geladeira (2 °C – 8 °C). Descartar após 6 meses.

Solução PBS 1X pH 7,2

900 ml de água destilada;
100 ml de PBS 10X pH: 7,4

Solução HCl 0,01M

0,5 ml de HCl 1M;
49,5 ml de água destilada
Misturar bem

Solução Ácido acético 70%

28 ml de ácido acético;
12 ml de água destilada
Misturar bem

Solução Formaldeído 1%/ PBS 1X

1,35 ml de 37% formaldeído;
50 ml de PBS 1X pH: 7,2
Misturar bem

Solução 0.08% pepsina/ HCl 0,01M

50 µl de pepsina 8% (solução mãe);
50 ml de HCl 0,01M
Misturar bem

Solução 50% de formamida / 2xSSC pH: 5,4

75 ml formamida;
60 ml água destilada estéril;
15 ml solução 20xSSC;
Ajustar o pH com HCl 1M para pH: 7,0;
Descartar após o uso.

Solução 2xSSC pH: 7,0/ 0.1% NP-40

50 ml de 2xSSC;
0,2 ml de 25% NP-40

Solução PBS 1X/ MgCl₂

95 ml de PBS 1X;
5 ml de MgCl₂ 1M

Solução Formaldeído 1%/ PBS 1X/ MgCl₂

1,35 ml de 37% formaldeído;
50 ml de PBS/ MgCl₂

Solução Formamida 70%/ 2xSSC pH: 7,0

35 ml formamida;
10 ml água destilada estéril;

5 ml solução 20xSSC pH: 5,4;
Ajustar o pH com HCl 1M para pH: 7,0;
Descartar após o uso.

Solução 4xSSC/ 0,1% Tween 20 pH: 7,0

400 ml água destilada estéril;
100 ml solução 20xSSC
0,5 ml de Tween 20.

Solução Biotina 10X dNTPs

1,0 µl BSA (100mg/ ml);
10 µl 1M β-mercaptoetanol;
50 µl 1M Tris;
5 µl 1M MgCl;
25 µl 0,4 mM Biotina 14-dATP (GIBCO BRL)
1 µl 10 mM dATP
2 µl 10 mM dCTP
2 µl 10 mM dGTP
2 µl 10 mM dTTP
Água bidestilada

Solução Digoxigenina 20X dNTPs

25 µl 1 mM Dig 11-dUTP
7,7 µl 10 mM dATP
7,7 µl 10 mM dCTP
7,7 µl 10 mM dGTP
5 µl 10 mM dTTP
Água bidestilada

Solução Tampão 10X de incubação Digoxigenina

5 ml 1 mM Tris pH: 7,5
0,5 ml 1M MgCl
1,0 ml β-mercaptoetanol
10 µl BSA (100mg/ml)
Água bidestilada

Solução DNase I

Diluição 1 (1/100)
1 µl solução mãe DNase I
99 µl tampão de diluição DNase I

Diluição 2 (1/1000)
10 µl solução diluição 1 DNase I
90 µl tampão de diluição DNase I

Solução 3% BSA/ 4xSSC/ 0,1% Tween 20

500 µl Tween 20

15g BSA

100 ml 20xSSC

500 ml água destilada

Anexo 2 – Imagens das análises de citogenética molecular

Anexo 2.1: Paciente A1

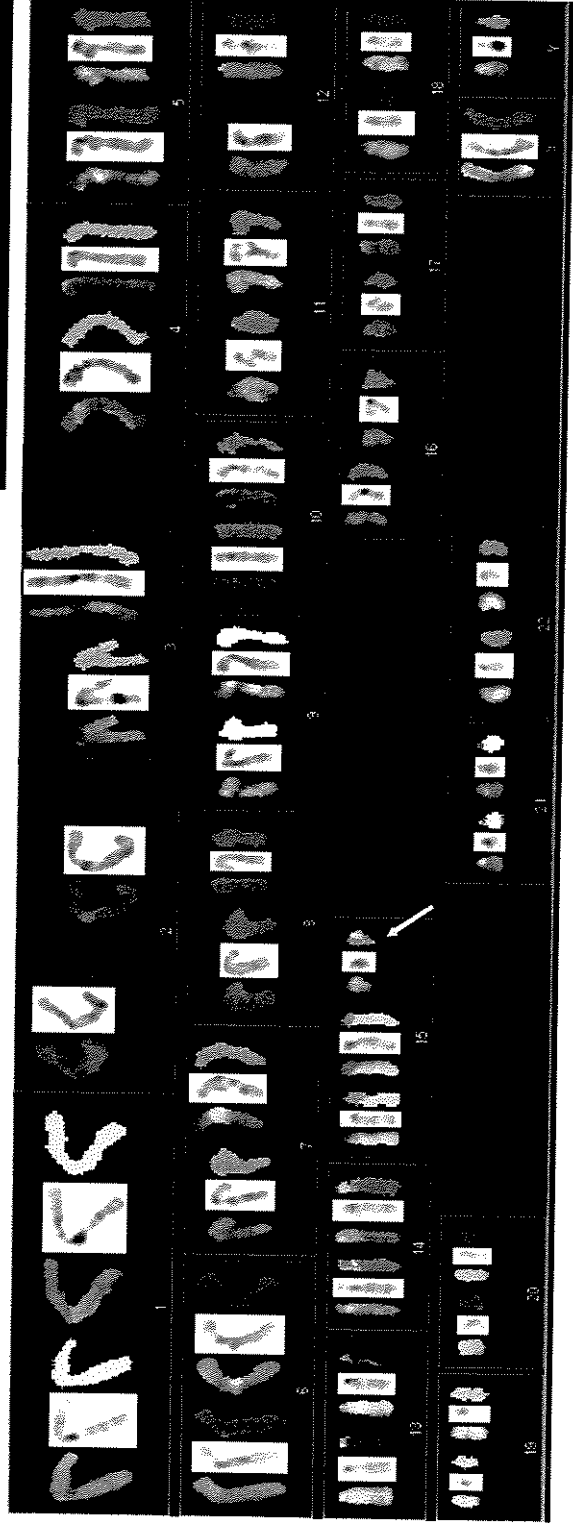
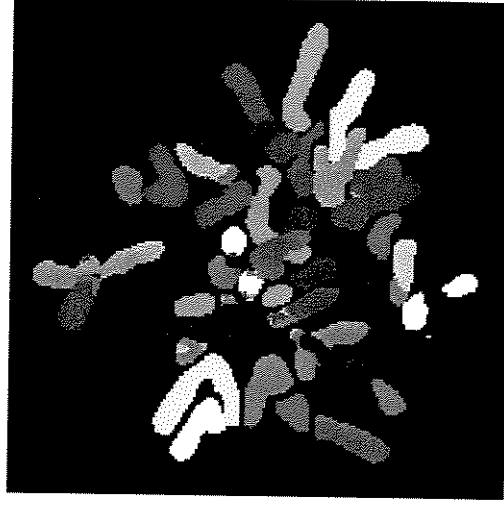
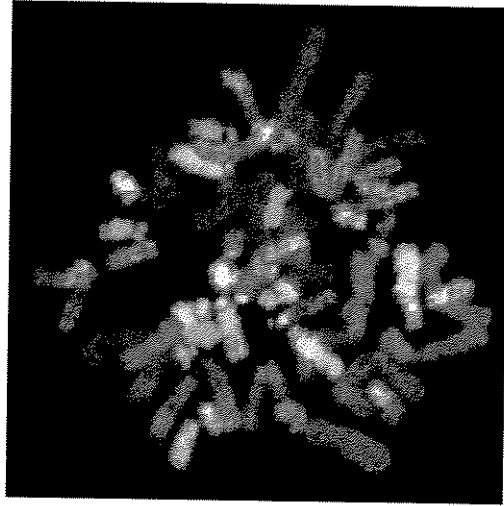


Imagem de uma metáfase inteira, utilizando técnica de SKY. A seta indica o cromossomo marcador.

Anexo 2.2: Paciente A1

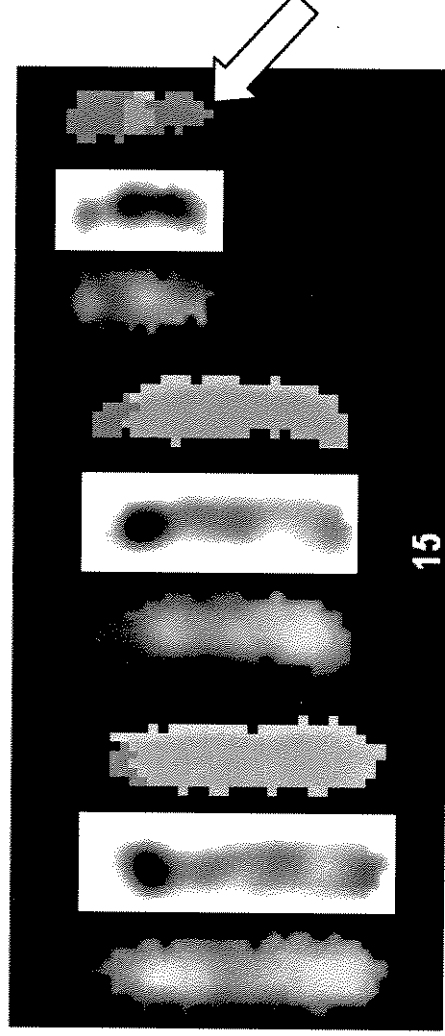


Imagem dos cromossomos 15 e cromossomo marcador, utilizando a técnica de SKY. A seta indica o cromossomo marcador. As regiões em rosa referem-se à região centromérica, muito comum aparecer em rosa neste cromossomo, e a região em verde refere-se a região eucromática deste cromossomo.

