



Departamento de Genética
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

CITOGENÉTICA em GENÉTICA CLÍNICA

Profa. Dra. Lucia Martelli

excelência desde 1956



Citogenética Clássica

- **Cultura Temporária**
 - 48 horas (Medula óssea)
 - 72 horas (Sangue periférico).
- **Cultura de tumores sólidos**
 - Tempo de cultura variável.
- **Bandamento GTG (G-bands by Trypsin using Giemsa);**
- **Análise Cromossômica**
 - Resolução 400 bandas = CARIÓTIPO = Diagnóstico Citogenético

Ideograma

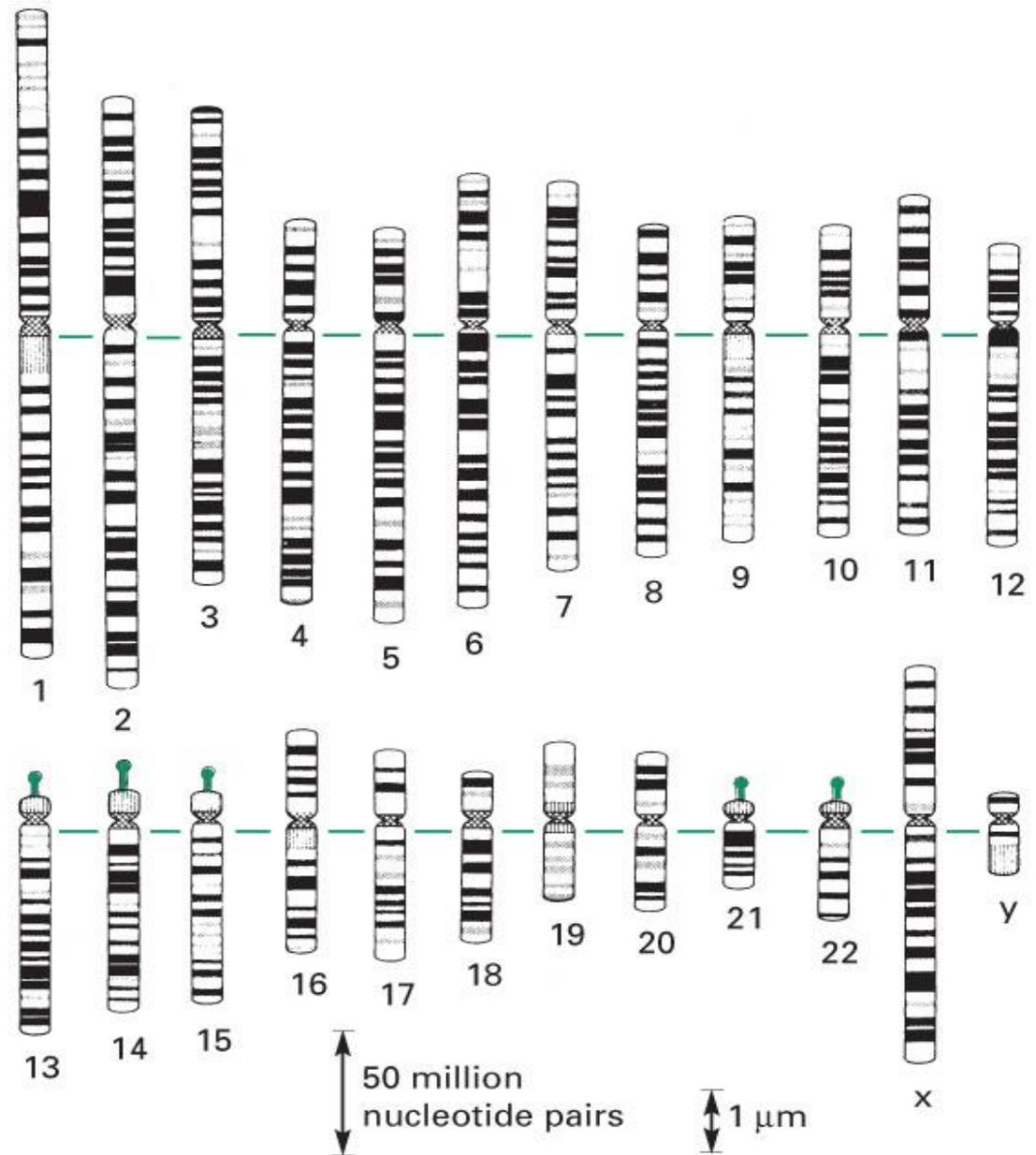


Figure 4-

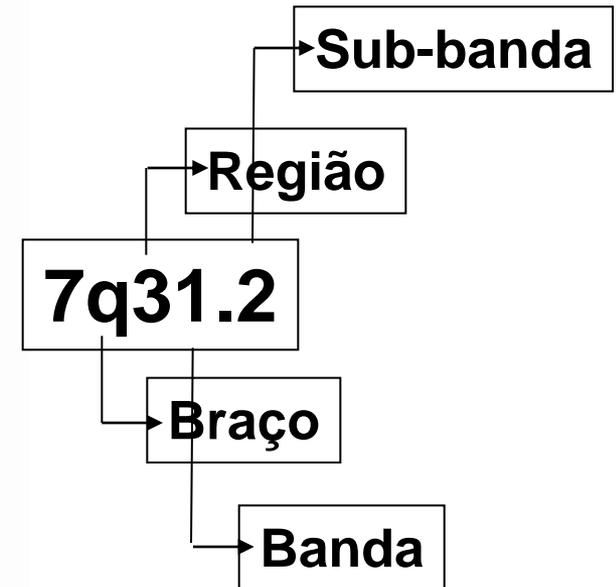
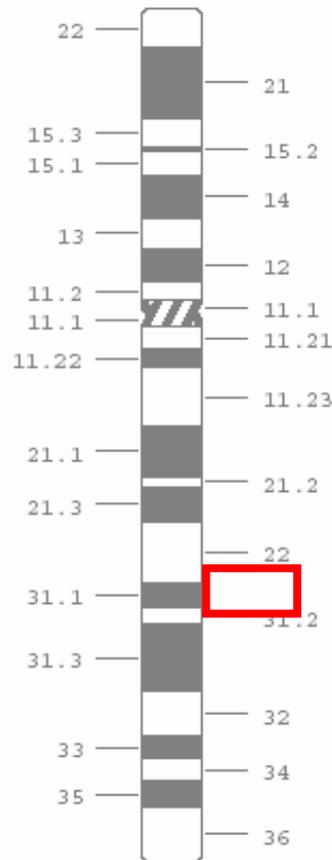
lar Biology of the Cell, 4th Edition.

Citogenética Clássica

Nomenclatura ISCN

CHROMOSOME 7

550



AMOSTRAS para Análise Cromossômica

1. Sangue Periférico ***
2. Medula Óssea : Neoplasias Hematológicas
3. Fragmento de Pele : Fibroblastos
4. Líquido Amniótico : Amniócitos
5. Vilosidade Coriônica
6. Tumores
7. Outros tecidos

Técnicas de Bandamento Cromossômico

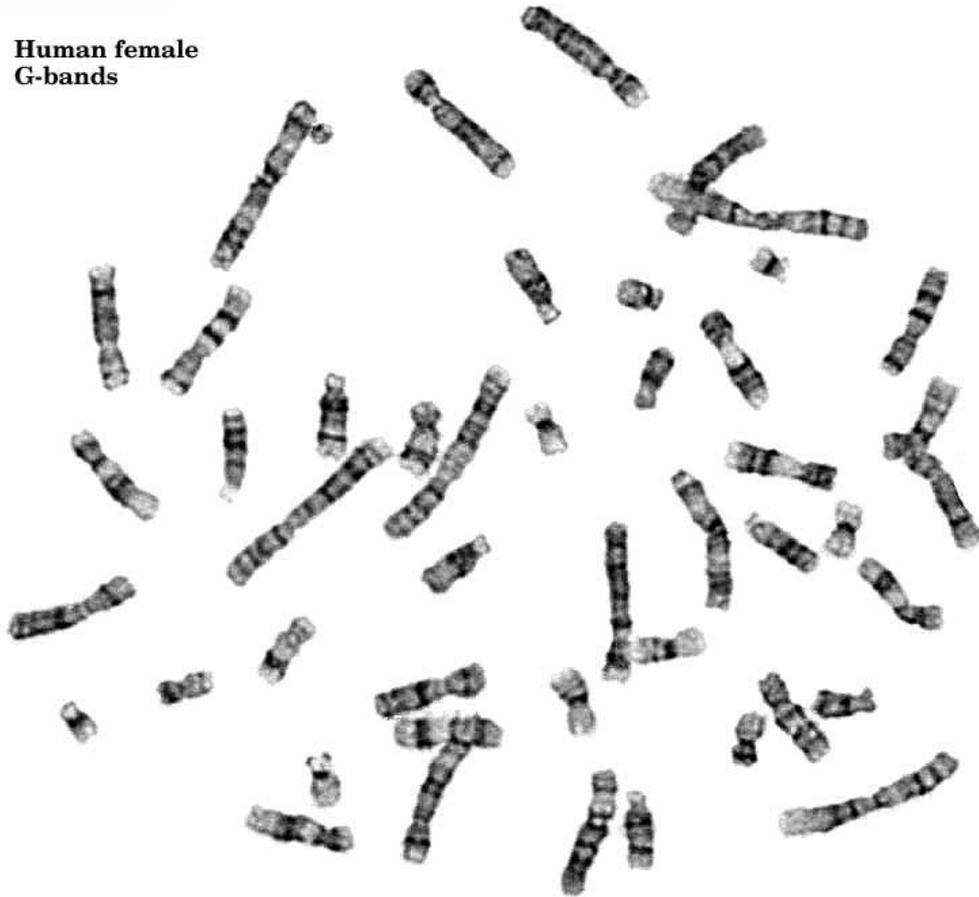
- **GTG** → Alterações Numéricas e Estruturais
- **CBG** → Centrômeros e Heterocromatina (1q;9q;16q;Y)
- **NOR** → Cromossomos acrocêntricos
13, 14, 15, 21,22

Padrão de Bandas de Alta Resolução : Prometáfase.

De 550 a 850 bandas

Bandas G

**Human female
G-bands**



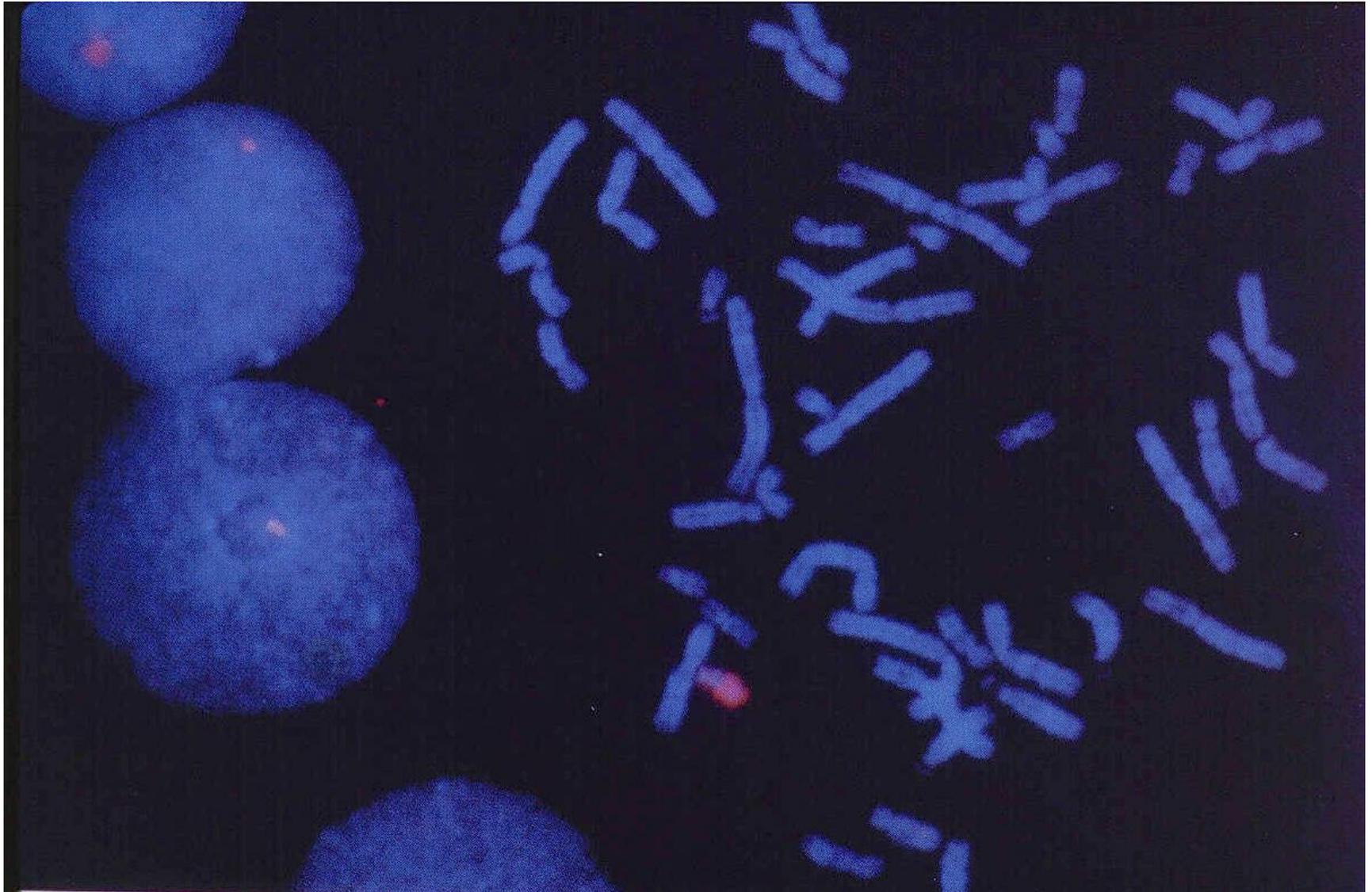
Citogenética Molecular

I. FISH

- **FISH (Fluorescence *in situ* hybridization):**
 - Determinar a presença ou ausência de seqüências específicas de DNA ou RNA;
 - Confirmar alterações cromossômicas observadas pela citogenética clássica e citogenômica ;
 - Detectar alterações crípticas e submicroscópicas.
- **Condições básicas:**
 - Especificidade da sonda pela região de interesse;
 - Marcação fluorescente da sonda que permita a detecção;
 - Qualidade de preservação do material biológico.

