

Oito Anos de Citogenética Clínica na Universidade Estadual de Maringá: Integrando Ensino e Pesquisa

Área Temática de Saúde

Resumo

As anormalidades cromossômicas, clinicamente significativas, ocorrem em cerca de 1% das crianças nascidas vivas. Esse projeto objetivou oferecer aos pacientes e/ou familiares, da comunidade abrangida pela Universidade Estadual de Maringá, o estudo citogenético (cariótipo) para confirmação ou exclusão diagnóstica de anomalias cromossômicas e o respectivo aconselhamento genético e; oportunizar aos acadêmicos participantes a vivência na área. Em oito anos foram realizados 361 estudos citogenéticos; sendo em 61,4% kariótipos normais. Já em 38,6% (139) os exames kariotípicos mostraram alterações. Dentre as alterações, a primeira causa com 64% (89), foi a síndrome de Down, a segunda causa foi a síndrome do cromossomo X frágil com 10,1% (14), a terceira foi a síndrome de Turner com 6,5% (9) e nos 19,4% (27) das anomalias restantes constituíram-se de anomalias numéricas, estruturais e mistas (numéricas e estruturais). Permitiu o desenvolvimento de duas monografias de bacharelado e sete projetos de iniciação científica. Assim, conclui-se que o atendimento à comunidade, disponibilizando o exame citogenético, integrado com a clínica e; a informação aos pacientes e familiares; bem como o aprendizado do acadêmico e a coleta de dados para a realização de projetos de iniciação à pesquisa; atingiu plenamente os objetivos desse projeto.

Autores

Valter Augusto Della-Rosa - Departamento de Biologia Celular e Genética

Ana Maria Silveira Machado de Moraes - Departamento de Medicina

Greicy Helen Ribeiro Gambarini- Bióloga - Departamento de Biologia Celular e Genética

Rodrigo de Mello – Graduando

Rosinete Gonçalves Mariucci - Especialista - Departamento de Biologia Celular e Genética

Instituição

Universidade Estadual de Maringá - UEM

Palavras-chave: citogenética clínica; cromossomos; kariótipo.

Introdução e objetivo

Extensão resulta da integração das atividades de ensino e pesquisa em uma Instituição Universitária. Uma área que na Universidade Estadual de Maringá possui essa característica é o da Citogenética Clínica.

Aproximadamente 3% das gestações resultam no nascimento de uma criança com doença genética significativa ou defeito de nascença capaz de causar incapacidades, deficiência mental ou morte precoce. Estima-se que 42% das causas de mortalidade infantil e 10% das causas de internações hospitalares de adultos são de etiologia genética.

As doenças geneticamente determinadas são classificadas em três categorias principais: cromossômicas, monogênicas e multifatoriais, embora, além dessas, duas outras categorias, atualmente devem ser consideradas, as de origem mitocondriais e do distúrbio das células somáticas (câncer).

A citogenética clínica é o estudo dos cromossomos, de sua estrutura e sua herança aplicada a prática da genética médica. A maior parte dos distúrbios cromossômicos caracteriza-se por atraso do desenvolvimento, físico e mental e, em geral, várias anomalias de face, membros, sistemas e órgãos. As anormalidades cromossômicas, clinicamente significativas, ocorrem em cerca de 1% das crianças nascidas vivas e correspondem a 1% das admissões hospitalares pediátricas e; 2,5% das mortes na infância. O número aumentado ou diminuído, do número normal de cromossomos de uma célula, ou mesmo anomalias em suas estruturas, freqüentemente são incompatíveis com a vida, ocorrendo em de cerca de 7% a 8% das fecundações. As anomalias cromossômicas numéricas dos autossomos ocorrem em cerca de 1 em 700 nativos, as que envolvem os cromossomos sexuais em homens 1 em 360 e as que envolvem os cromossomos sexuais em mulheres 1 em 580. As anomalias estruturais estão presentes em cerca de 1 em 375 neonatos; resultam de quebra cromossômica, seguida de reconstituição, que pode ser balanceada, se tiverem o complemento normal de material cromossômico ou, não balanceados, se houver material adicional ou ausente.