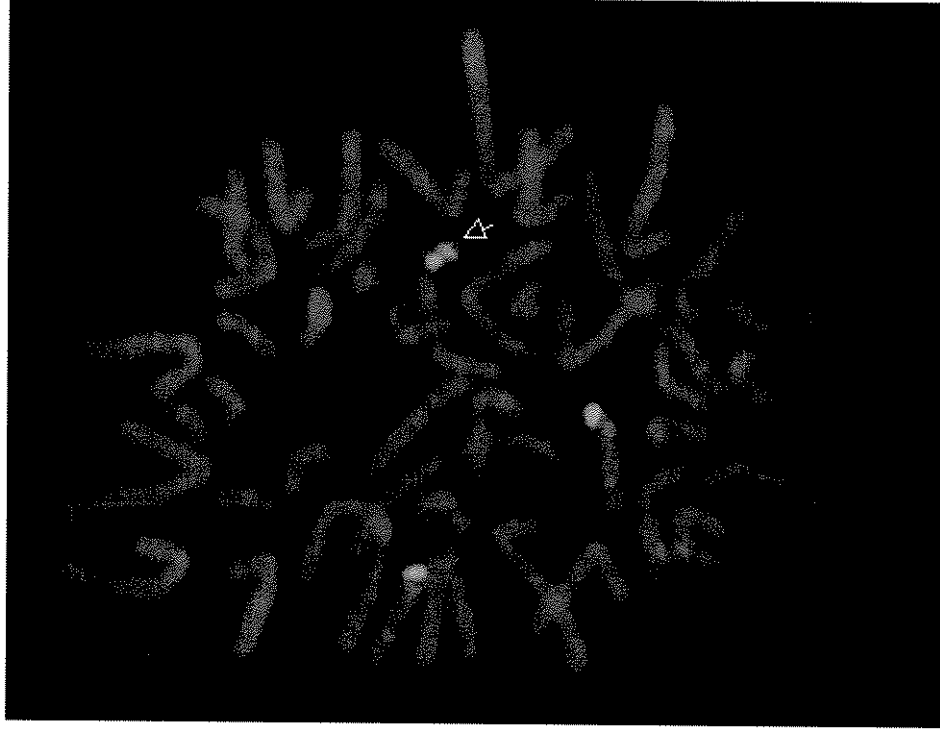


Imagem obtida por FISH, utilizando sonda SNRPN. A seta indica o cromossomo marcador marcado na região 15p11.2.

Anexo 2.3: Paciente A2

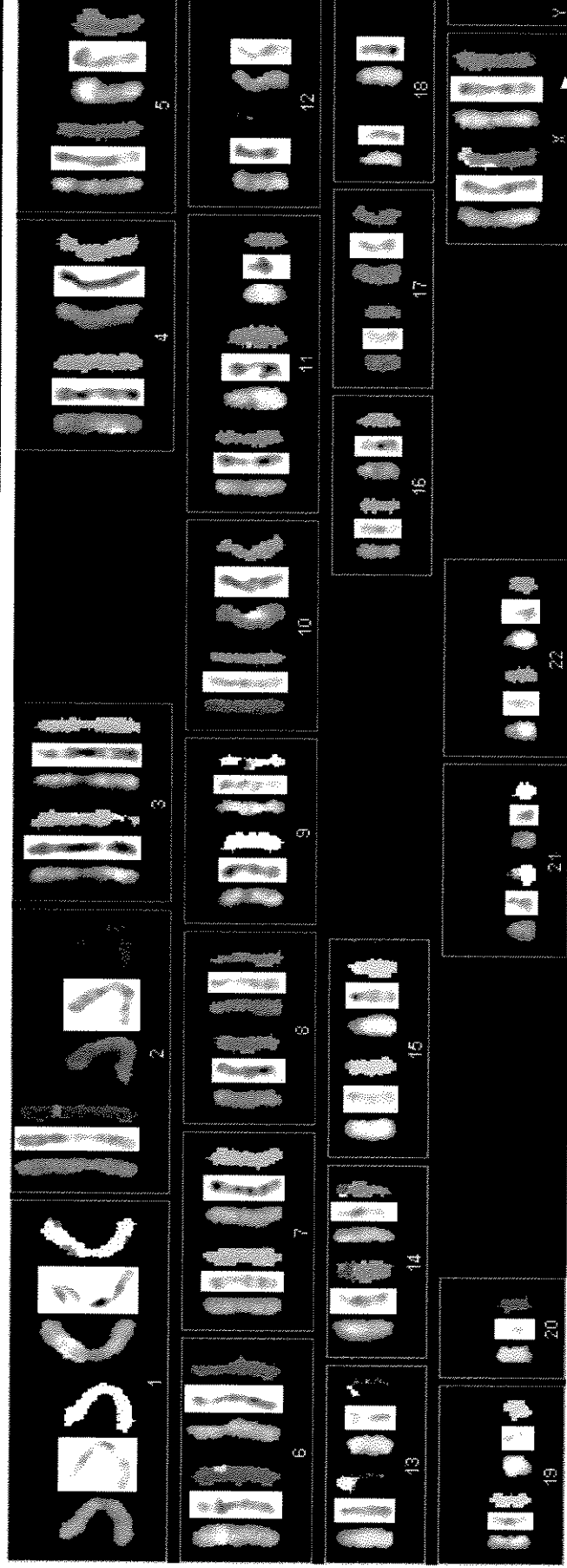
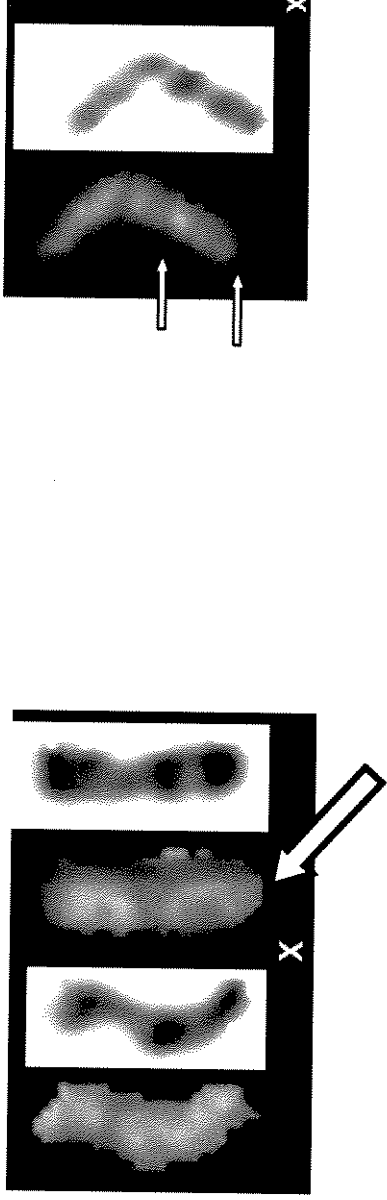


Imagem de metáfase inteira, utilizando técnica de SKY. A seta indica o cromossomo X com uma alteração. Por esta técnica o cromossomo X aparece com uma banda rosa na extremidade do braço curto e na mesma posição da banda Xq21. No entanto, neste cromossomo (indicado pela seta) a banda comum na extremidade do braço curto, aparece na extremidade do braço longo, o que indica um possível inversão ou um outro rearranjo que não foi possível identificar por esta técnica.

Anexo 2.4: Paciente A2



A seta indica o cromossomo X com uma alteração. Por esta técnica o cromossomo X aparece com uma banda rosa na extremidade do braço p e na mesma posição da banda Xq21. No entanto, neste cromossomo (indicado pela seta) a banda comum na extremidade do braço p, aparece na extremidade do braço q, o que indica um possível inversão ou um outro rearranjo que não foi possível identificar por esta técnica. Na primeira imagem mostra visivelmente a extremidade rosa no cromossomo alterado. Além disso, conseguimos observar por banda G, que há uma alteração no tamanho do braço p em relação ao outro cromossomo X. Na segunda imagem conseguimos observar as duas bandas rosas no cromossomo X.