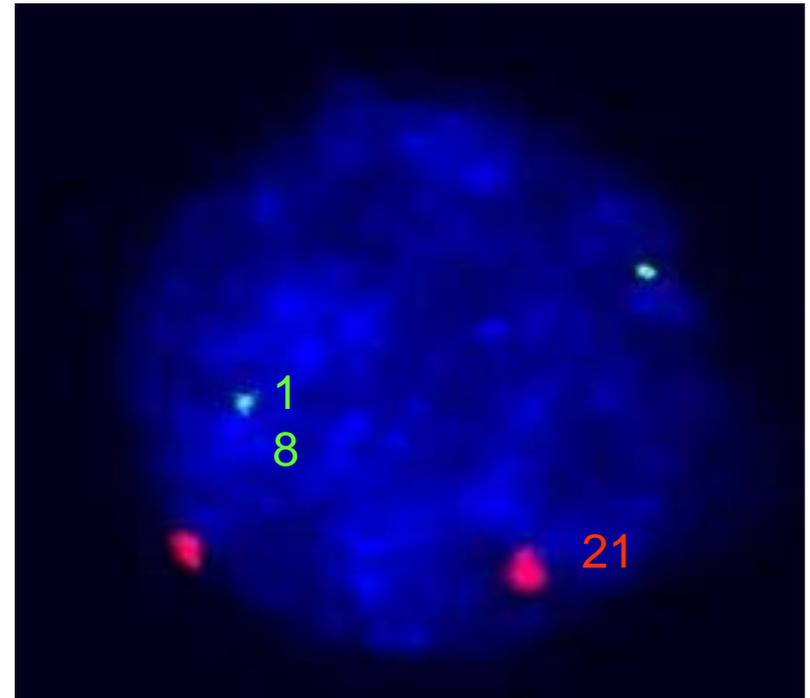
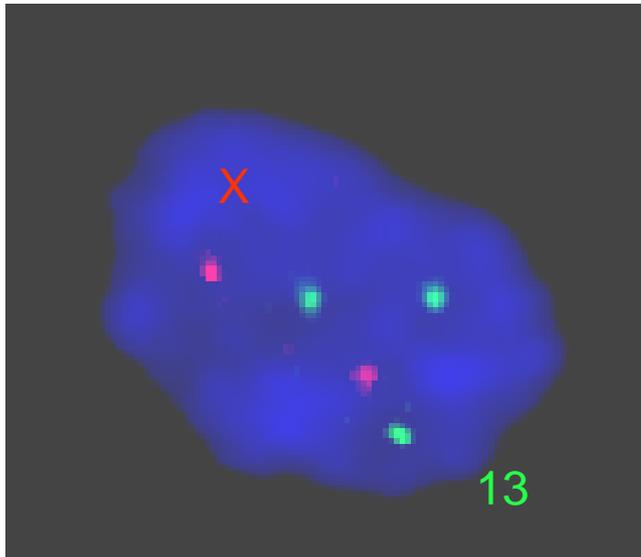
FISH

Sonda Yq marcada com biotina

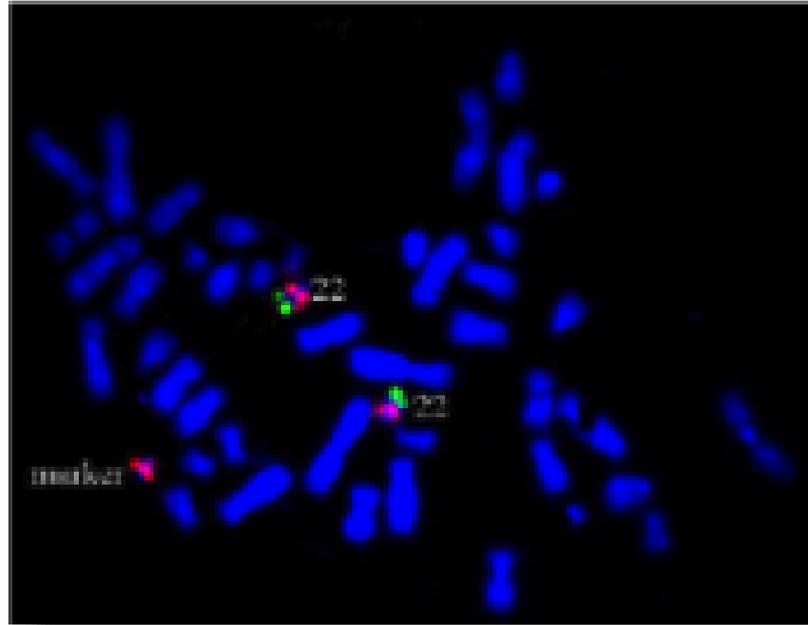


Fluorescence in situ hybridization – FISH

Citogenética Interfásica



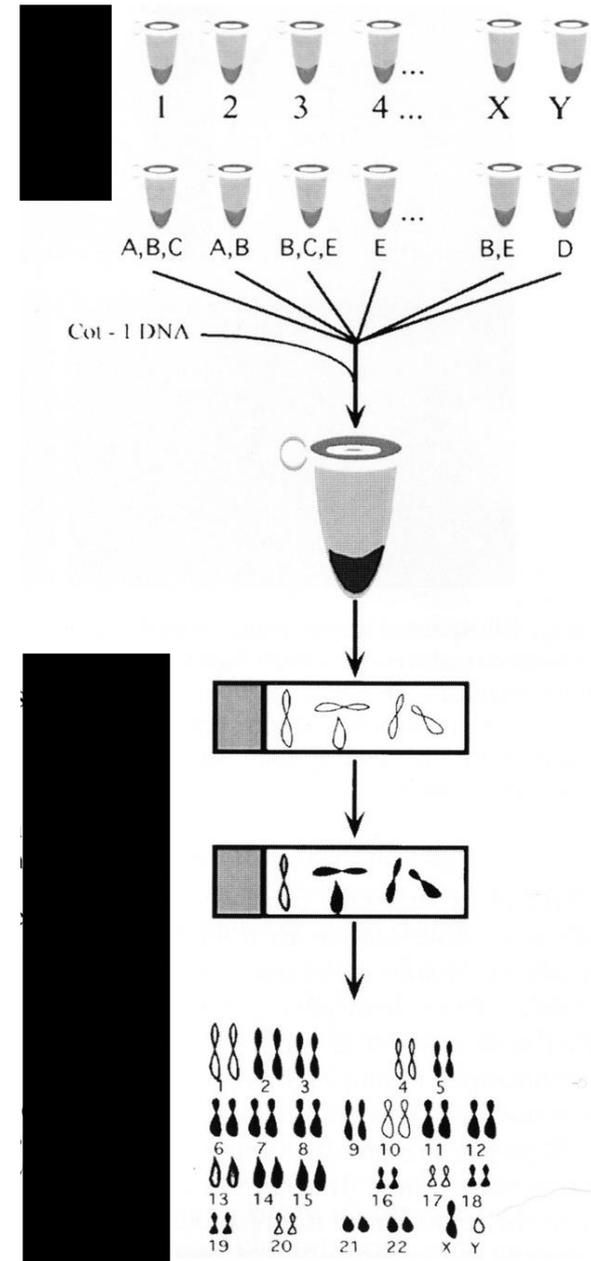
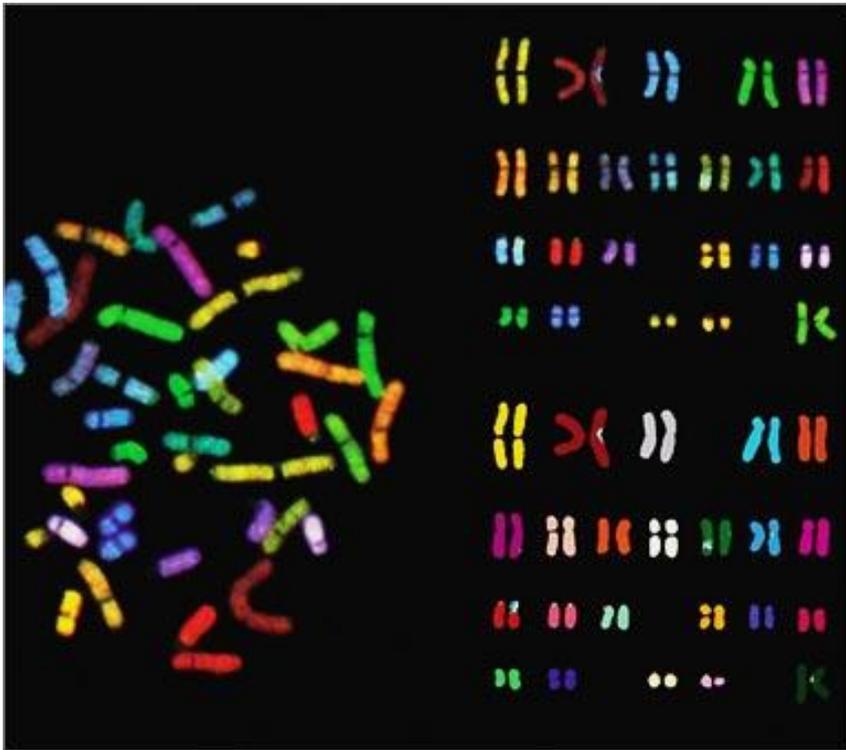
FISH para diagnóstico de cromossomo marcador



FISH performed with a probe corresponding to the cat-eye syndrome locus on 22q11.1 showed the presence of a marker chromosome 22.

Citogenética Molecular

II. SKY (Spectral Karyotyping)



II. Cariótipo Espectral

Aplicações da técnica de SKY

- **Cariótipos complexos;**
- **Identificação de origem de cromossomos marcadores;**
- **Determinação de alterações cromossômicas estruturais não detectadas pela citogenética clássica, de aproximadamente 2Mb;**
- **Definição de origem de material adicional.**

G-Banding

Inverted DAPI
& SKY



3p+

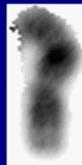


13

3



iso 5q

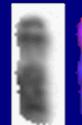


6

5



8p+



21

8



8p+

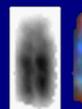


22

8



13q+



?

13

17

G-Banding

Inverted DAPI
& SKY



12?

14

19?



17

5

Marker identification:
Comparison between
G-banding and SKY

Citogenética Molecular

III. M Band

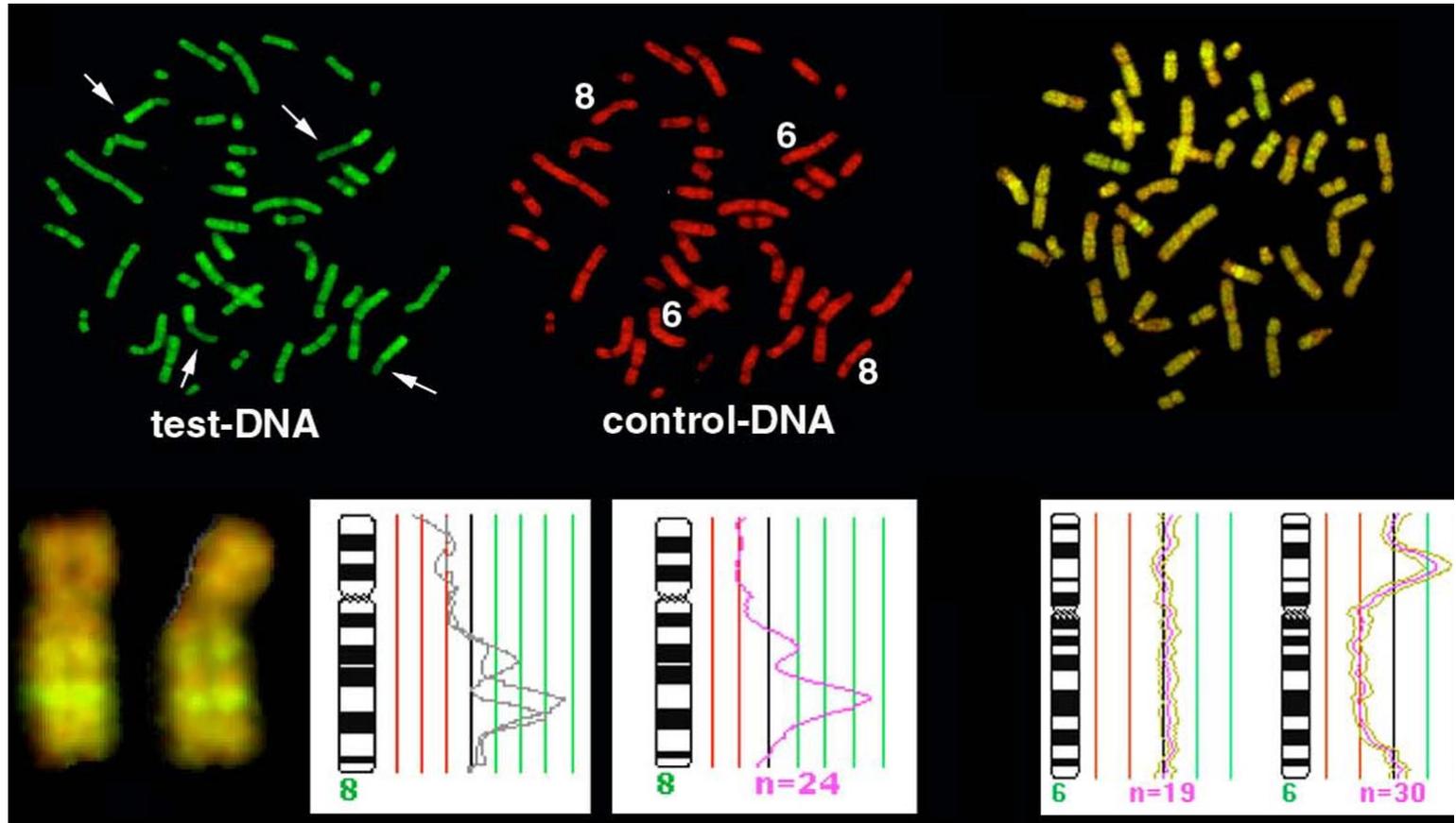
Permite detecção de rearranjos como deleções e inversões cromossômicas. Baseia-se em um conjunto de sondas obtidas por microdissecção de regiões específicas, marcadas com diferentes fluorocromos ou combinações de fluorocromos. A sobreposição dos perfis de intensidade das sondas adjacentes resultam em variações de cor ao longo do cromossomo, quantificadas por um *software*.

INDICAÇÕES: detecção e estudo de **rearranjos estruturais** complexos ou **rearranjos intra cromossômicos**.