Dentre as anomalias de causas genéticas, a síndrome de Down, ou trissomia do cromossomo 21, é o distúrbio cromossômico mais comum, mais conhecido e também a causa genética mais comumente encontrada de deficiência mental (DM) moderada. Aproximadamente 1/600 crianças nascem com síndrome de Down e sua incidência aumenta entre os nativos ou fetos de mães acima de 35 anos. Esta síndrome é de ocorrência esporádica na população mundial e, geralmente, não se repete. Atualmente, estima-se que existam, entre crianças e adultos, mais de 100 mil brasileiros com síndrome de Down. Na maioria das vezes, a síndrome pode ser diagnosticada ao nascimento ou logo depois por suas características dismórficas, que variam entre os pacientes mas, apesar disso, produzem um fenótipo distinto. Hipotonia neonatal e deficiência mental são os sinais concordantes em 100% dos casos.

Outras características podem estar presentes em proporções variáveis: baixa estatura, diminuição do reflexo de Moro, braquicefalia, microcefalia discreta, face de perfil achatado, pescoço curto, fendas palpebrais oblíquas, pavilhões auriculares anormais, clinodactilia, displasia da pelve. Mudanças neuropatológicas como nódulos neurofibrilares e perda neuronal são encontradas nos cérebros de um grande número de pacientes com síndrome de Down que morrem após os 35 anos de idade. Estes achados sugerem que as anormalidades neurológicas na síndrome podem ser consequência da falta de balanceamento entre um ou mais genes no cromossomo 21. A origem parental do cromossomo 21 extra e de outras aneuploidias que resultam em síndromes trissômicas e o estágio da meiose onde ocorre a não disjunção têm sido extensivamente estudados nos últimos anos. Estes estudos mostraram que a origem é paterna em aproximadamente 5% dos casos e, portanto, na maioria dos casos, a não disjunção é de origem materna, ocorrendo principalmente na primeira divisão meiótica. (Mustacchi, 2000).

A síndrome do cromossomo X-Frágil (Fraxa) ou de Martin-Bell (Omim 309550) é a segunda causa genética mais freqüente de DM afetando aproximadamente 4,4/10.000 homens e 4,1/10.000 mulheres (Sherman e col., 1984), sendo a primeira causa a síndrome de Down. Como é de herança ligada ao X, ao contrário da síndrome de Down (cromossômica), ela se transmite nas famílias. Em geral, essas famílias possuem mais de um afetado por deficiência mental, sendo as mulheres heterozigotas quem transmitem aos descendentes.

As características mais notáveis dos homens afetados são a DM e a macrorquidia (volume testicular aumentado). O grau de DM é extremamente variável, mesmo entre indivíduos de uma mesma família. Existem afetados que apresentam desde DM profunda até inteligência limítrofe, contudo, a DM grave parece ser o mais freqüente, ocorrendo em 42% dos homens afetados. Entre os homens afetados, o grau das funções cognitivas e adaptativas é amplo, variando desde uma dificuldade de aprendizagem até um retardo mental profundo.

Muitos estudos demonstraram uma redução em QI dependente de idade e escores de padrões de comportamento adaptativo entre homens afetados, sugerindo um platô prematuro no desenvolvimento de habilidades adaptativas e cognitivas. Mingroni-Netto (1994) cita outras características clínicas presentes em grande parte dos afetados pela síndrome: face alongada e estreita, frontal alto e proeminente, porção mediana da face hipoplásica, cristas supra-orbitais proeminentes, orelhas grandes e em abano e palato alto.