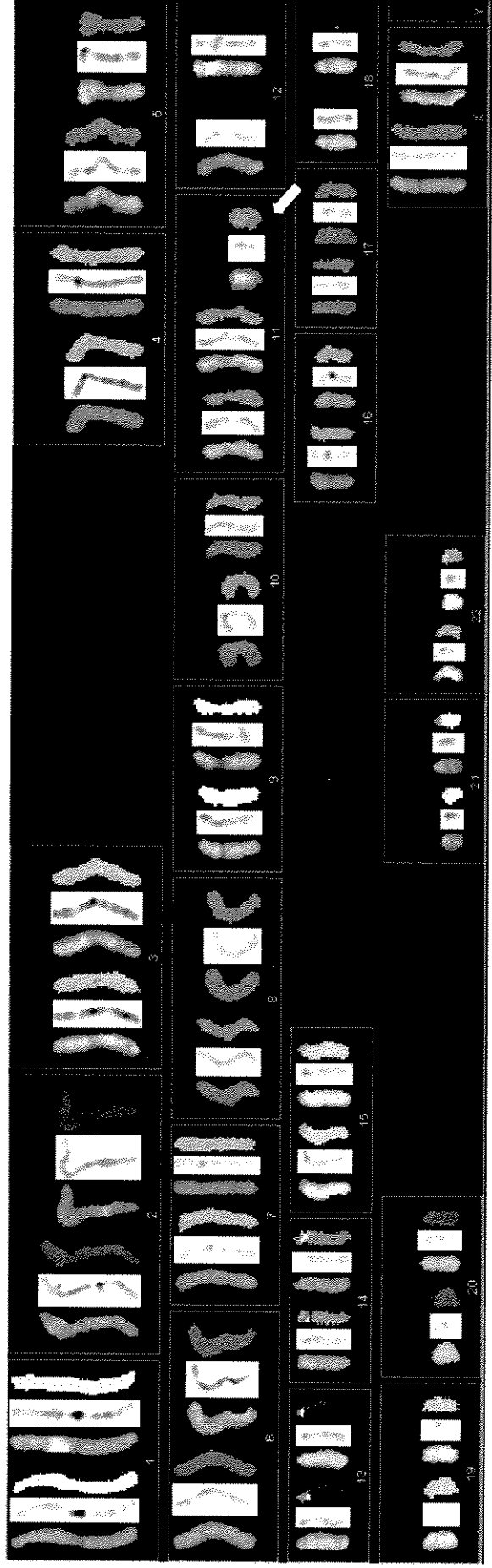
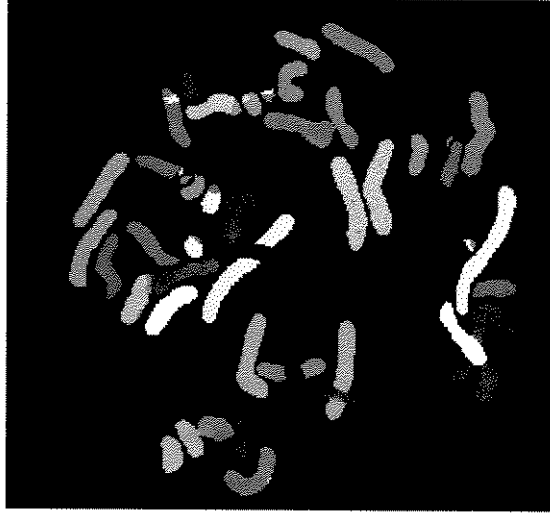
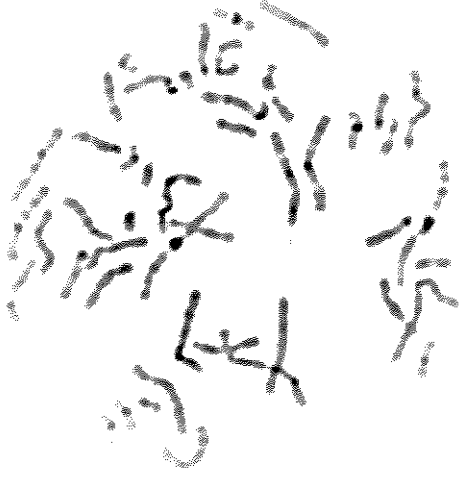
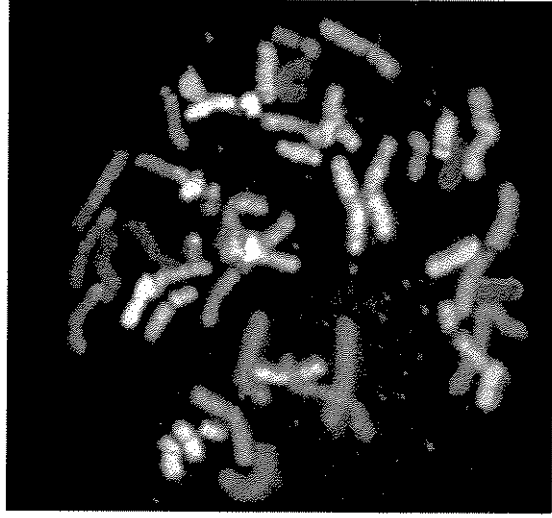


Imagem de metáfase inteira, utilizando técnica de SKY. A seta indica o cromossomo marcador. Este marcador apresenta um derivado da $t(11,22)$.

Anexo 2.6: Paciente A3

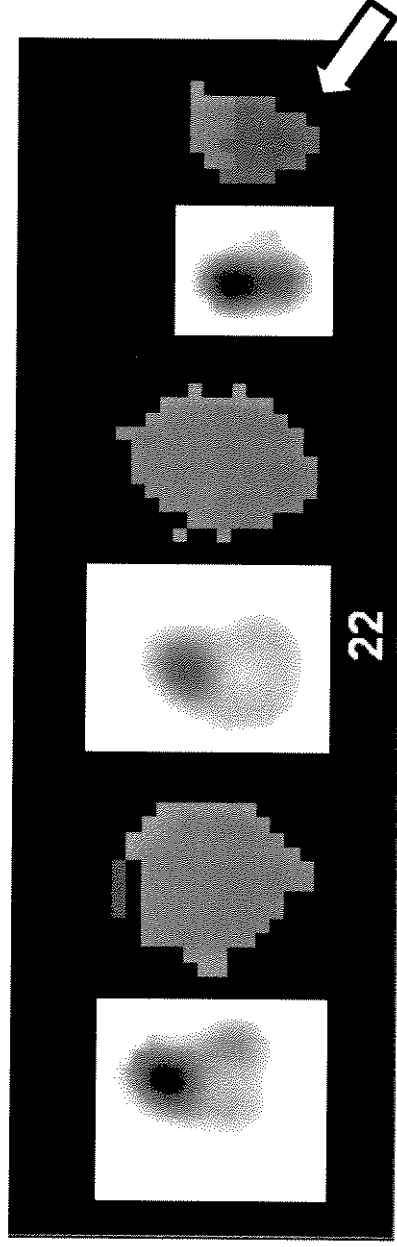


Imagem dos cromossomos 22 e do cromossomo marcador, utilizando técnica de SKY. A seta indica o cromossomo marcador. A região em rosa refere-se ao cromossomo 22 e a em azul ao cromossomo 11.

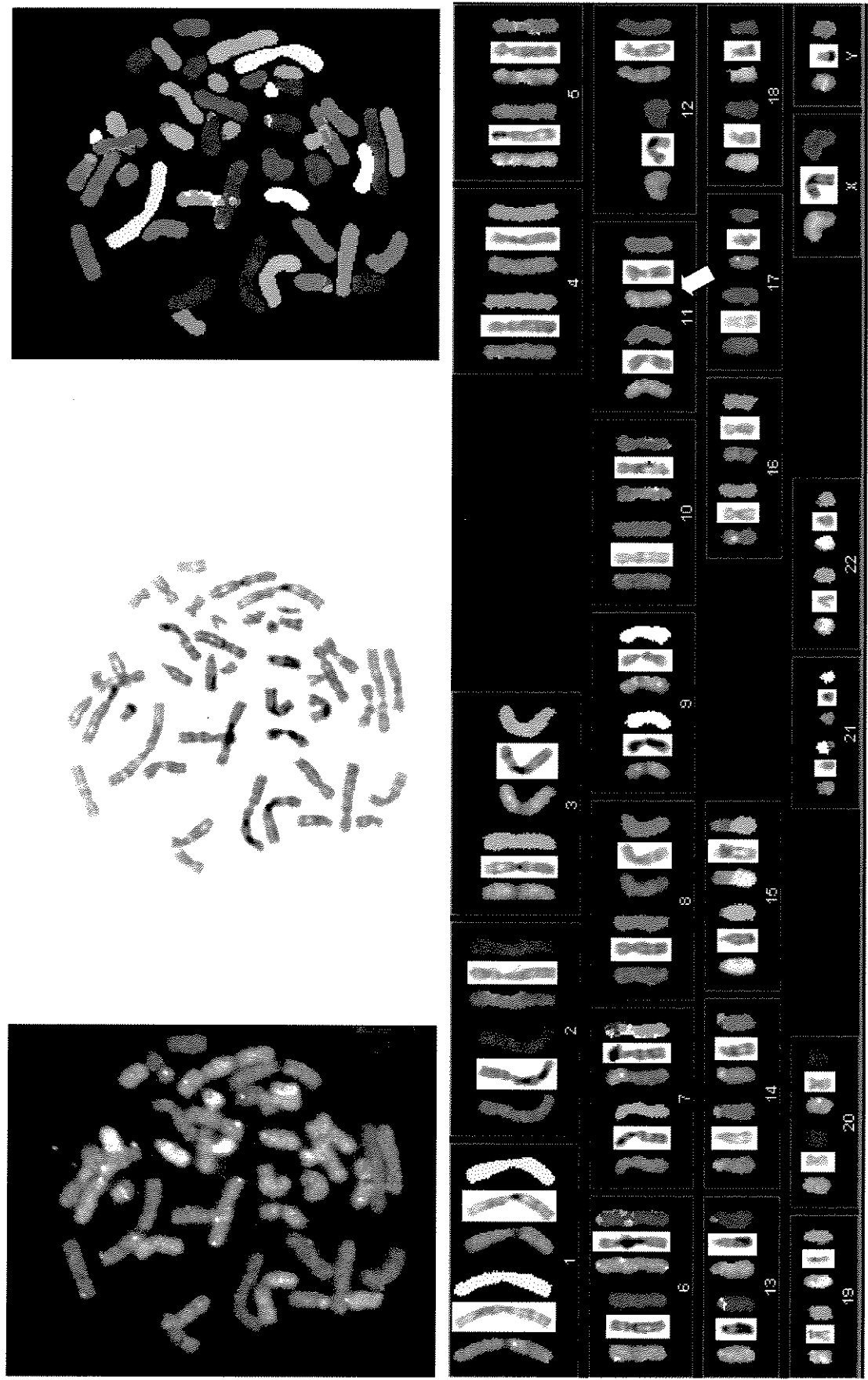


Imagem de metáfase inteira, utilizando técnica de SKY. A seta indica os cromossomo 11. Não há qualquer alteração de cor, o que mostra que se tratar de uma duplicação.