Citogenética Molecular

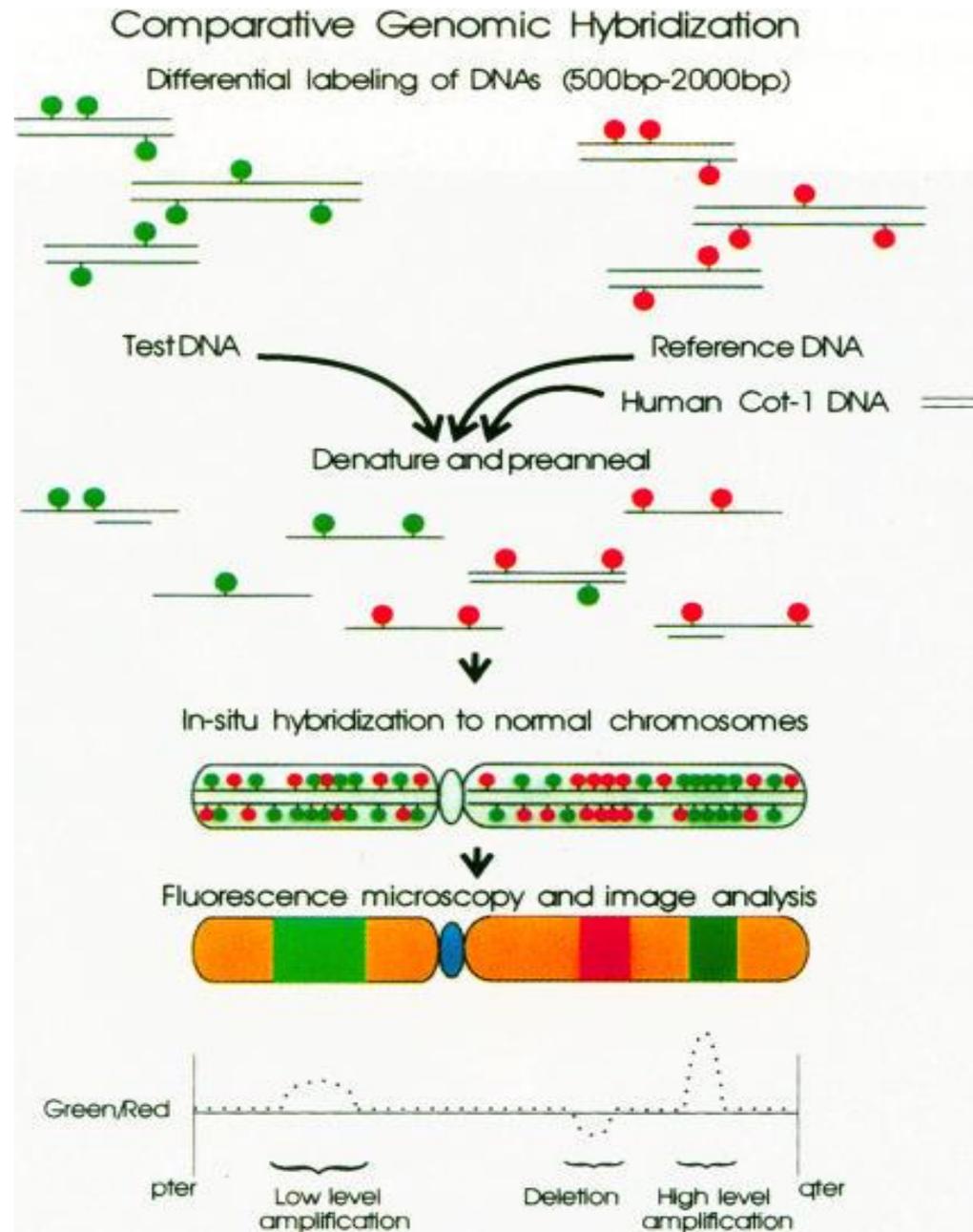
IV. Hibridação Genômica Comparativa (CGH)

DNA teste hibridado com DNA de referência normal em uma cél.metafásica



CGH

Metafásica



Aplicações da técnica de array-CGH

- **Determinação de regiões de perda e/ou ganho de material genômico;**
- **Identificação de pequenos marcadores;**
- **Identificação de material cromossômico adicional;**
- **Mapeamento da região genômica envolvida = correlação com fenótipo**
- **Resolução da técnica = Maior taxa de Diag. Etiológico**

METODOLOGIA array-CGH

DNA do paciente marcado com fluorocromo **vermelho**

DNA controle marcado com fluorocromo **verde**

DNA de ambos é hibridado ao microarray:

Lâmina contendo milhares de sondas especificamente selecionadas dentro de regiões do genoma

Após incubação, a comparação entre sinais vermelhos e verdes é interpretada pelo programa:

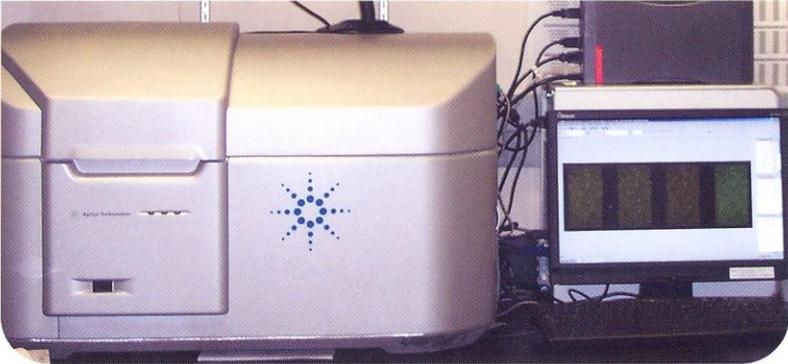
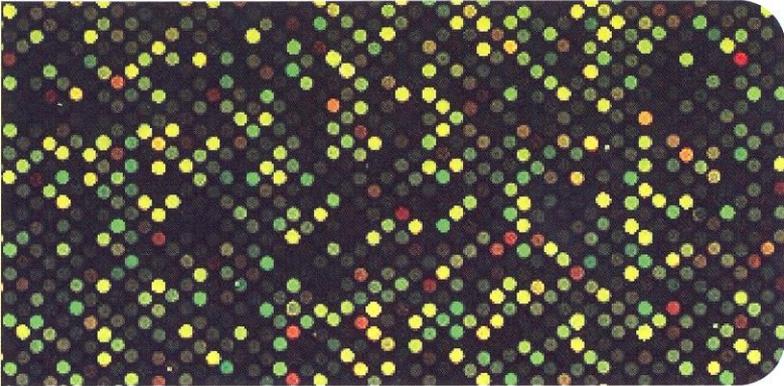
Amarelo = quantidades iguais = Normal

Vermelho >> **Verde** = Ganho genômico no paciente

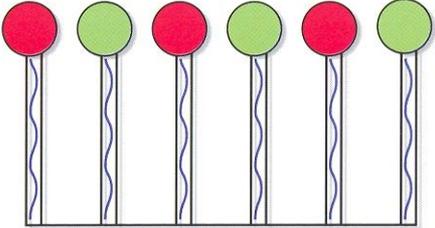
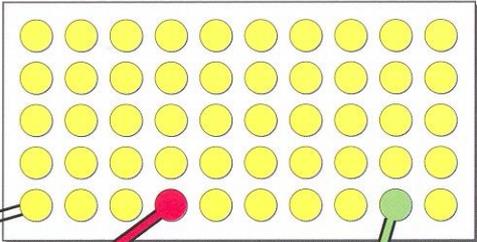
Vermelho << **Verde** = Perda genômica no paciente

Analysis

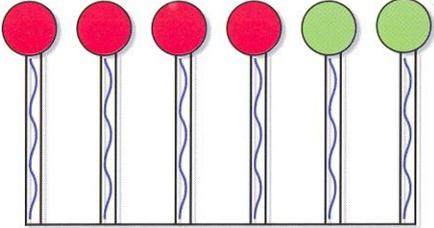
Actual microarray slide has 44,000-105,000 spots ⇒



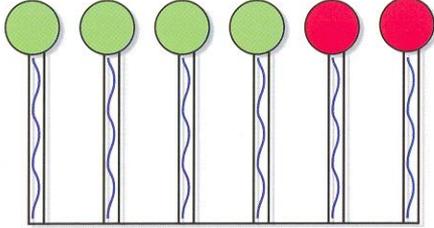
⇐ Analysis instrument



Normal Result



Genomic Gain (duplication)



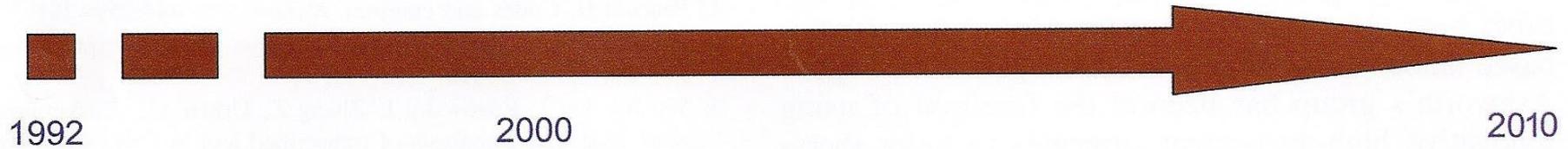
Genomic Loss (deletion)

INDICAÇÕES da CITOGENÔMICA

- Teste de Screening Primário para pacientes com **fenótipo inespecífico**;
- Teste complementar ou substituindo as técnicas de FISH em suspeita de: **síndromes de microdeleções ou duplicações** ou síndromes de genes contíguos;
- Teste diagnóstico para pacientes com **Deficiência Mental**, espectro autista, ou doenças com predisposição genética;
- **Para determinar presença ou ausência de um gene específico em região conhecida de desequilíbrio genômico**;
- Como teste diagnóstico complementar para **Doenças Mendelianas** causadas por perda funcional de um alelo (haploinsuficiência).

Low throughput
Low resolution

High throughput
High resolution

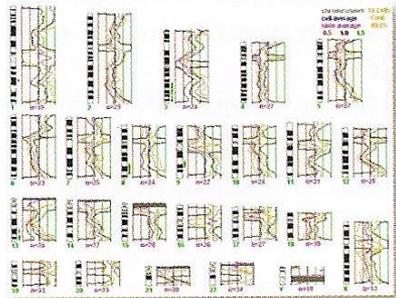


1992

2000

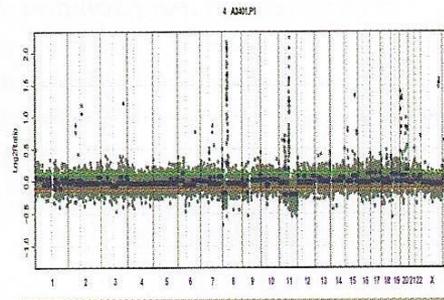
2010

Chromosomal
CGH



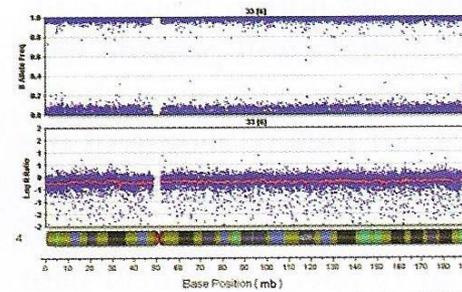
Numerical aberrations
Max res: 2 mb

BAC arrays



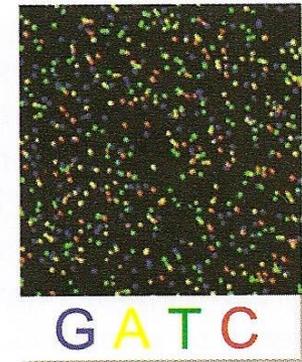
Numerical aberrations
Max res: 50 kb

Oligo/SNP arrays



Numerical aberrations
Max res: 1-2 kb
Allele changes
Structural aberrations
not assessable

Genome-wide
sequencing



Numerical aberrations
Max res: single base
Allele changes
Structural aberrations
assessable

CITOGENÉTICA CLÍNICA

- Estudo dos cromossomos, sua estrutura e herança, aplicado à prática da genética médica.

Mecanismos responsáveis por *fenótipo anormal*:

- (a) Efeito de dose, por falta (deleção) ou excesso (duplicação) de material cromossômico;
- (b) Efeito direto da aberração, com disrupção de um ou mais genes no ponto de quebra de um rearranjo;
- (3) Efeito causado por origem parental de um cromossomo ou segmento cromossômico, caracterizando o *imprinting* genômico;
- (4) Efeito de posição, relacionado à função inadequada de um gene.