Estima-se que 35% das mulheres heterozigotas quanto ao gene da síndrome do cromossomo X frágil têm comprometimento mental, que é em geral, menos grave que o dos homens afetados (Sherman e col., 1984). O X frágil refere-se a um marcador citogenético chamado de sítio frágil folato sensível, localizado em Xq27.3, no qual a cromatina não se condensa durante a mitose. Caracteriza-se por uma constrição e tendência para quebras, portanto, sítios frágeis, no final do braço longo, aproximadamente na interface entre as duas últimas bandas. Esse distúrbio está associado com a observação citogenética de visualização do cromossomo X ao microscópio óptico causado pela repetição, em nível molecular, de uma sequência CGG. A síndrome do X frágil contribui com 3% a 6% da deficiência mental entre os meninos que têm uma história familiar positiva de deficiência mental e não têm defeitos de nascimento (Nussbaum, McInnes, Willard, 2002).

Além dessas duas síndromes existem várias indicações clínicas que levantariam a possibilidade de uma anomalia cromossômica e, portanto, precisam de estudos citogenéticos. Essas incluem especialmente uma deficiência mental de início na puberdade, amenorréia, infertilidade ou genitália ambígua.

As aneuploidias dos cromossomos X e Y são relativamente comuns, e as anormalias dos cromossomos sexuais estão entre os mais comuns de todos os distúrbios genéticos humanos, com uma incidência geral de cerca de 1 em 400 a 500 nascimentos. Os fenótipos associados a estes defeitos cromossômicos em geral são menos graves que aqueles associados aos distúrbios autossômicos.

Ao contrário de outras aneuploidias de cromossomos sexuais, as mulheres com síndrome de Turner em geral podem ser identificadas ao nascimento ou antes da puberdade por suas características fenotípicas distintas. A incidência do fenótipo da síndrome de Turner é de cerca de 1 em 4000 nativos femininos, embora números mais altos tenham sido relatados em alguns levantamentos. A constituição cromossômica mais importante na síndrome de Turner é 45,X, entretanto, cerca de 50% dos casos tenham outras variantes do cariótipo. As anomalias típicas da síndrome de Turner incluem baixa estatura, disgenesia gonadal (em geral gônadas em fita, refletindo a falha da manutenção ovariana), face incomum característica, pescoço alado, linha baixa de implantação dos cabelos, tórax em escudo com mamilos muito espaçados e uma frequência elevada de anomalias renais e cardiovasculares.

Essas foram as três síndromes mais diagnosticadas no Laboratório de Citogenética Humana, onde são atendidos pacientes encaminhados com suspeita diagnóstica de cromossomopatias.

Esse projeto objetivou, em oito anos, oferecer aos pacientes e/ou familiares, da comunidade abrangida pela Universidade Estadual de Maringá (Maringá e região), o exame de cariótipo (estudo citogenético) para confirmação ou exclusão da suspeita diagnóstica de cromossomopatia bem como informações (aconselhamento genético) para a prevenção de ocorrência e/ou recorrência de dessas anomalias. Objetivou, ainda, oferecer aos acadêmicos dos cursos Ciências Biológicas, Farmácia e Medicina, a vivência das técnicas do estudo do cariótipo, conhecimento dos quadros clínicos associados a distúrbios cromossômicos mais frequentes bem como o desenvolvimento de monografias e projetos de iniciação científica.

Metodologia

Os pacientes são encaminhados até o projeto pelas escolas especiais, pediatras, neurologistas, psicólogos, postos de saúde e Hospital Universitário da Instituição. Esse

projeto é desenvolvido na Unidade de Aconselhamento Genético e Citogenética Humana do Departamento de Biologia Celular e Genética da UEM.

O atendimento consiste no exame de anamnese do paciente, incluindo-se queixa principal, história familiar e dados clínicos. Após o exame clínico, onde já se formula a hipótese diagnóstica; se de etiologia cromossômica ou não; colhe-se sangue venoso periférico para a realização de cultura temporária de linfócitos para o exame de cariótipo. De cada paciente, foram colhidos 10 ml de sangue venoso periférico, com heparina sódica (5000 UI/ml), utilizando a técnica de Moorhead e col.(1960) modificada.

Foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 sem ácido fólico (ref. 27016 Gibco) acrescido de soro fetal bovino (ref. 10 270-098-Gibco) na proporção de 15% e fitohemaglutinina (ref. 10576-015-Gibco) na concentração de 4%. Para a investigação do cromossomo X frágil de cada paciente foram realizadas duas culturas com diferentes sistemas testes indutores de Frax, como a seguir: (I) Trimetoprima (Sigma ref. T-7883) na concentração final de 26 µg/ml e soro fetal bovino a 5%. (II) FudR (5-fluordesoxiuridina - Sigma ref. F-3503) na concentração final de 5X10⁻⁶M e soro fetal bovino na concentração de 15%. Ambos indutores foram adicionados 24 horas antes da coleta. A cada 10 ml de meio de cultura foi adicionado 0,5 ml de plasma com linfócitos. A cultura foi então incubada por 72 horas em estufa a 37°C. Cinquenta minutos antes da coleta, acrescentou-se 50µL de uma solução de 4X10⁻⁵M de colchicina (Sigma ref. C-9754). Ao se completarem 72 horas, procedeu-se a coleta do material.

Para a hipotonização foi utilizado uma solução 0,075M de KCl. A fixação foi feita com metanol e ácido acético na proporção, respectiva, de 3:1. Sobre as lâminas lavadas, guardadas em água destilada gelada foi pingado o material e a secagem foi feita ao ar. Para a análise cromossômica foi utilizada a técnica de bandas GTG (Seabright,1971, com modificações). Foram analisadas, de cada paciente, entre 11 e 100 células metafásicas. Quando houve indicação para a pesquisa de FRAX pelo menos 50 células, em pelo menos um sistema teste, foram analisadas.

Resultados e discussão

No período de 01/05/1996 a 30/04/2004 foram realizados, no Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá 361 estudos citogenéticos, a Tabela mostra os resultados encontrados. Em 222 pacientes (61,4%) os resultados se mostraram normais, sendo 143 cariótipos que exibiram o cariótipo 46,XY e 79 com cariótipos 46,XX. Isto não significa que se pode afastar anomalias genéticas, pode-se afastar que a causa do quadro clínico encontrado não é decorrente de alteração cromossômica, uma vez que doenças geneticamente determinadas são classificadas em três categorias principais: cromossômicas, monogênicas e multifatoriais. Já em 139 (38,6%) exames, foram encontradas alterações, o que significa que os respectivos quadros clínicos são decorrentes de alterações cromossômicas.

A primeira causa foi a trissomia do cromossomo 21 totalizando 89 exames ou 64%, sendo 52 meninos [47,XY,+21] e 35 meninas [47,XX,+21], além de dois meninos que mostraram o cariótipo em mosaico [47,XY,+21/46,XY], isto é apresentaram linhagem com 47 cromossomos e linhagem com 46.

A segunda causa, sem dúvida, foi a alteração estrutural, decorrente de uma falha estrutural no cromossomo X, devido a mutação do gene FMR1, conhecida como síndrome do cromossomo X frágil ou FRAX, onde foi encontrada em 14 pacientes, sendo 13 mostrados no item Frax (Tabela), além de um incluído em anomalias mistas, ou seja que exibiu ao mesmo tempo erro numérico e estrutural: cariótipo em que a paciente exibiu as síndromes de Down e FRAX [47,X, fra(X)(q27.3)+21]. Assim o Frax perfaz 10,1% de todas os cariótipos que se

mostraram alterados. A síndrome do Frax tem uma prevalência de 16 a 25 por 100.000 na população masculina e a metade disto na população geral feminina.