Anexo 2.8: Paciente A4

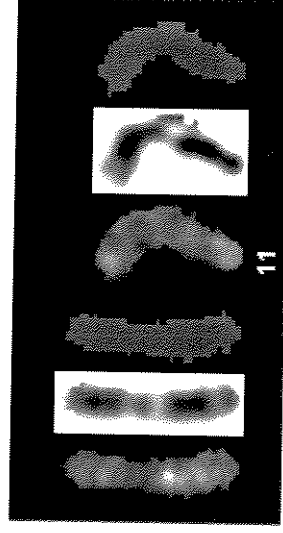


Imagem dos cromossomos 11, utilizando técnica de SKY. Não há alteração de cor em nenhum deles o que indica que o material adicional é proveniente do próprio cromossomo 11, ou seja, é uma duplicação.

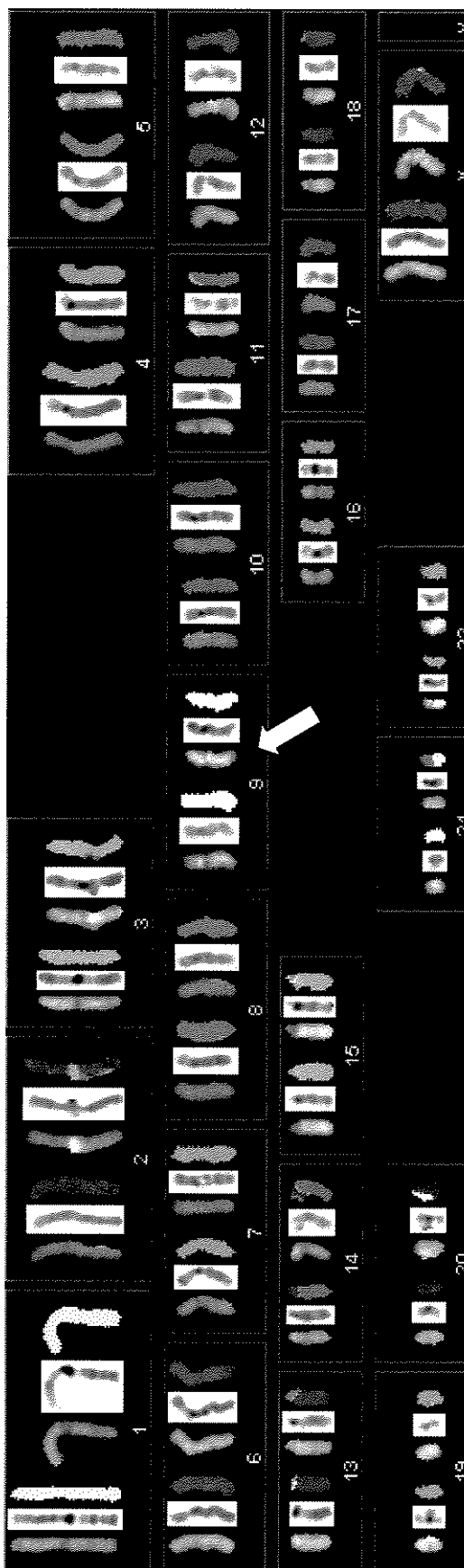
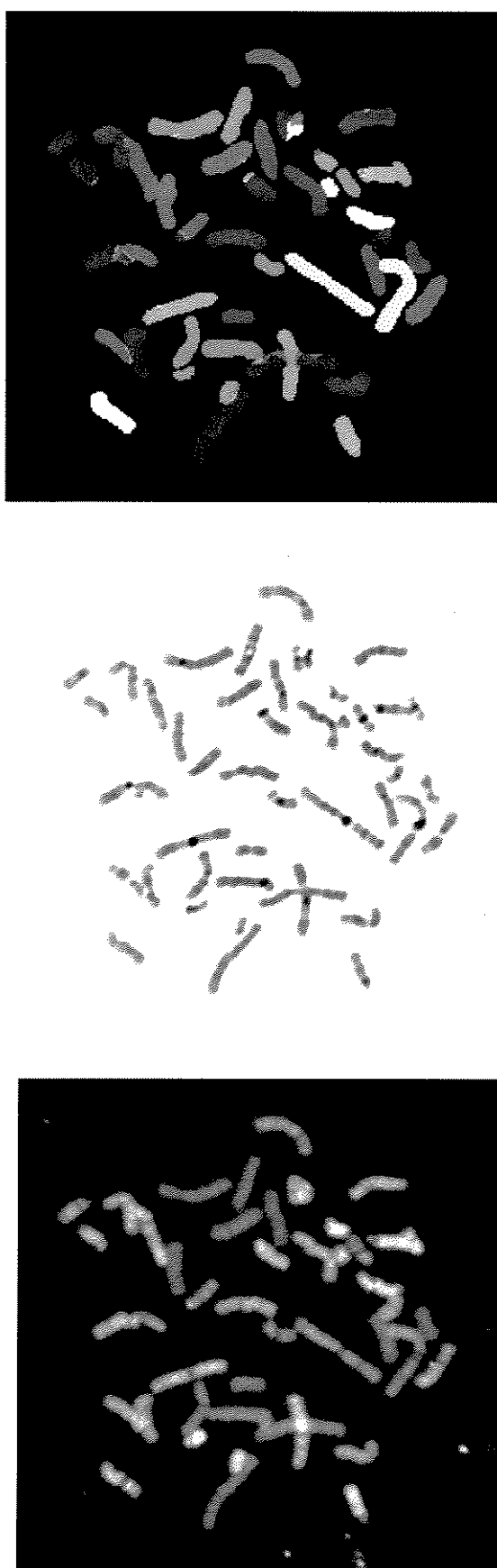


Imagem de metáfase inteira, utilizando técnica de SKY. A seta indica os cromossomos 9 sem qualquer alteração de cor. Portanto, o material adicional encontrado por banda G é proveniente do próprio cromossomo 9, ou seja, trata-se de uma duplicação.

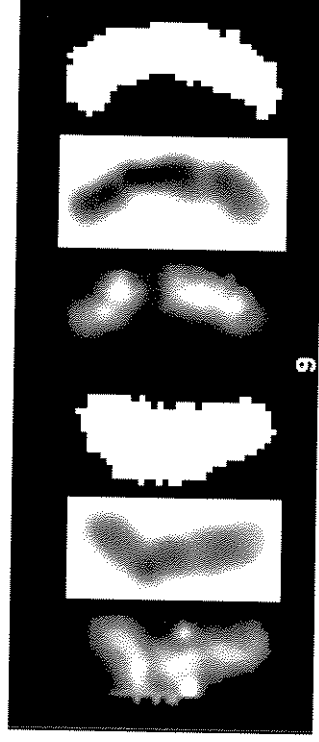


Imagem dos cromossomos 9, utilizando técnica de SKY. Observe que não há alteração de cor, indicando trata-se de um material adicional proveniente do cromossomo 9.