OBJETIVO

- ✓ Estabelecer o diagnóstico citogenético utilizando

Investigação citogenética clássica

Investigação citogenética molecular

Investigação citogenômica

COLETA DE AMOSTRAS

- Sangue Periférico

Cultura temporária de linfócitos



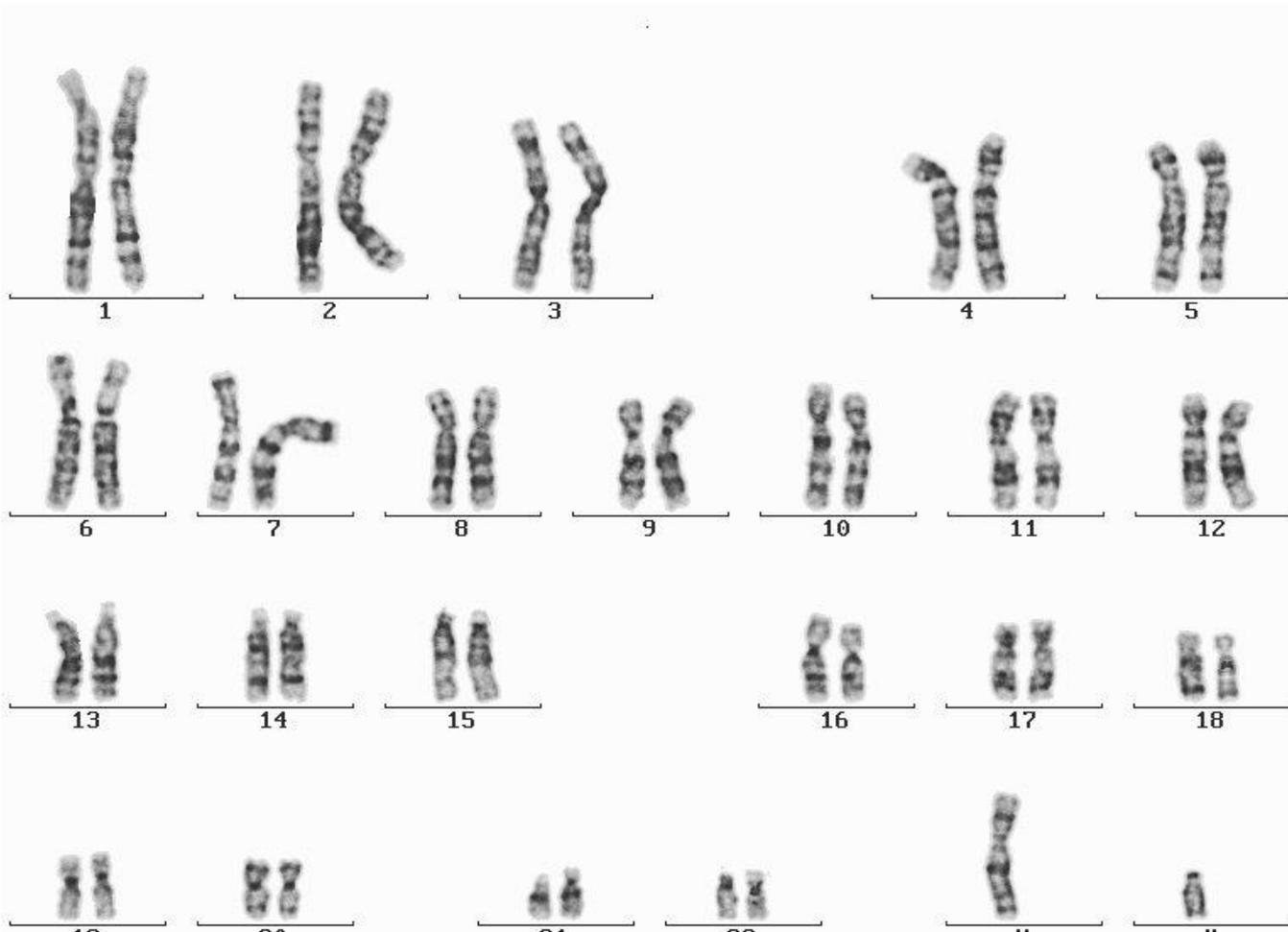
Bandeamento cromossômico



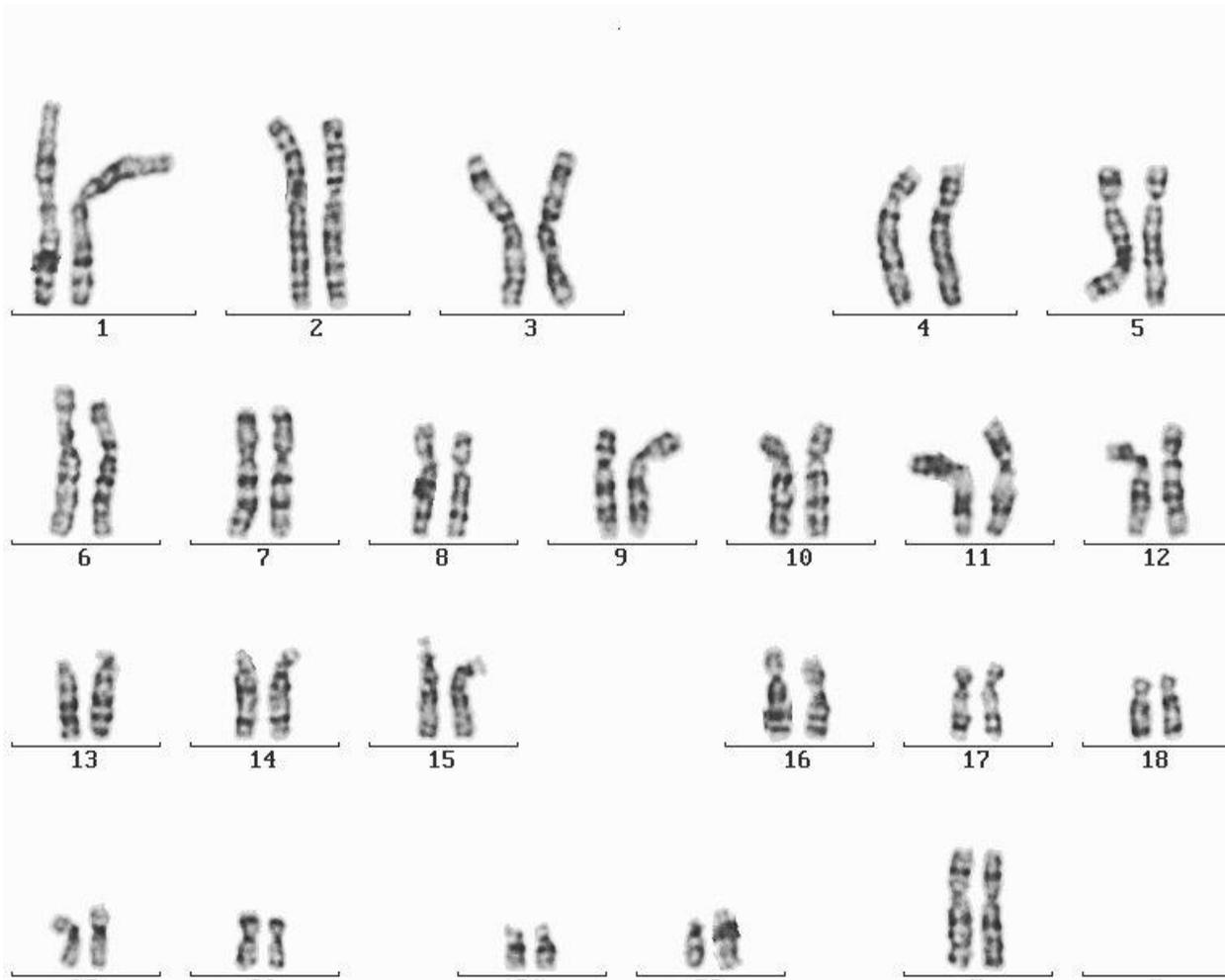
FISH, MBand e SKY

Extração de DNA → aCGH

- Sêmen → FISH



Bandamento GTG: Cariótipo de homem normal 46, XY



Bandamento GTG: Cariótipo de mulher normal 46, XX

Principais INDICAÇÕES para CARIÓTIPO

1. Alterações de Crescimento e Desenvolvimento:

Atraso no DNPM

Facies dismórfica

Malformações

Baixa Estatura

Deficiência Mental

Genitália Ambigua

INDICAÇÕES para CARIÓTIPO

2. Natimortos e Óbito neonatal
3. Infertilidade ou Abortos Recorrentes
4. Neoplasia (cariótipo de tecidos)
5. História Familiar Positiva de Cromossomopatia
6. Gestação em mulher com idade elevada (>35anos)

- Pessoas com suspeita de uma síndrome cromossômica reconhecida (p. ex., síndrome de Down)
- Pessoas com um padrão não reconhecível de duas ou mais malformações
- Pessoas com genitália ambígua
- Retardo mental ou atraso no desenvolvimento em crianças com múltiplas anomalias físicas
- Genitores e filhos de pessoas com translocações cromossômicas, deleções ou duplicações
- Natimortos com malformações congênitas ou sem razão identificável para morte fetal
- Mulheres com baixa estatura proporcional e amenorreia primária
- Homens com testículos pequenos ou ginecomastia significativa

Anomalias Cromossômicas

CROMOSSOMOPATIAS

Aneuploidias

Autossomos

Cromossomos Sexuais

Aberrações Estruturais

Anomalias cromossômicas

- Aneuploidias
 - Trissomias;
 - Monossomias;
 - Tetrassomias.
- Poliploidias
- Anomalias estruturais
 - Translocação Recíproca;
 - Translocação Robertsoniana;
 - Deleção;
 - Inversão;
 - Duplicação;
 - Inserção;
 - Cromossomo em anel;
 - Isocromossomo.

ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

NUMÉRICAS = ANEUPLOIDIAS

Tipo mais comum de Alteração Cromossômica clinicamente significativa

- **Trissomias completas**
- **Trissomias parciais**

- **Monossomias**
- **Triploidia (3n)**
- **Tetraploidia (4n)**

Mosaicismo Cromossômico

- Presença de dois ou mais complementos cromossômicos
- Causa: não disjunção nas divisões mitóticas pós-zigóticas iniciais
- Impossível prever fenótipo em cariótipo mosaico
- Ex: cariótipo 47, XY,+21/46,XY

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS HCFMRP

30,14% = 2.251 cariótipos

- Aberrações cromossômicas NUMÉRICAS:
1363 cariótipos (=18,25%);
- Aberrações cromossômicas ESTRUTURAIS:
405 cariótipos (=5,42%);
- Variantes da normalidade, incluindo polimorfismos cromossômicos, presença de satélites e alteração de heterocromatina em 483 exames (= 6,47%).

Aneuploidias Cromossômicas

CARIÓTIPO	Número de casos	TOTAL	Aneuploidia (%)	Amostra Total (%)
45,X	222	222	16,28	2,97
47,XX,+13	8	20	1,47	0,27
47,XY,+13	12			
47,XX,+18	48	67	4,92	0,88
47,XY,+18	19			
47,XX,+21	450	983	72,12	13,16
47,XY,+21	533			
47,XXX	7	7	0,51	0,094
47,XXY	55	55	4,04	0,74
48,XXYY	5	5	0,36	0,067
47,XYY	4	4	0,29	0,054
TOTAL		1363	100%	18,25%

Síndrome de Down



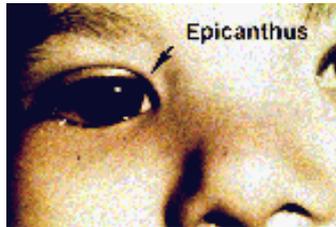
Incidência +/- 1/700 RN;

- Baixa estatura relativa;
- Deficiência mental; Hipotonia;
- Microcefalia, braquicefalia
- Perfil facial achatado;
- Cabelos finos;
- Fendas palpebrais oblíquas para cima;
- Boca permanentemente aberta; Língua protrusa, grande e fissurada;



Síndrome de Down (trissomia do 21)

Síndrome de Down - Fenótipo



- Epicanto;
- Manchas de Brushfield na íris;
- Orelhas pequenas, baixa implantação, sobredobramento de ramo horizontal de hélix;
- Perda de audição;
- Defeitos cardíacos estruturais em cerca de 40% dos casos;

Síndrome de Down - Fenótipo

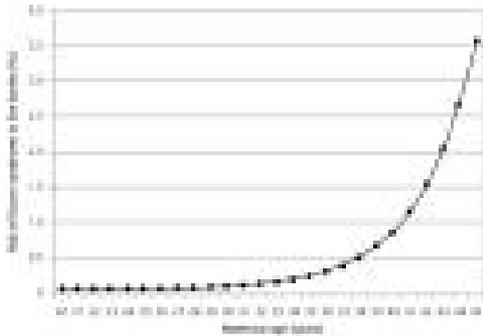


A 5mm nuchal skin fold

- Pés largos e curtos;
- Braquidactilia;
- Aumento da distância entre 1° e 2° artelhos;
- Excesso de pele na nuca;
- Os homens em sua maioria são estéreis (hipogonadismo);

Síndrome de Down (trissomia do 21)