A síndrome do X frágil contribui com 3% a 6% da deficiência mental entre os meninos que têm uma história familiar positiva de deficiência mental e não têm defeitos de nascimento (Nussbaum, McInnes, Willard, 2002). Assim ao contrário da síndrome de Down que não se transmite na família, a síndrome do FRAX pode ser transmitida pelas mulheres, levando ao surgimento de casos de DM nessas famílias. Assim, a família que receber essa informação poderá planejar suas gestações sabendo dos riscos que correm, tomando decisões reprodutivas pensadas e; hoje ainda está disponível o diagnóstico pré-natal dessas anomalias, que poderão ser detectadas à partir da 8ª semana de gestação.

A terceira causa de anomalia cromossômica foi a síndrome de Turner onde a constituição mais importante é 45,X, onde foram encontrados 3 cariótipos desse tipo. Além desses, mais 6 outras variações estruturais do cariótipo 45,X, que levam a síndrome de Turner por envolverem alterações no cromossomo X, totalizando 9 (6,5%), foram encontrados. A identificação da constituição cromossômica é clinicamente significativa; por exemplo, as pacientes que exibiram cariótipo 46,X,i(Xq) são similares as pacientes 45,X, enquanto pacientes com deleção do Xp têm baixa estatura e malformações congênitas e aquela com deleção de Xq, em geral, têm apenas disfunção gonadal; permitindo a orientação clínica adequada em cada cariótipo. Esses 6 cariótipos variantes de síndrome de Turner (não especificados na Tabela), estão incluídos entre os tipos de rearranjos não balanceados (2) e mistos (4). Nos outros 27 (19,4%) cariótipos foram encontradas anomalias numéricas e rearranjos balanceados e/ou não balanceados; bem como, a combinação destas, as mistas, onde foram encontradas alterações numéricas e estruturais. As alterações cromossômicas contribuem em grande proporção de todas as perdas reprodutivas, malformações congênitas e deficiência mental.

Assim; a citogenética clínica é um procedimento diagnóstico cada vez mais importante em várias áreas da medicina clínica, sendo o impacto clínico e social, enorme. Quando um diagnóstico é firmado ele pode esclarecer aos pais, tranquilizar outros familiares ao ser explicado seus modos de transmissão. Permite ainda que decisões reprodutivas sejam tomadas com o diagnóstico de certeza.

Somente uma minoria, de pacientes com doenças genéticas, é vista por geneticistas médicos. Outros especialistas, disponibilizam tratamento adequado aos pacientes, mas não estão preparados para as nuances do diagnóstico genético ou para lidar com a família e os riscos reprodutivos (Penchaszadeh e col., 1998).

Os laboratórios de diagnóstico genético são essenciais para os serviços de genética e deveriam ser equipados para realizarem além de estudos citogenéticos, os de genética bioquímica e genética molecular.

No segundo ano, de existência desse Projeto, o mesmo foi analisado pelo Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão da Instituição, sendo aprovado como de caráter permanente na Instituição. Esse projeto permitiu ainda a 21 acadêmicos, sendo 10 do curso de Ciências Biológicas; sete de Medicina e quatro de Farmácia a vivência de uma área que nos cursos de graduação é apenas teórica.

Para os acadêmicos dos cursos de graduação em Ciências Biológicas e Farmácia especialmente importante foram as técnicas laboratoriais de citogenética; e para os acadêmicos de Medicina, especialmente importante foi o conhecimento dos quadros clínicos dos distúrbios cromossômicos mais frequentes; que formam uma importante categoria de doenças genéticas.

O ensino de genética médica e humana é essencial para os estudantes que desejam entrar para um curso médico ou outra área da saúde.

Uma área de interesse crescente para os geneticistas médicos é a dismorfologia. As crianças que nascem com anormalidade congênita, especialmente se forem múltiplas, deveriam ser examinadas para a investigação de síndromes e aos pais deveria ser oferecida orientação sobre a síndrome e o risco de recorrência. A meta da integração da genética na prática médica é o uso das ferramentas da genética para identificar os indivíduos em risco de desenvolverem problemas médicos ou diagnosticar aqueles já afetados, para que prevenção efetiva ou tratamento possa ser instituído, além de ser oportunizado o aconselhamento genético à família (Korf, 2000).