Anexo 2.11: Paciente A6

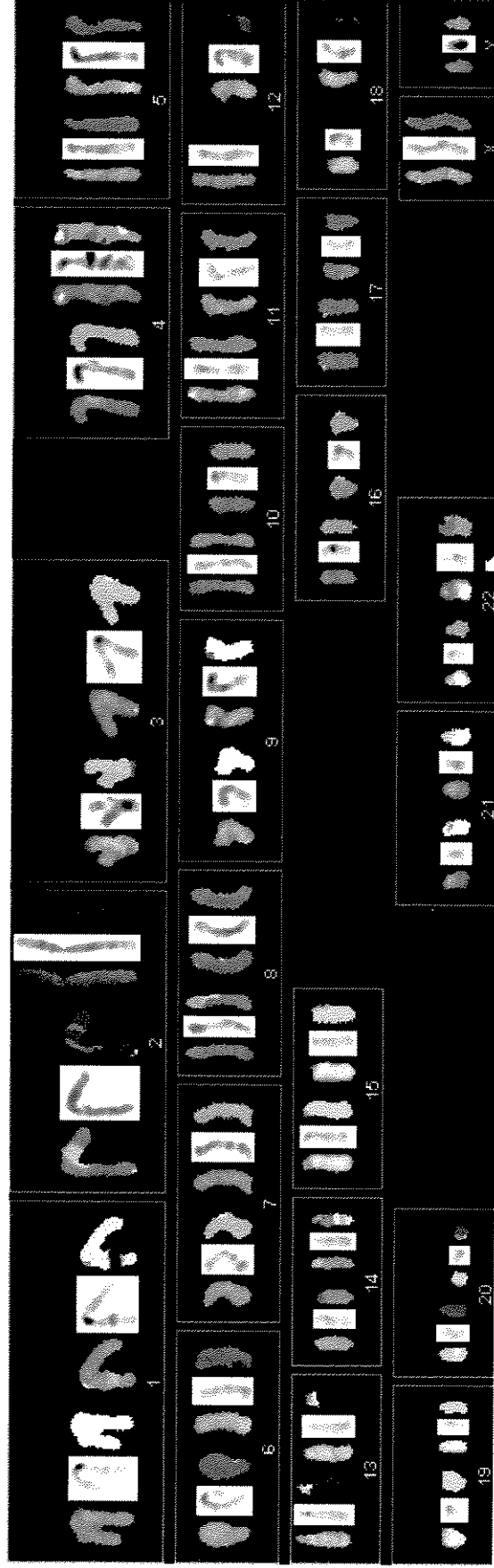
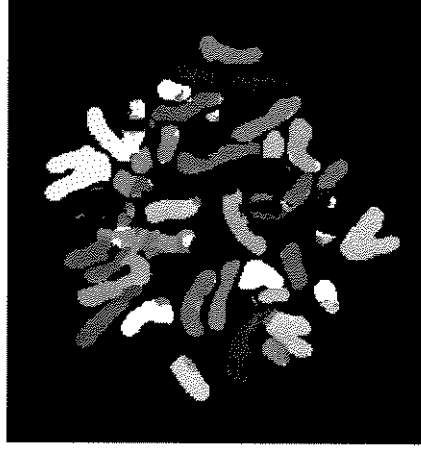
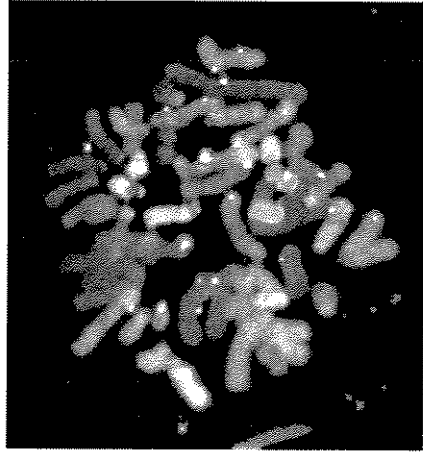


Imagem de metáfase inteira, utilizando técnica de SKY. A seta indica o cromossomo 22 com um material adicional.

Anexo 2.12: Paciente A6

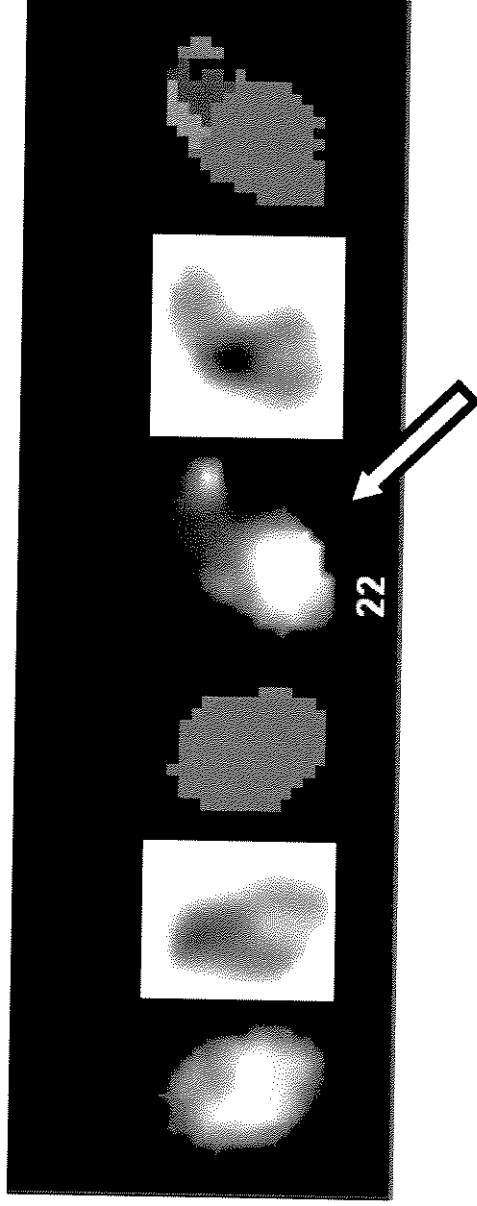
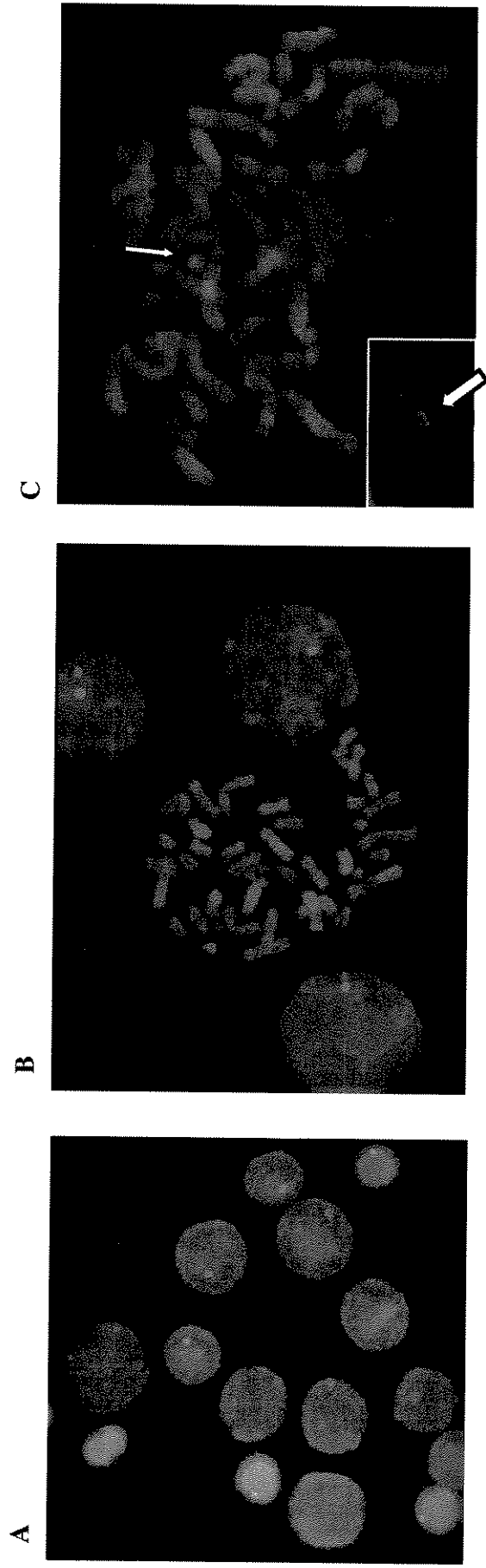


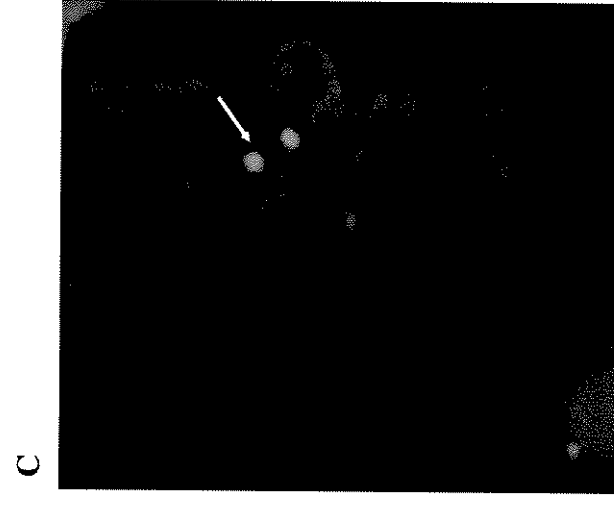
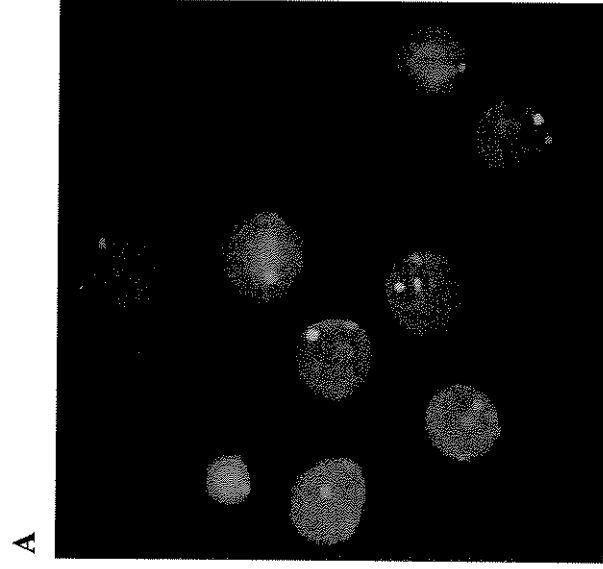
Imagem dos cromossomo 22, utilizando técnica de SKY. A seta indica o cromossomo 22 com um material adicional. A região em verde corresponde a uma região de heterocromatina e a amarela, na região superior, a uma provável duplicação.