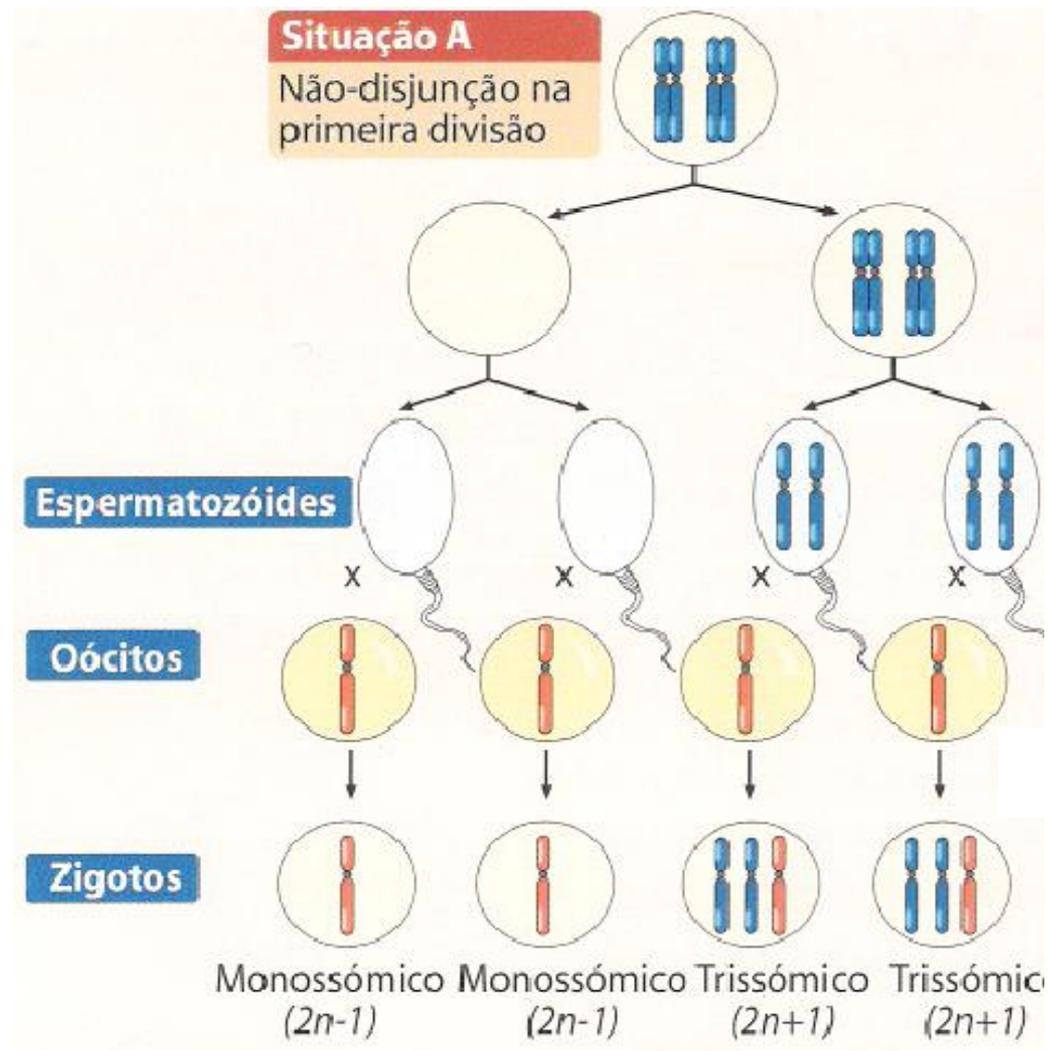
Síndrome de Down - ETIOLOGIA



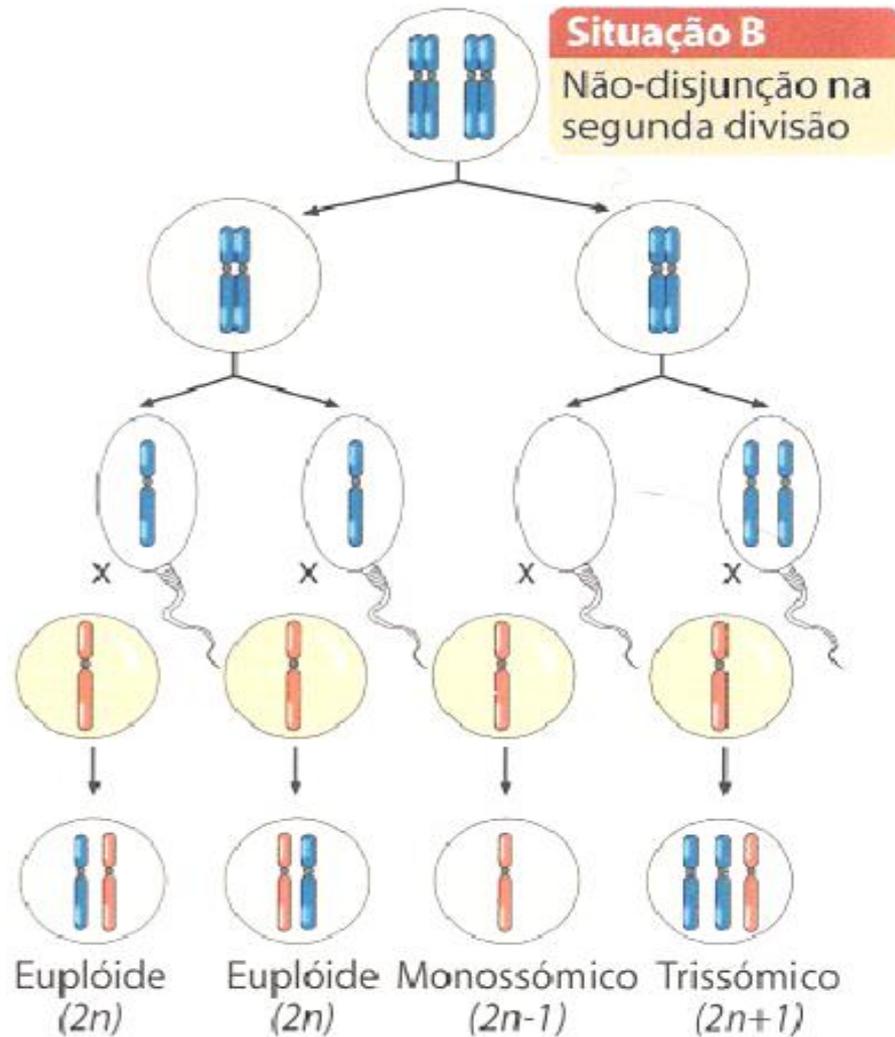
Síndrome de Down (trissomia do 21)

- Cerca de 80% dos casos ocorrem por não disjunção;
- Aumento do risco – idade materna >35 anos;
- Maioria dos casos - não disjunção materna durante a meiose I;
- Mosaicismo detectado em 1 a 3% dos casos.

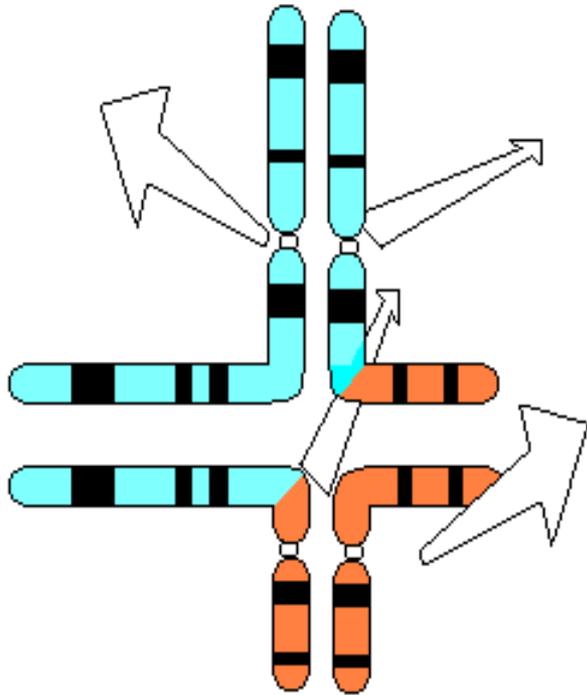
Aneuploidia por Não-disjunção na meiose I



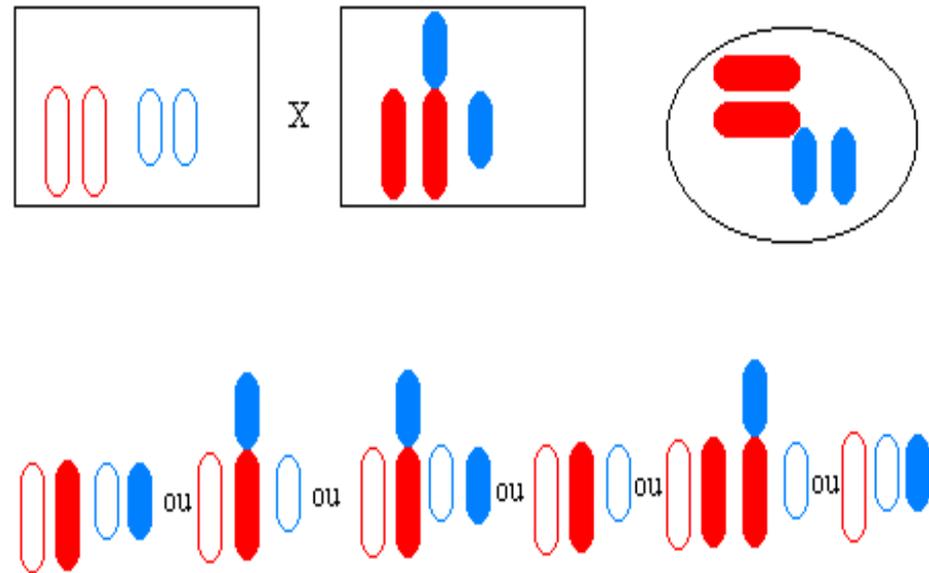
Não-disjunção na meiose II



Segregação Meiótica t(14;21)



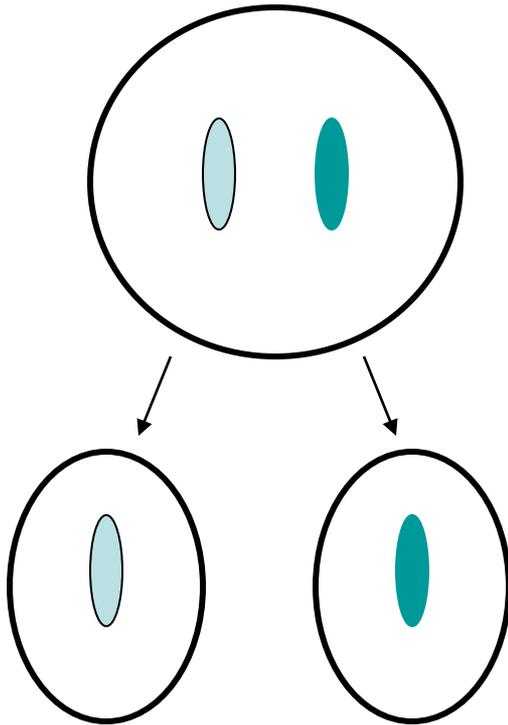
Segregação cromossômica na Gametogênese



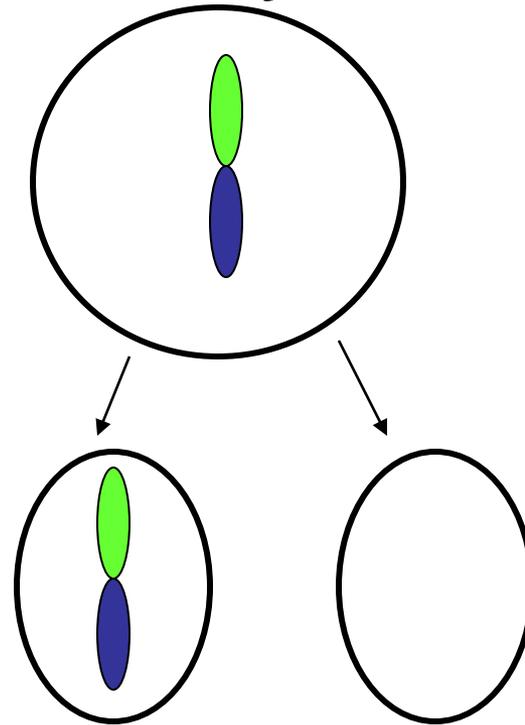
Combinações possíveis de cromossomos nas células germinativas t(14;21)

Segregação Meiótica t(21;21)

Normal



Translocação 21;21



ACONSELHAMENTO GENÉTICO PARA S. DOWN

Fatores determinantes:

Diagnóstico citogenético: Cariótipo

Idade Materna

Casos semelhantes na família

Síndrome de Edwards = Tri 18



Síndrome de Edwards
(Trissomia do 18)

- Incidência de +/- 1/8.000 RN;
- Baixo peso ao nascimento;
- Crises de cianose;
- Deficiência mental grave;
- Tremores e convulsões na 1ª s;
- Hipertonia;
- Dolicocefalia;
- Orelhas malformadas;

Síndrome de Edwards - Fenótipo

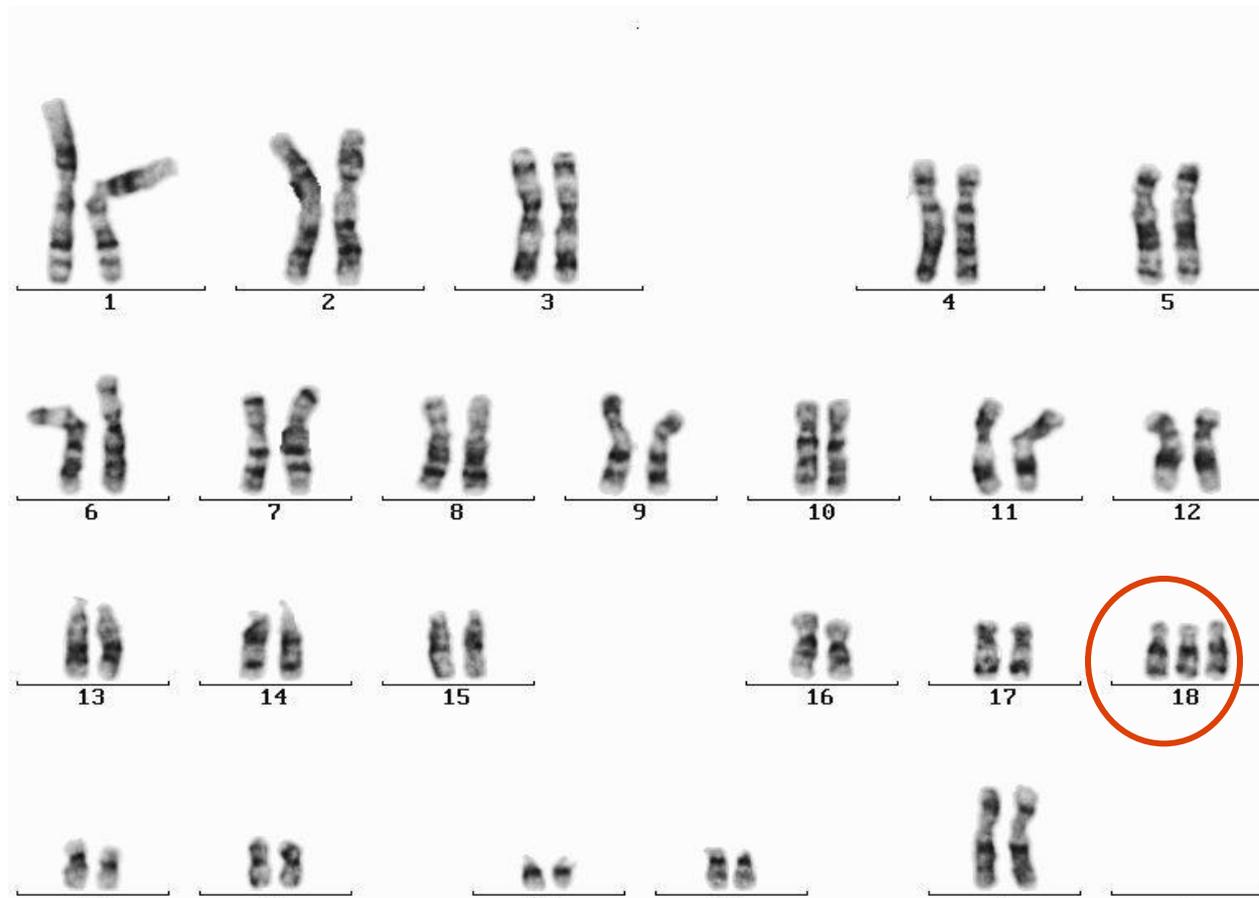


Síndrome de Edwards
(Trissomia do 18)

- Quirodáctilos com posição característica;
- Hipoplasia das unhas;
- Pés em mata-borrão;
- Dorsiflexão do 1° artelho;
- Várias malformações congênicas;
- Defeitos cardíacos congênicos (septo ventricular);
- Anomalias renais.