Esse projeto resultou também, na área de ensino, na elaboração de duas monografias de bacharelado do curso de Ciências Biológicas, onde os acadêmicos participantes puderam vivenciar uma área pouco vista na disciplina de genética durante o curso, contribuindo inclusive na formação profissional na área de citogenética, uma área de atuação do biólogo. Ainda permitiu a integração com a pesquisa, na atividade de iniciação a pesquisa, onde permitiu o desenvolvimento de sete projetos de iniciação científica; com a participação de nove alunos, sendo 7 sete bolsistas PIBIC-CNPq.

Assim, conclui-se que o atendimento à comunidade, disponibilizando o exame citogenético, integrado com a clínica; a informação aos pacientes e familiares; o aprendizado do acadêmico e a coleta de dados para a realização de projetos de iniciação à pesquisa; foram plenamente atingidos os objetivos desse projeto.

TABELA. Resultados dos estudos citogenéticos encontrados em 361 análises

| Tipo de Cariótipo | Cariótipo | Número |
|---|---------------------|--------|
| Cariótipos Normais | | |
| | 46,XY | 143 |
| | 46,XX | 79 |
| Cariótipos com Alterações Cromossômicas | | |
| Aneuploidias Autossômicas | | |
| | 47,XY,+21 | 52 |
| | 47,XX,+21 | 35 |
| | 47,XY,+21/46,XY | 02 |
| | Outros | 03 |
| Aneuploidias dos Cromossomos Sexuais | | |
| | 47,XXY | 03 |
| | 47,XXY/46,XY | 01 |
| | 45,X | 03 |
| Anomalias Estruturais (Cromossomos sexuais e autossomos) | | |
| FRAX | 46,Y, fra(X)(q27.3) | 12 |
| | 46,X, fra(X)(q27.3) | 01 |
| Rearranjos balanceados | | 06 |
| Rearranjos não balanceados | | 16 |
| Mistas (Numéricas e Estruturais) | | 05 |
| Total | | 361 |

Referências bibliográficas

KORF, B. R. Integration of genetics into medical practice: ethical, legal, and social perspective. **Curr Opin Pediatr**, v.12, n.6, p.585-588, 2000.

MINGRONNI-NETTO R.C. **Síndrome do cromossomo X frágil: estudo molecular e citogenético.** 1994 Tese (Doutorado em Biologia/Genética)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

MOORHEAD PS, NOWELL PC, MELLMAN WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.** v.20, p. 613-6. 1960

MUSTACCHI, Z. **Síndrome de Down** In MUSTACCHI, Z.; PERES, S. **Genética Baseada em Evidências-síndromes e heranças.** São Paulo: CID Editora, 2000, p. 817-894

NUSSBAUM, R.L.; McINNES R.R.; WILLARD H.F. (1993). **Thompson & Thompson Genética Médica.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2002, 387p.

OMIM (309550) (**Online Mendelian Inheritance in Man**) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/> for fragile-X syndrome (MIM309550).

PENCHASZADEH, VICTOR B.; BEIGUELMAN, BERNARDO. Medical genetic services in Latin America: report of a meeting of experts. **Rev Panam Salud Publica**, v.3, n. 6, p.409-420. 1998

PIERETTI M, ZHANG F, FU Y-H, WARREN ST, OOSTRA BA, CASKEY CT, NELSON DL (1991) Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. **Cell** v.66 p.817-822.1991

SEABRIGT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet** v. II. p. 971-972. 1971.

SHERMAN S.L., MORTON N.E., JACOBS P.A. AND TURNER G. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. **Ann Hum Genet** v. 48. p.21-37.1984