Anexo 2.13: Paciente B1



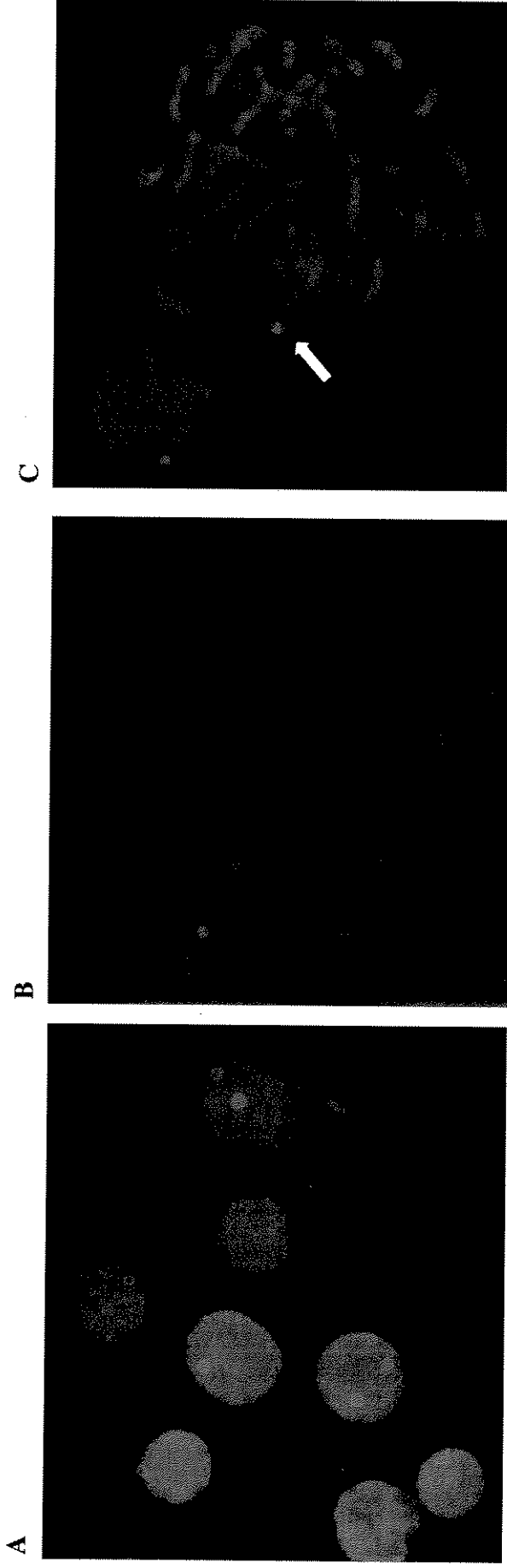
Imagens obtidas por FISH, utilizando sondas centroméricas para o cromossomo X. a) Análise de núcleos interfásicos. b) Metáfase 45,X. c) Metáfase 46,X, r(X). As setas indicam r (X).

Anexo 2.14: Paciente B2



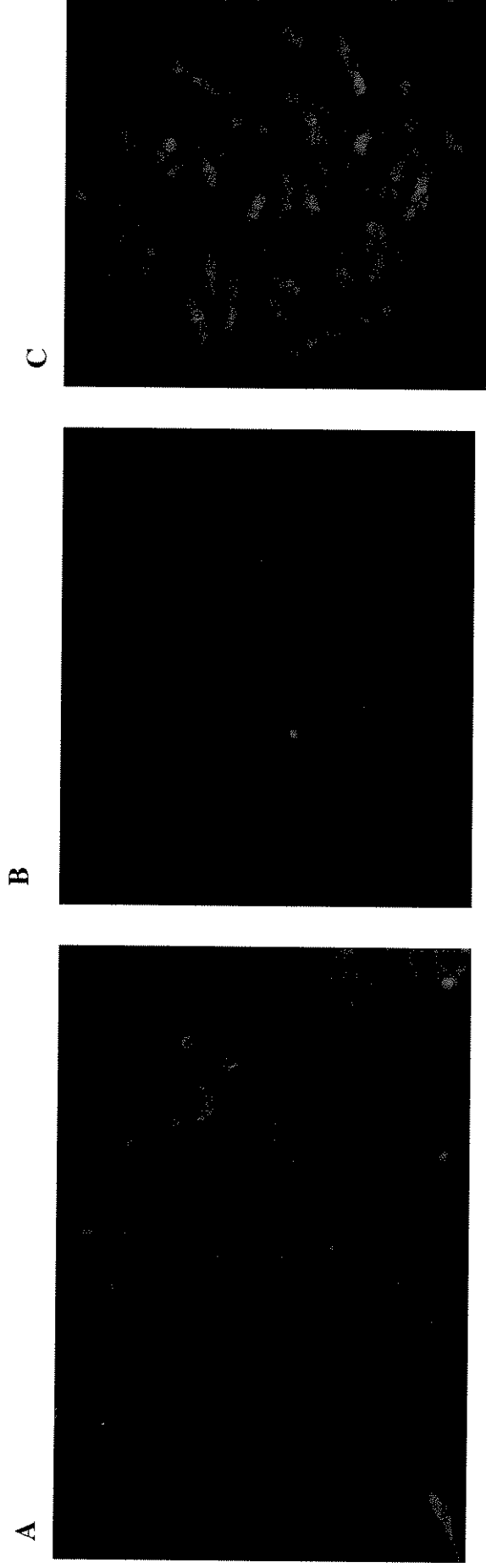
Imagens obtidas por FISH, utilizando sondas centroméricas para o cromossomo X e para a região cromossômica Yq12. a) Análise de núcleos interfásico. b) Metáfase 45,X. c) Metáfase 46,X,X,i(Yq). A seta indica i (Yq).

Anexo 2.15: Paciente B3



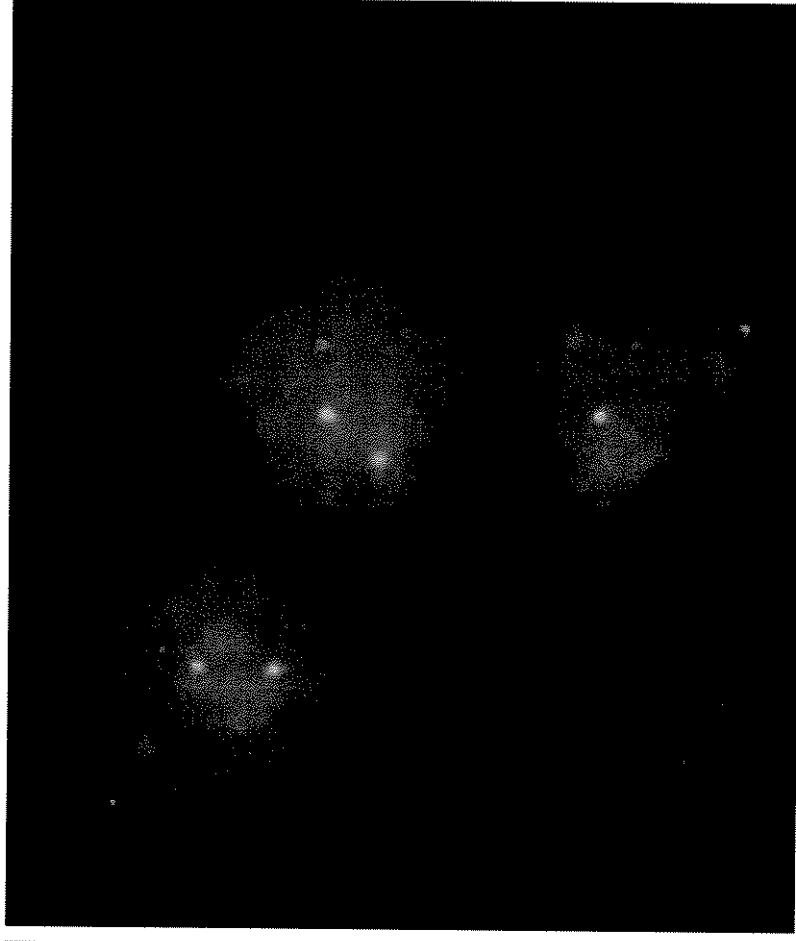
Imagens obtidas por FISH, utilizando sondas centroméricas para o cromossomo X e para a região cromossômica Yq12. a) Análise de núcleos interfásico. b) Metáfase 45,X . c) Metáfase 46,X,X,r(X). A seta indica r (X).