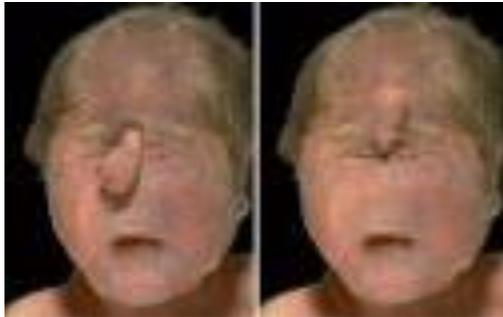
CARIÓTIPO

Síndrome de Edwards



**Síndrome de Edwards
(Trissomia do 18)**

Síndrome de Patau = Tri 13



**Síndrome de Patau
(Trissomia do 13)**

- Incidência de cerca de 1/12.000 RN;
- Baixo peso ao nascimento;
- Convulsões e crises de apnéia;
- Microcefalia;
- Fontanelas amplas;
- Microftalmia; Hipotelorismo
- Lábio leporino;
- Fenda palatina;

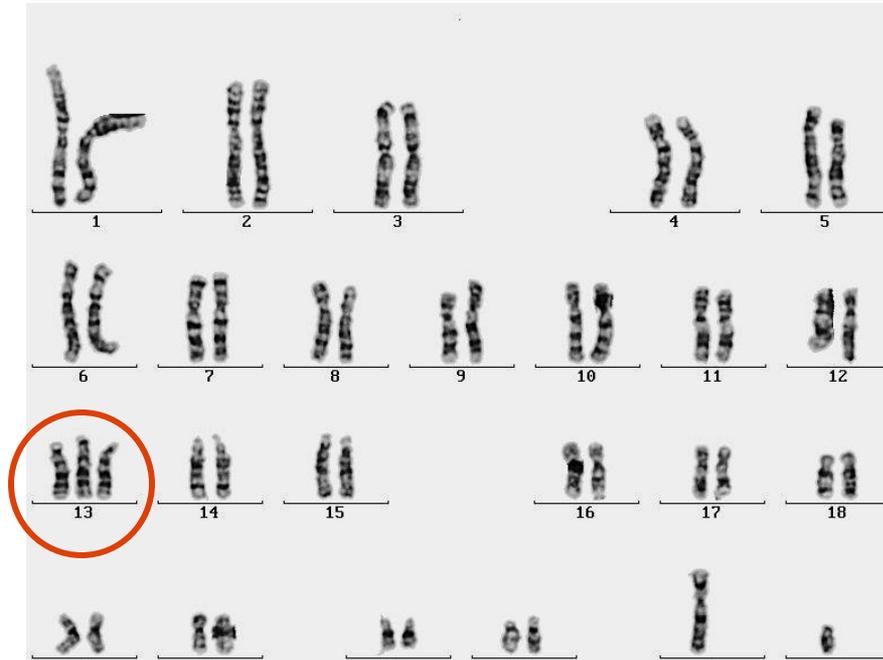
Síndrome de Patau - Fenótipo



- Falhas circunscritas do couro cabeludo;
- Polidactilia;
- Alterações renais;
- Alterações cardíacas.

**Síndrome de Patau
(Trissomia do 13)**

Síndrome de Patau - Cariótipo



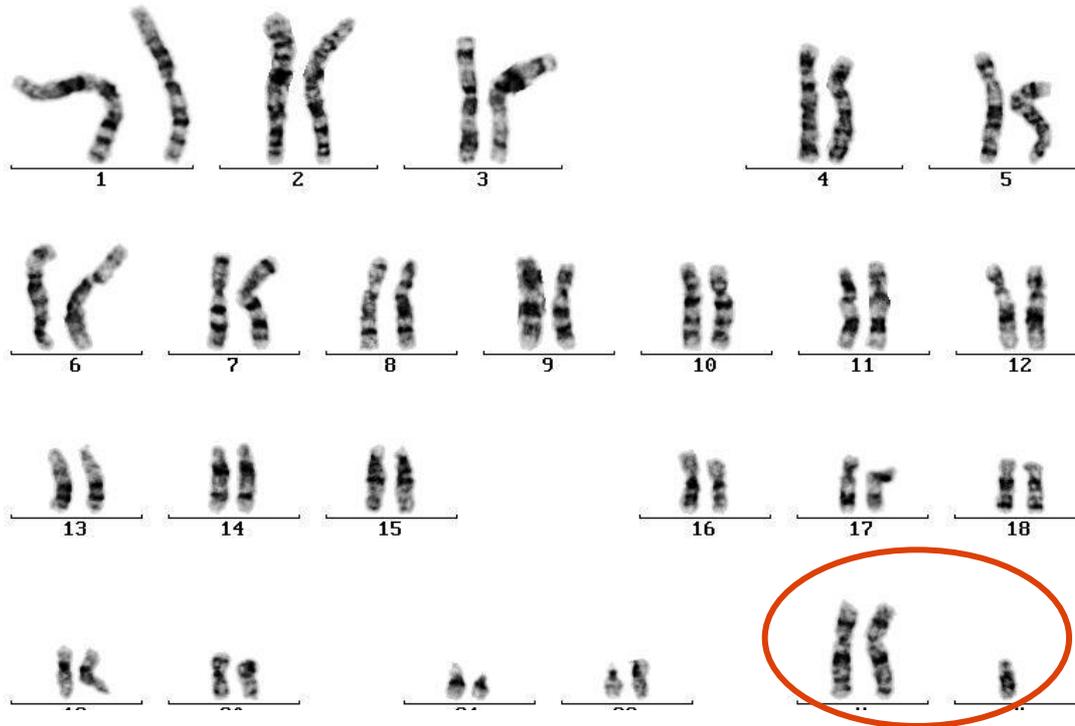
47,XY+13

Síndrome de Klinefelter



- Incidência de cerca de 1/1.000 RN masc.;
- Estatura geralmente elevada;
- Envergadura maior que a estatura;
- Infertilidade;
- Hipogonadismo hipergonadotrófico;
- Distribuição de gordura e pelos corpóreos femininos;
- Testículos pequenos com azoospermia;
- Cariótipo mais comum: 47,XXY
- Outros cariótipos: 47,XXY/46,XY;
48,XXXY; 48,XXYY

Síndrome de Klinefelter



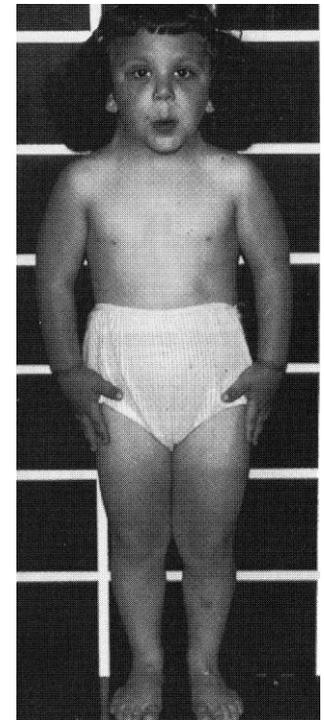
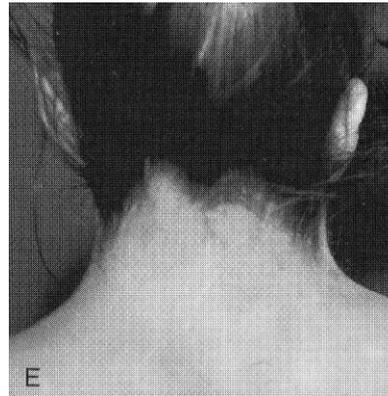
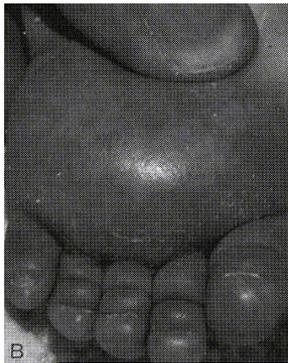
Síndrome de Klinefelter
(Cariótipo 47,XXY)

Síndrome de Turner



- Incidência de 1/2.500 a 3.000 de nascidos vivos;

Sexo feminino.



S. Turner - Cariótipo

- 45,X em 53%
- 45,X/46,XX em 15%
- 46,X,i(Xq) em 10%
- 45,X/46,X,i(Xq) em 8%
- 46,X,Xp- ou Xq- em 6%
- Outros mosaicismos em 8%

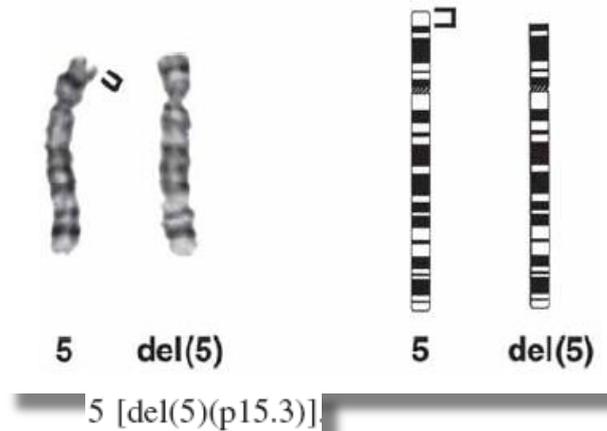
ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

ESTRUTURAIS

- Deleção
- Duplicação
- Inversão
- Translocação
- Formação em anel
- Isocromossomo
- Cromossomo marcador

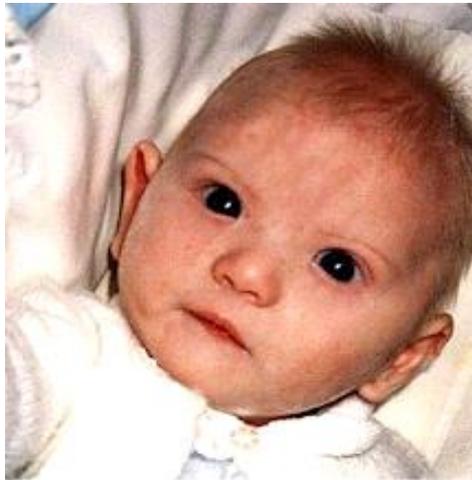
Deleções

- Perdas de segmentos cromossômicos:
 - deleção terminal – simples quebra, sem reunião das extremidades



- deleção intersticial – dupla quebra, perda de um segmento interno, seguida da soldadura

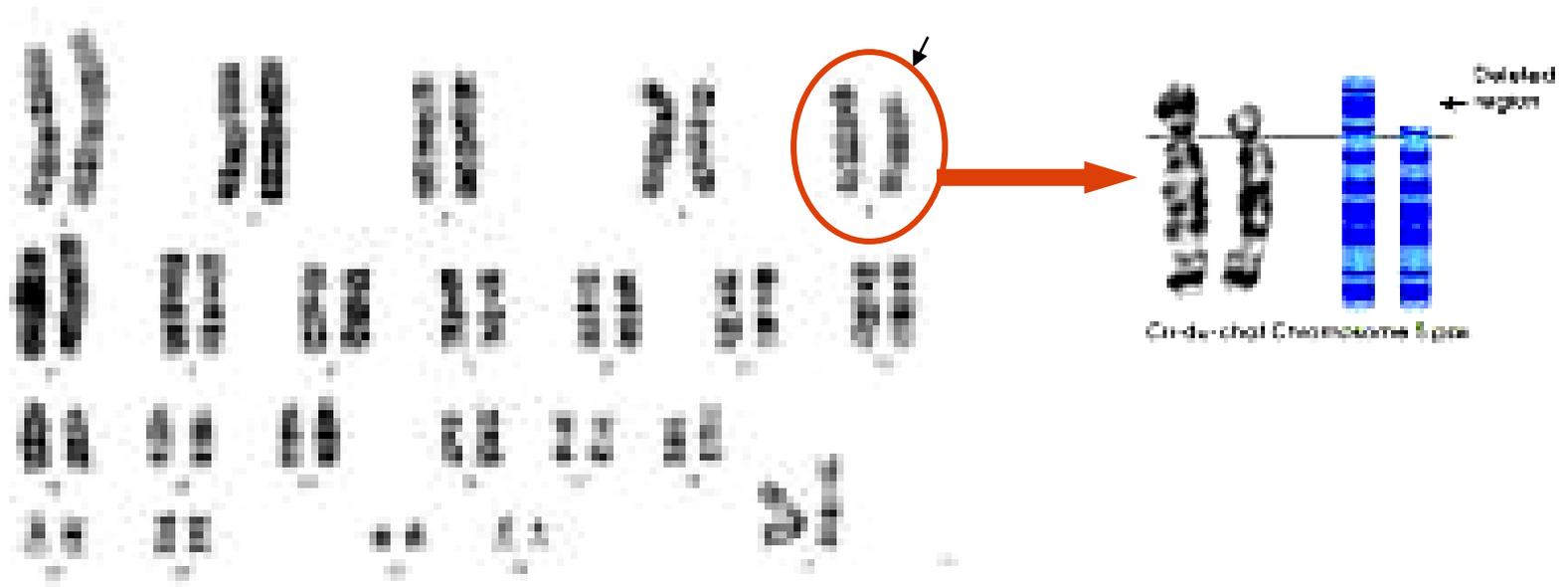




Cri-du-chat
Síndrome do miado de gato
Deleção de 5p

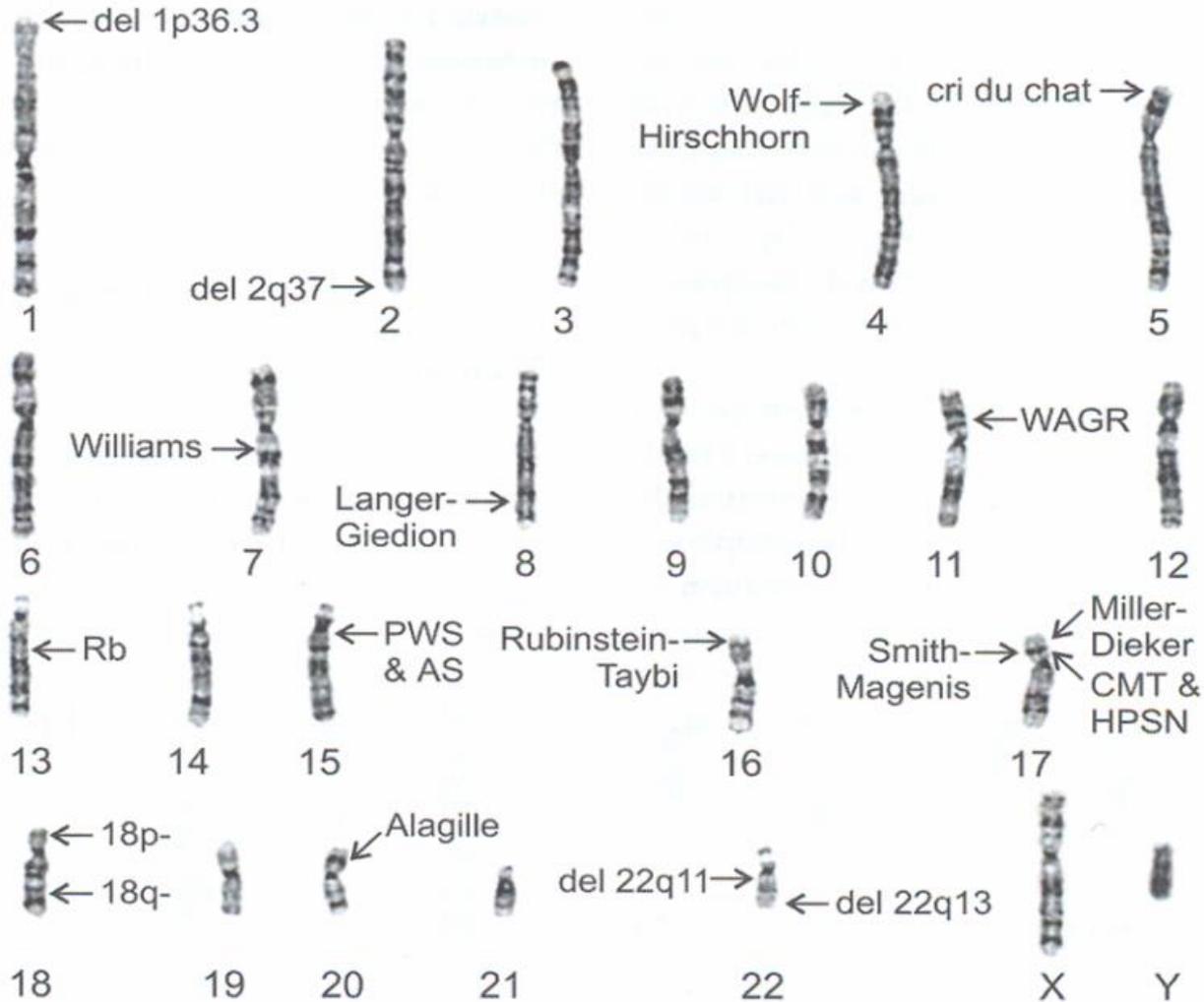
- Incidência de +/- 1/50.000 RN;
- Baixo peso ao nascimento;
- Hipotonia;
- Choro fraco semelhante ao miado do gato;
- Microcefalia;
- Face arredondada
- Hipertelorismo ocular; Epicanto; Estrabismo;
- Orelhas de displásicas;
- Cardiopatia congênita;
- Prega palmar única.