Anexo 2.16: Paciente B4

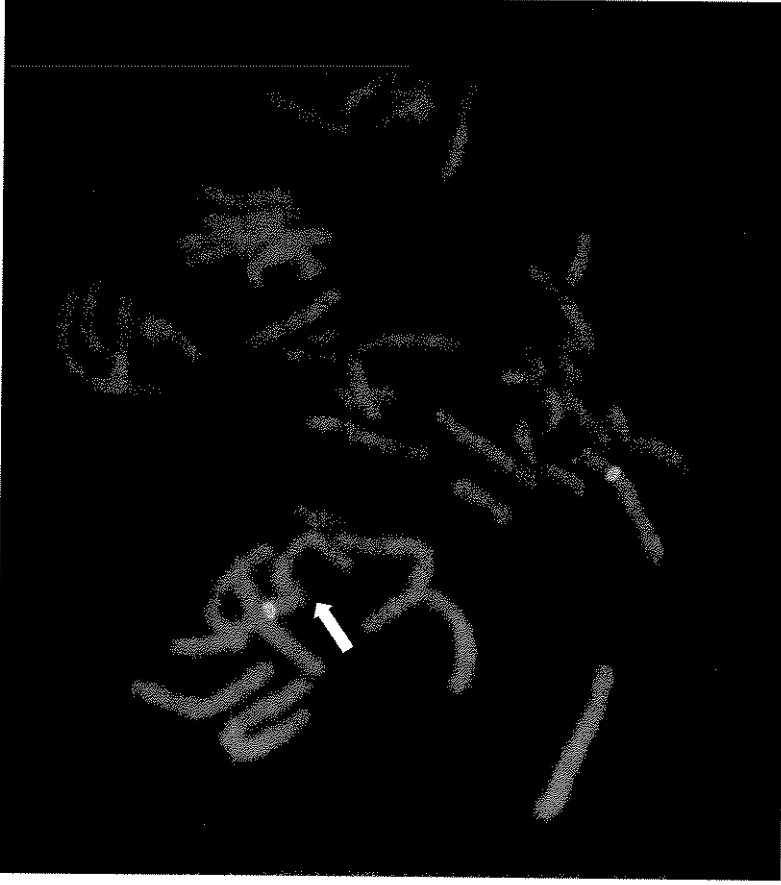


Imagens obtidas por FISH, utilizando sondas centroméricas para o cromossomo X e para a região cromossômica Yq12. a) Análise de núcleos interfásicos. b) Metáfase 46, X, del(X). c) Metáfase 45,X.

B

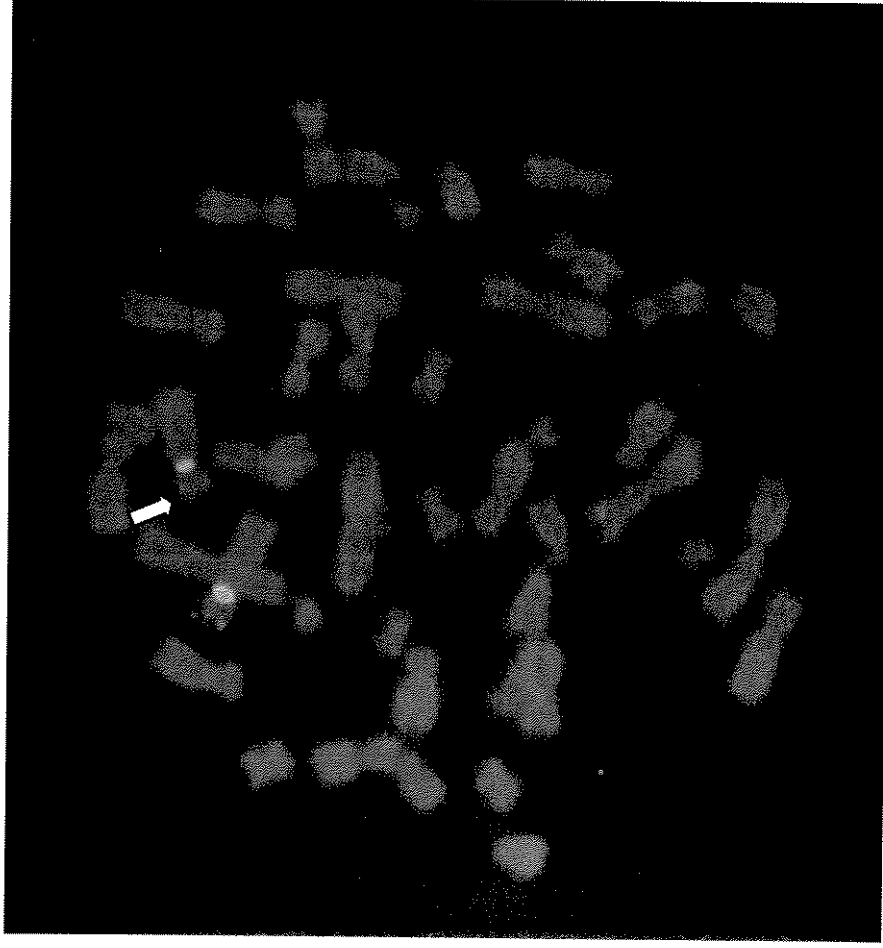


A

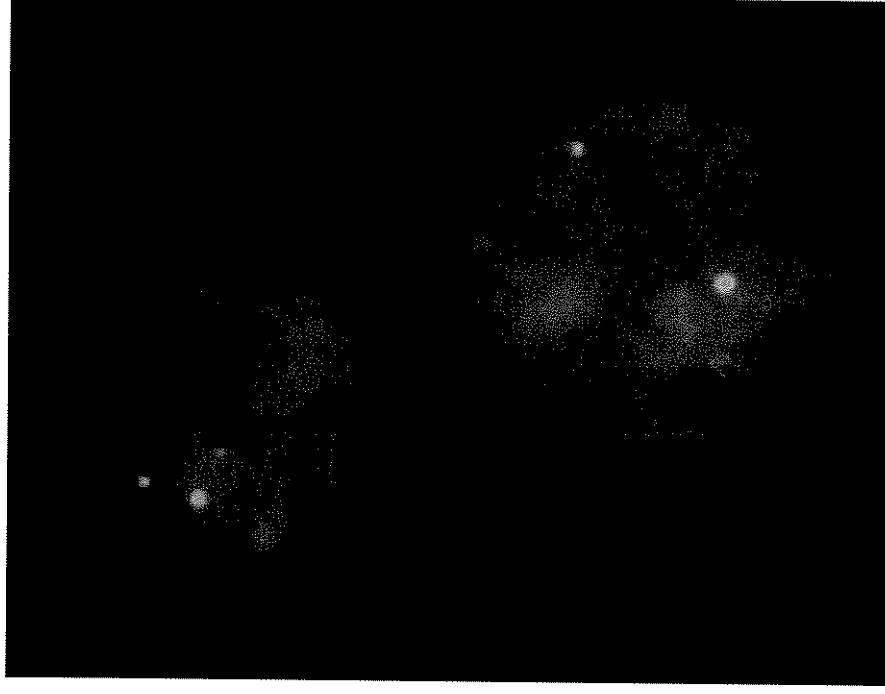


Imagens obtidas por FISH, utilizando sonda para região crítica da síndrome de Wolf-Hirschhorn. a) Metáfase com deleção desta região em um dos cromossomos 4. b) Núcleos interfásicos. A seta indica a deleção.