Cri du chat - Cariótipo



Deleção 5p

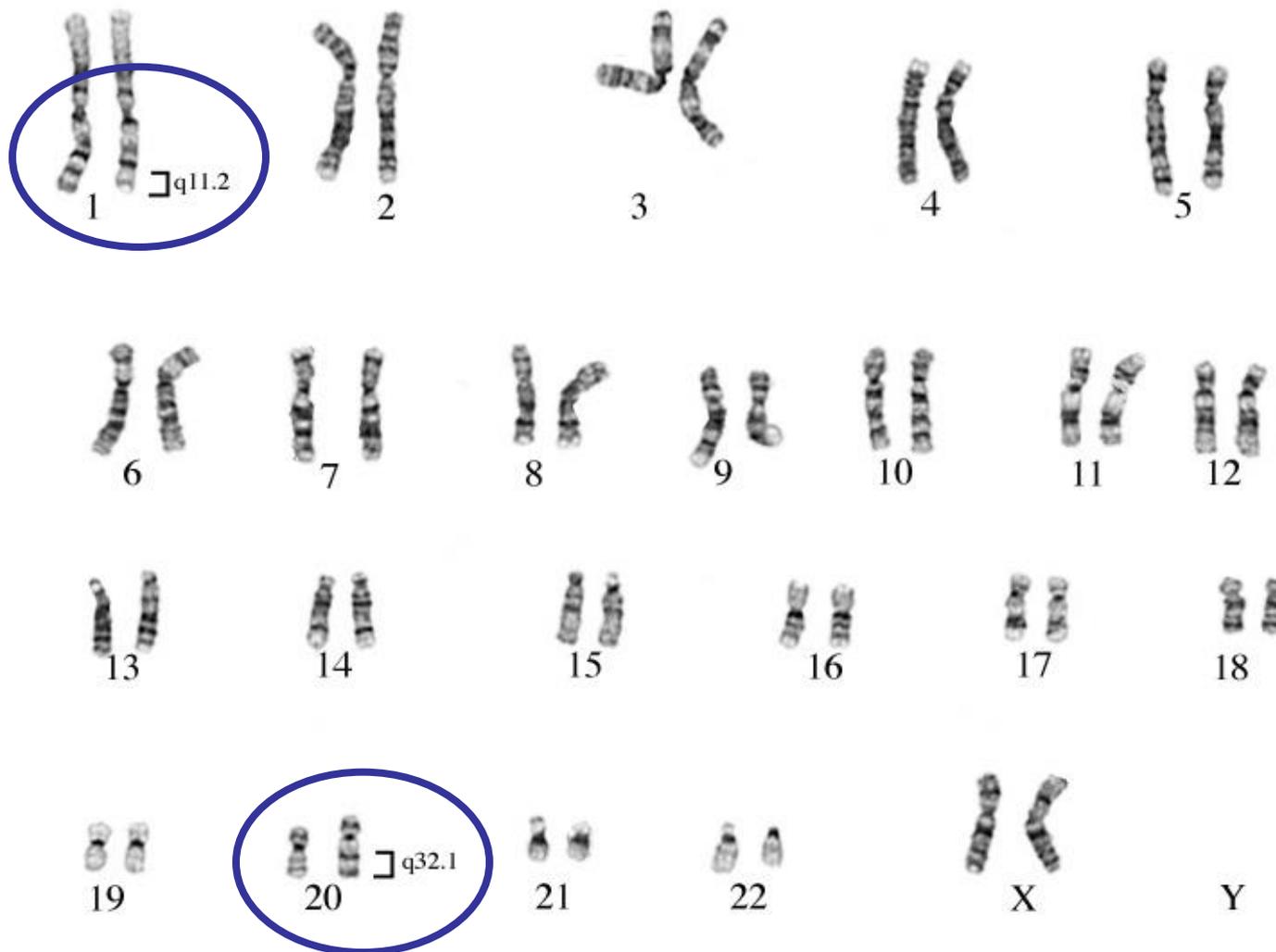
Deleções



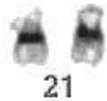
Translocação Recíproca equilibrada

46, XX, t(1;20)(q32.1;q11.2)

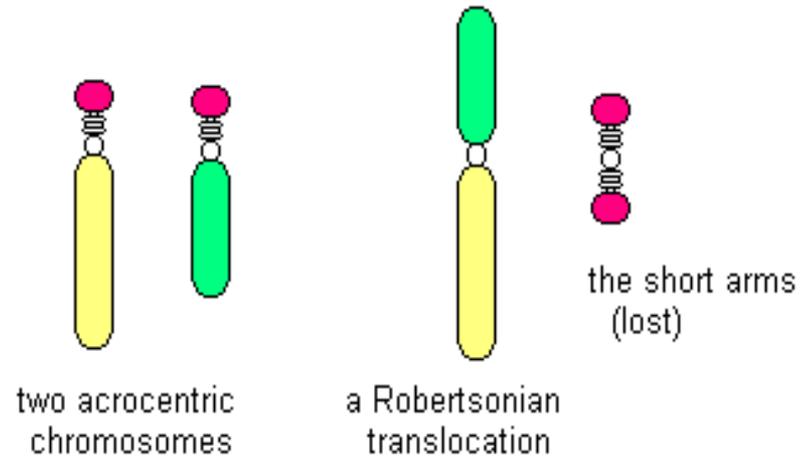
ZWK99027 KEY



Translocação Robertsoniana



Cromossomos acrocêntricos



Translocação Robertsoniana

DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO MOLECULAR DE CROMOSSOMOS MARCADORES POR FISH + SKY

PROTOCOLO PARA DIAGNÓSTICO:

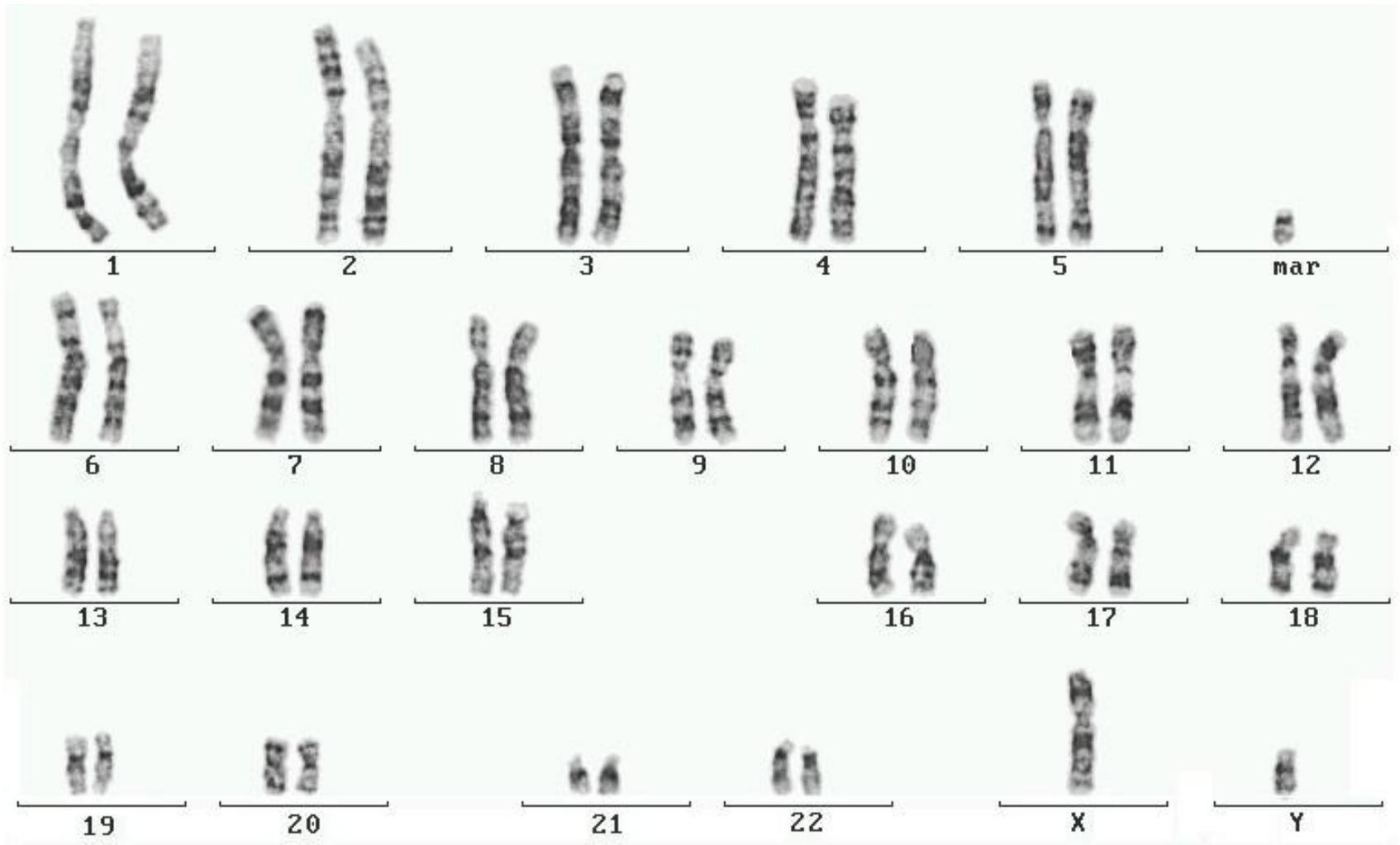
Análise de 100 células;

Cariótipo dos pais;

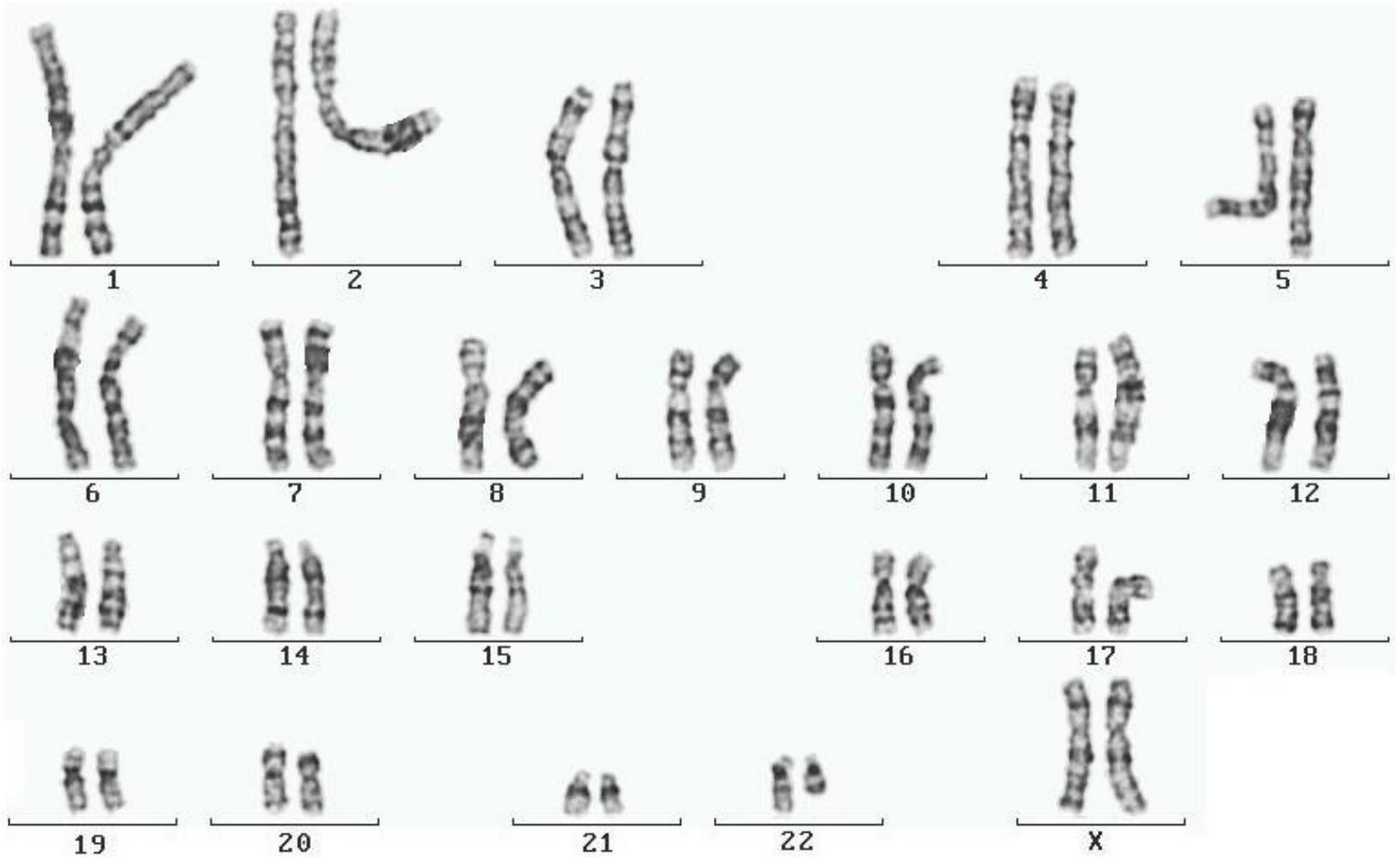
Bandamentos GTG, CBG, AgNOR: acrocêntricos;

Def. Origem por FISH + SKY.