A



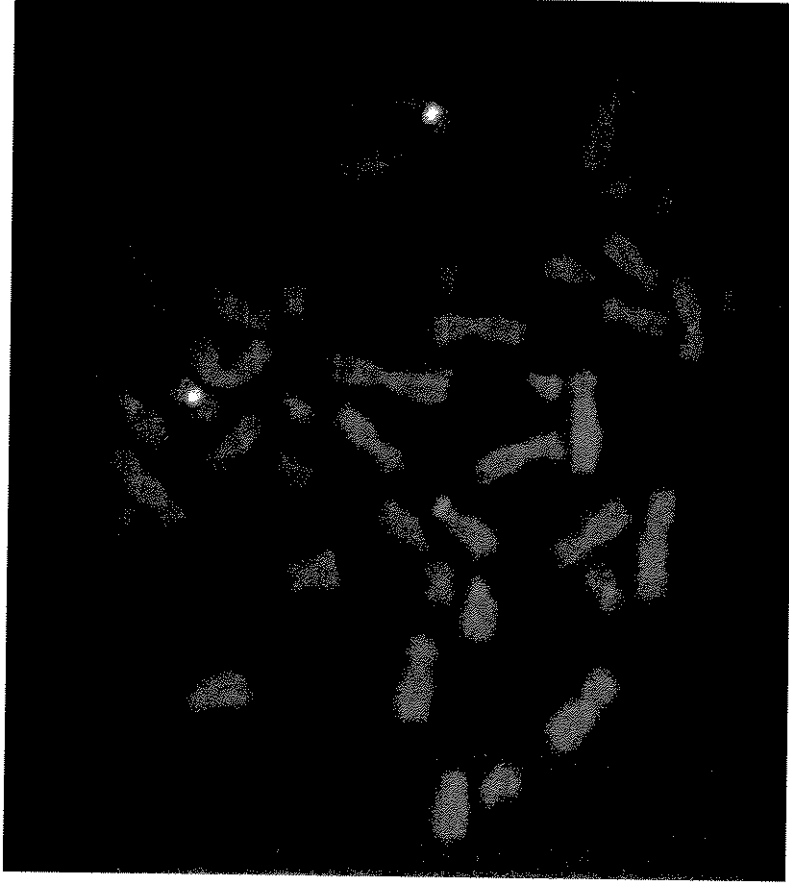
B



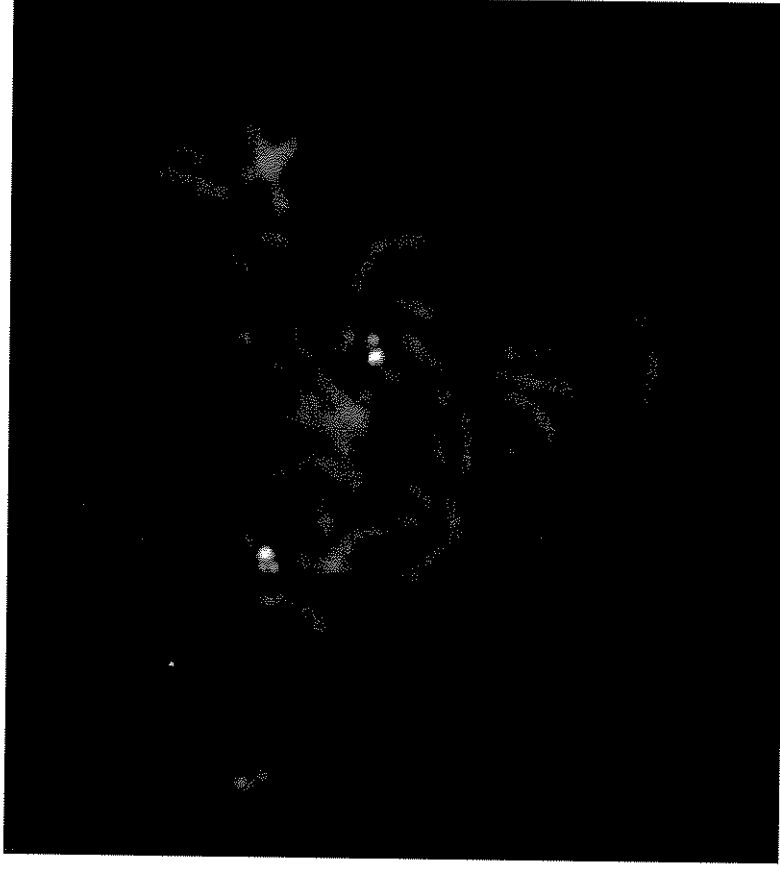
Imagens obtidas por FISH, utilizando sonda para região crítica da síndrome de Wolf- Hirschhorn. a) Metáfase com deleção desta região em um dos cromossomos 4. b) Núcleos interfásicos. A seta indica a deleção.

Anexo 2.19: Paciente D

A

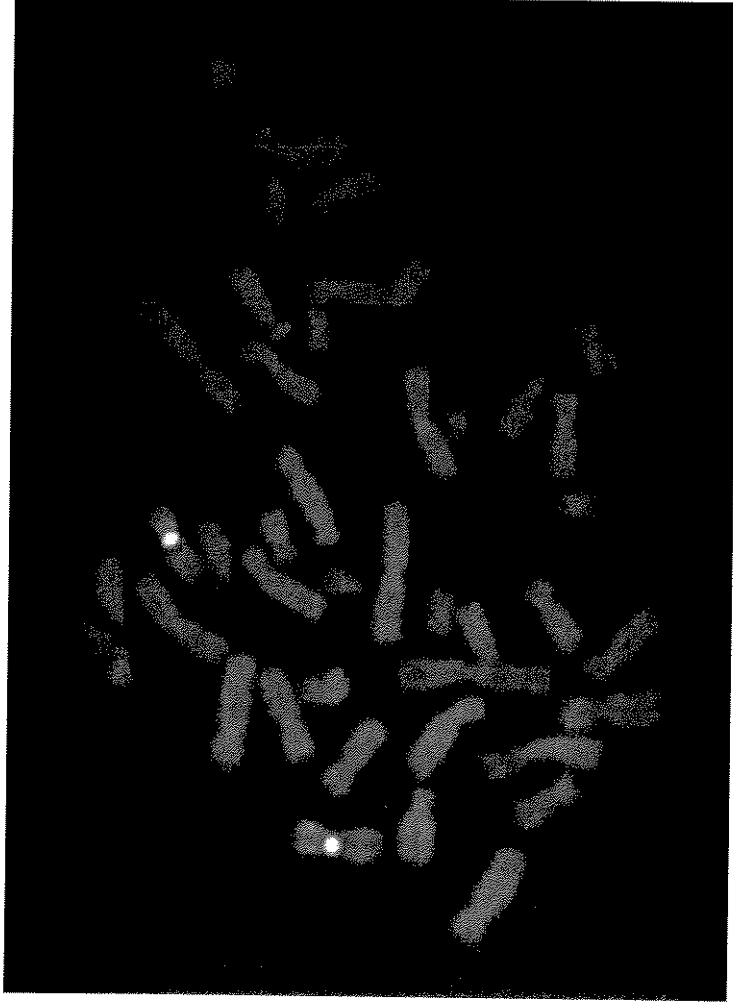


B

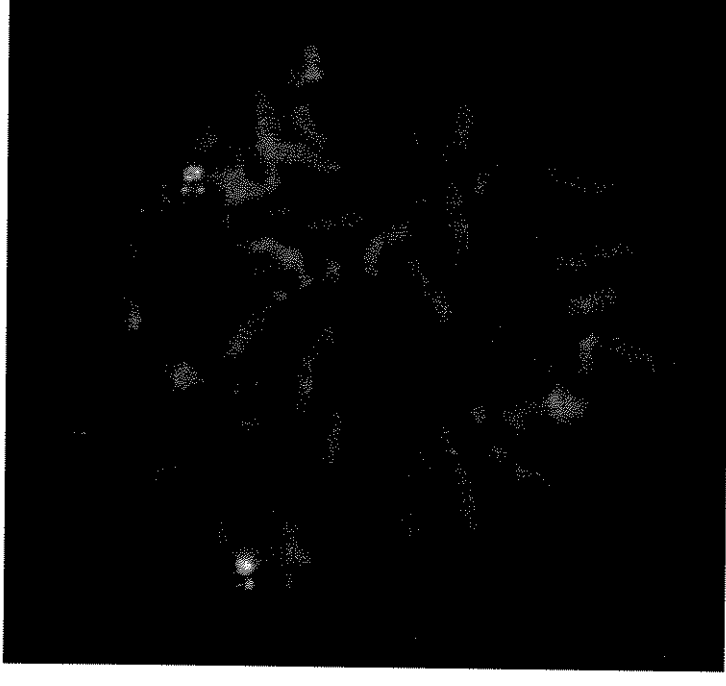


Imagens obtidas por FISH, utilizando sondas provenientes dos cosmídeos FAT5 em vermelho (a), P60 em verde (b) e sonda centromérica para o cromossomo 11 em amarelo (união de sondas centroméricas para o cromossomo 11 em vermelho e em verde) nas duas figuras. Não há deleção em nenhuma das duas metáfases.

A

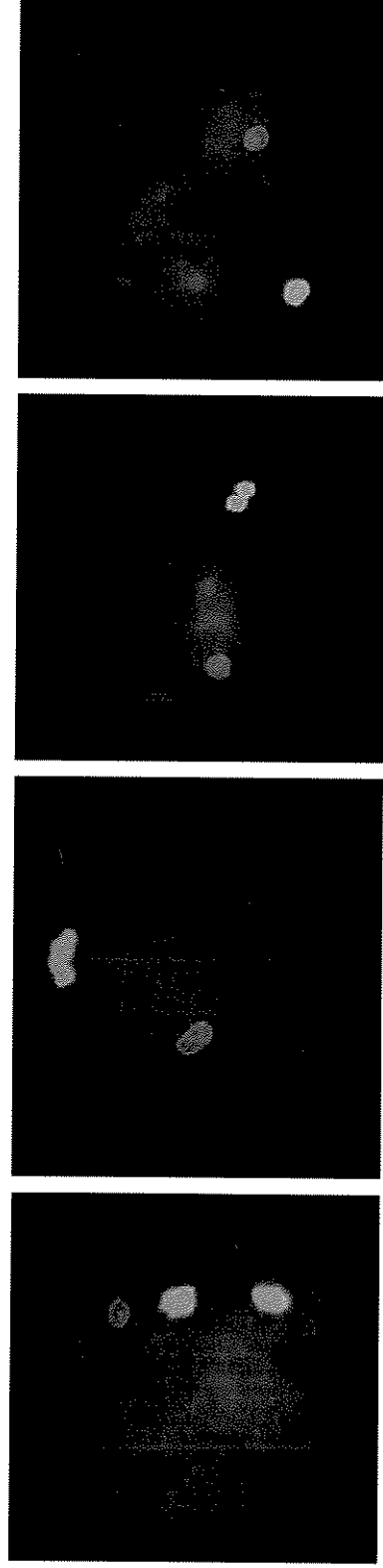


B



Imagens obtidas por FISH, utilizando sondas provenientes dos cosmídeos FAT5 em vermelho (a) e P60 em verde (b) e sonda centromérica para o cromossomo 11 em amarelo (união de sondas centroméricas para o cromossomo 11 em vermelho e em verde) nas duas figuras. Não há deleção em nenhuma das duas metáfases.

Anexo 2.21: Dificuldades técnicas encontradas durante a análise de núcleos interfásicos.



Estas imagens ilustram algumas dificuldades encontradas durante a análise de núcleos interfásicos. Sinais gerados pela sequência do isocromossomo, quando parcialmente superpostos ou muito próximos, são contados como sinais únicos. O sinal verde representa a região Yq12 e o sinal vermelho a região centromérica do cromossomo X.