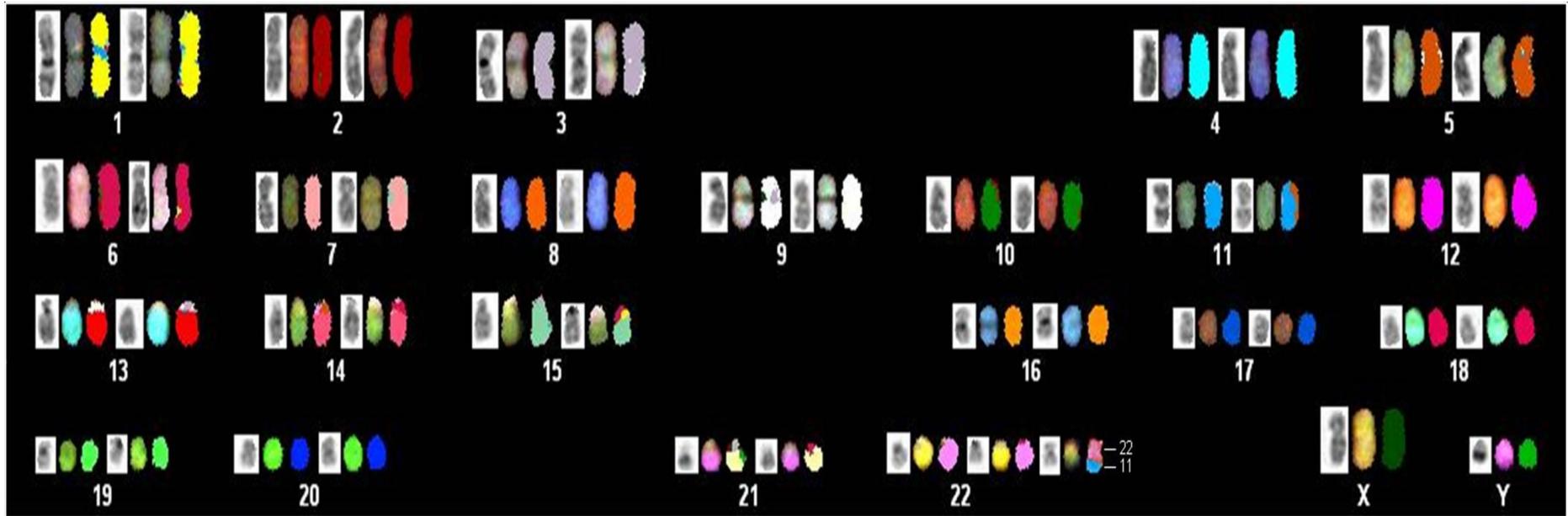
Cariótipo 47,XY,+mar



Cariótipo materno 46,XX,der(22)t(11;22)(q23.3;q11.2)

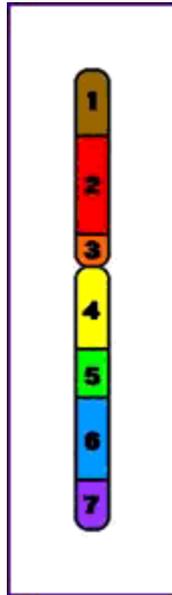


Cariótipo espectral 47,XY,+mar.ish der(22)t(11;22)

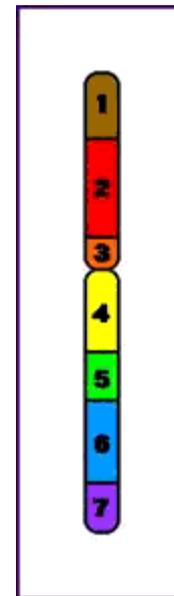


INVERSÕES CROMOSSÔMICAS

INVERSÃO PARACÊNTRICA



INVERSÃO PERICÊNTRICA

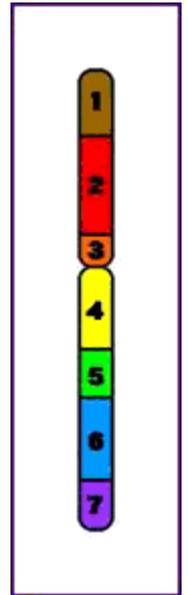
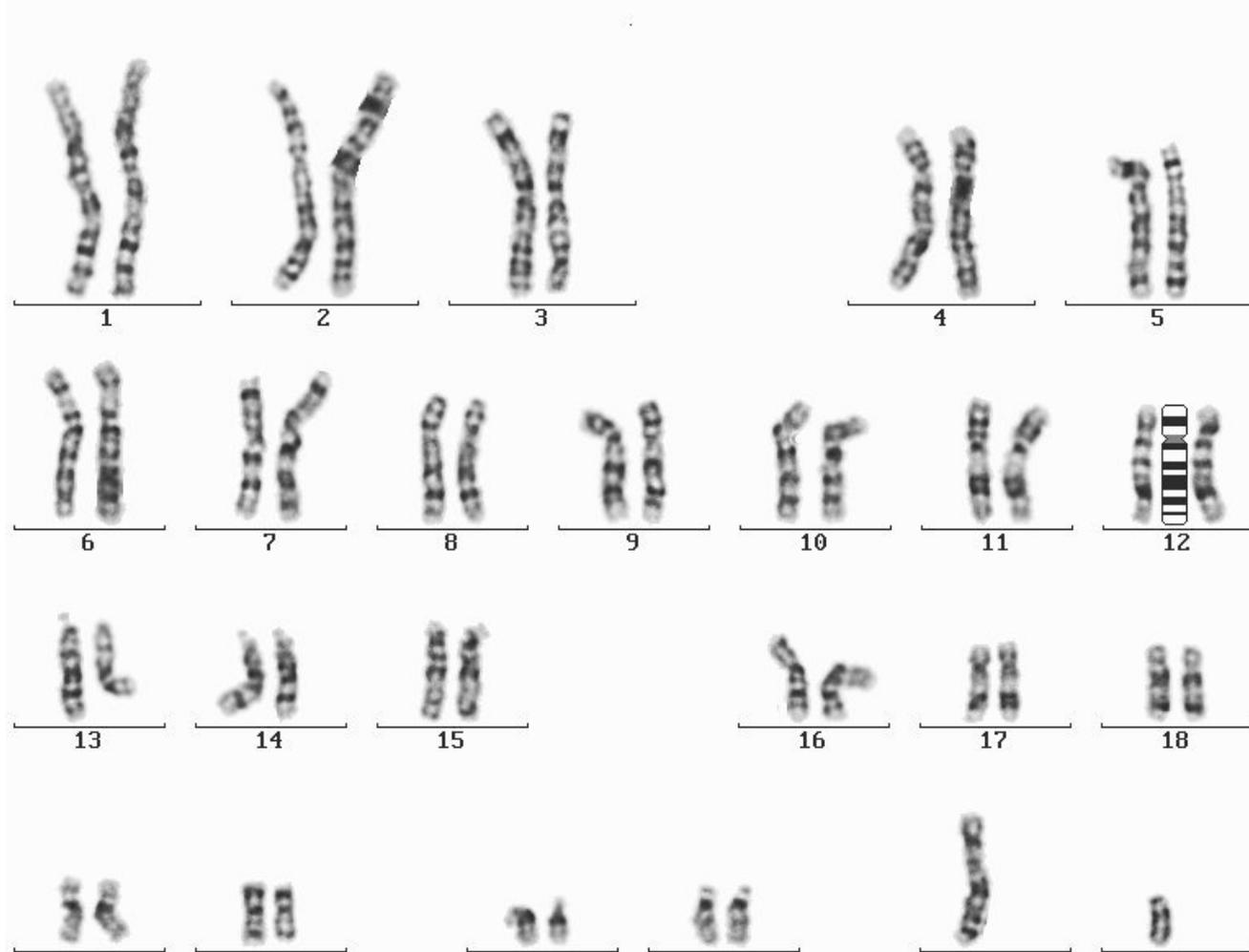


DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO MOLECULAR POR M-Band

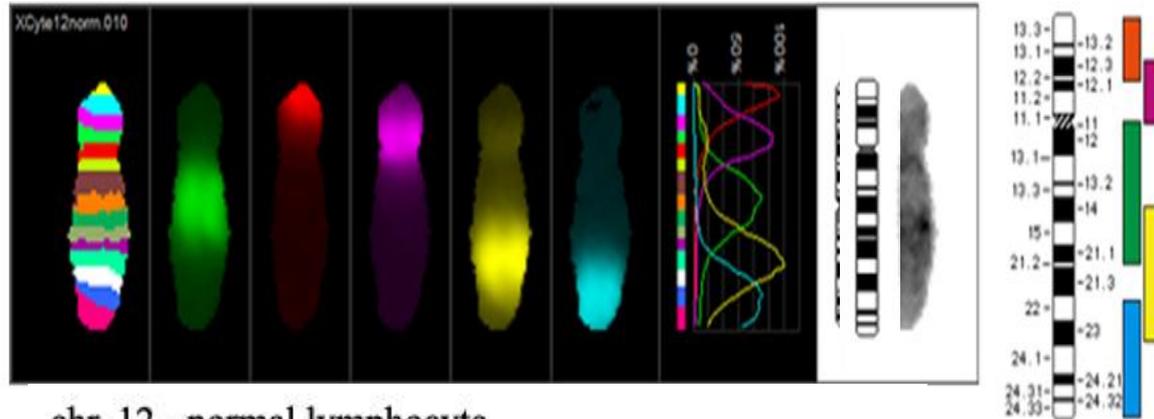
Inversão pericêntrica no cromossomo 12 em paciente com
deficiência mental e dismorfias:

46,XY,der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1)x2

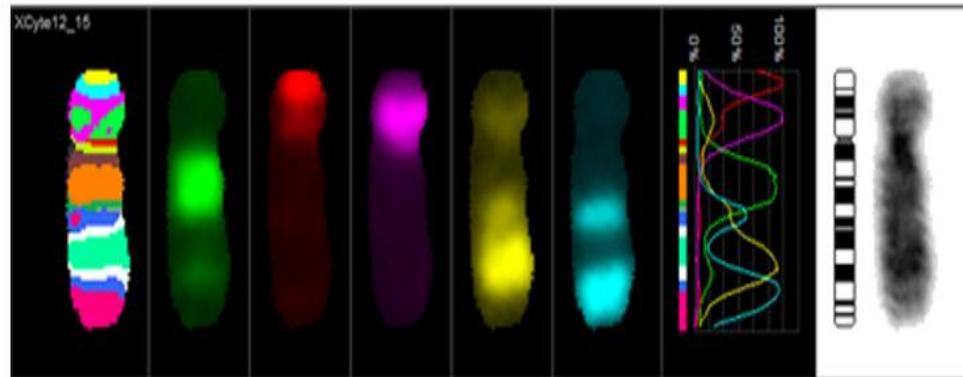
Inversão paracêntrica herdada em homozigose de 12p e 12q



M-Band



chr. 12 - normal lymphocyte



mBand XCYte12 results for patient
der(12)inv(12)(p11.2p12.3)inv(12)(q21.1q24.1) x2

DIAGNÓSTICO CITOGENÔMICO pela técnica de a-CGH

Rearranjos Cromossômicos:

85% de diagnóstico em cromossomos marcadores;

100% de diagnóstico em material adicional;

Mapeamento de translocações;

Maiores índices de diagnóstico;

Correlação genótipo/fenótipo

Citogenética Clínica

1. **Cariótipo em bandamentos GTG, CBG e NOR;**
2. **FISH;**
3. **Cariótipo espectral;**
4. **array-CGH.**



CONCLUSÕES

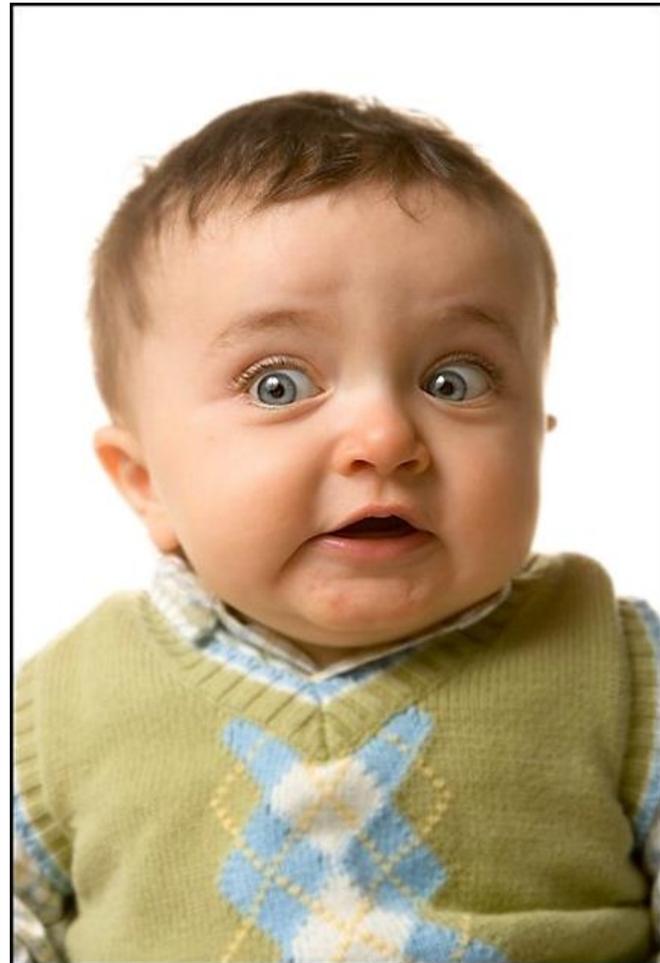
A associação de técnicas de análise cromossômica e de citogenética molecular permitiu estabelecer a correlação entre cariótipo e fenótipo em pacientes encaminhados para diagnóstico citogenético, ampliando o espectro clínico sugestivo de cromossomopatias.

DESAFIO

Exames Citogenéticos na rede pública de Saúde

www.DATASUS.gov.br

R\$ 32,48



CITOGENÉTICA CLÁSSICA CITOGENÉTICA MOLECULAR CITOGENÔMICA

RESOLUÇÃO na citogenética contemporânea:

Bandeamento cromossômico de 5 a 8Mb

Técnica de FISH pode atingir 0,5kb

SKY entre 2-3Mb

CGH varia entre 3-10Mb

array-CGH de 1kb a 1Mb.



21 DE MARÇO
DIA MUNDIAL DA SÍNDROME DE DOWN



a maior limitação ainda é o preconceito