



CITOGENÉTICA HUMANA

excelência desde 1956



THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN

By JOE HIN TJIO and ALBERT LEVAN

ESTACION EXPERIMENTAL DE ACLA DEL, ZARAGOZA, SPAIN, AND CANCER CHROMOSOME LABORATORY, INSTITUTE OF GENETICS, LUND, SWEDEN

WHILE staying last summer at the Sloan-Kettering Institute, New York, one of us tried out some modifications of HSU's technique (1952) on various human tissue cultures carried in serial *in vitro* cultivation at that institute. The results were promising inasmuch as some fairly satisfactory chromosome analyses were obtained in cultures both of tissues of normal origin and of tumours (LEVAN, 1956).

Later on both authors, working in cooperation at Lund, have tried still further to improve the technique. We had access to tissue cultures of human embryonic lung fibroblasts, grown in bovine amniotic fluid; these were very kindly supplied to us by Dr. RUNE GRUBB of the Virus Laboratory, Institute of Bacteriology, Lund. All cultures were primary explants taken from human embryos obtained after legal abortions. The embryos were 10–25 cm in length. The chromosomes were studied a few days after the *in vitro* explantation had been made.

In our opinion the hypotonic pre-treatment introduced by HSU, although a very significant improvement especially for spreading the chromosomes, has a tendency to make the chromosome outlines somewhat blurred and vague. We consequently tried to abbreviate the hypotonic treatment to a minimum, hoping to induce the scattering of the chromosomes without unfavourable effects on the chromosome surface. Pre-treatment with hypotonic solution for only one or two minutes gave good results. In addition, we gave a colchicine dose to the culture medium 12–20 hours before fixation, making the medium 50×10^{-7} mol/l for the drug. The colchicine effected a considerable accumulation of mitoses and a varying degree of chromosome contraction. Fixation followed in 60% acetic acid, twice exchanged in order to wash out the salts left from the culture medium and from the hypotonic solution that would otherwise have caused precipitation with the orcein. Ordinary squash preparations were made in 1% acetic orcein. For chromosome counts the squashing was made very mild in order to keep the chromosomes in the metaphase groups. For idiogram studies a more thorough squashing was preferable. In many cases single cells were squashed



Fig. 2. Four idiogram analyses of human embryonic lung fibroblasts grown *in vitro*. The chromosomes have been grouped in three classes: M (top row), S (bottom row), and T (in between, except in *b*, where T is at the end of the S row). Within each class the chromosomes have been roughly arranged in diminishing order of size. —
×2400.

Nomenclatura Citogenética

Conferência de Denver em 1960

Conferência de Londres: grupos

Conferência de Chicago: form. curta

Conferência de Paris* em 1971

24 pares e rearranjos estruturais

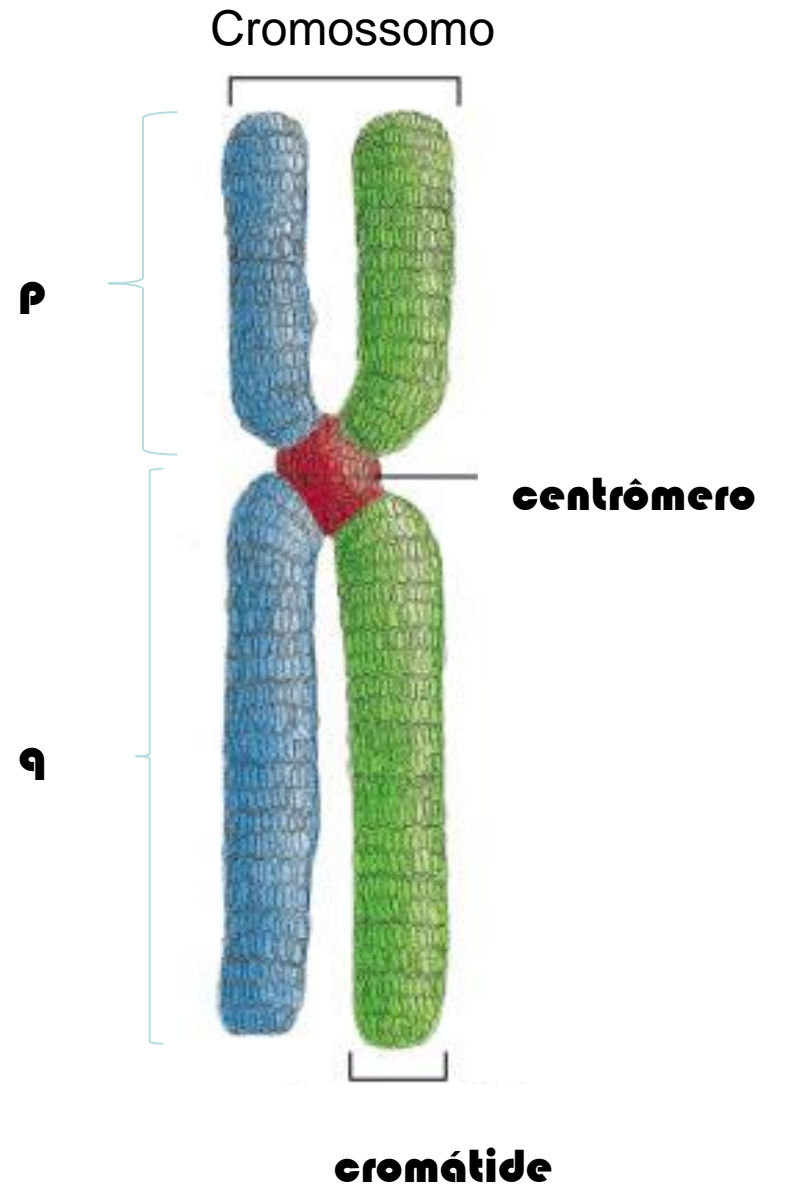
ISCN: 1978 – 1981 – 1985

ISCN 1995: FISH + cancer

ISCN 2005*: resolução 300-700 bandas

FISH; CGH

ISCN 2009: aCGH e citogenômica

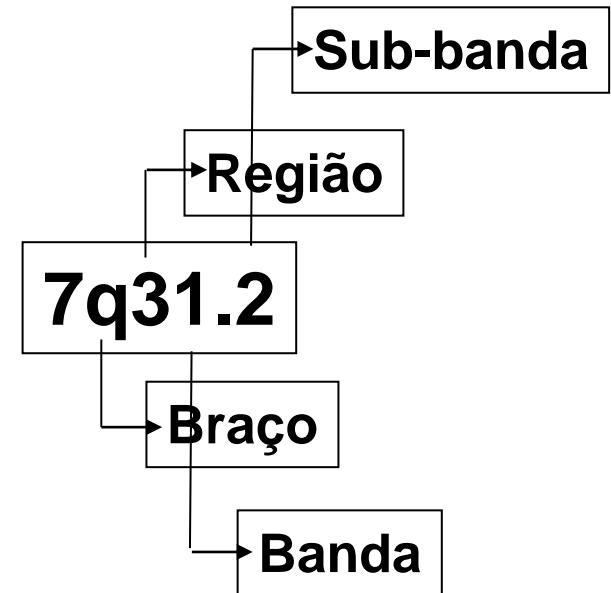
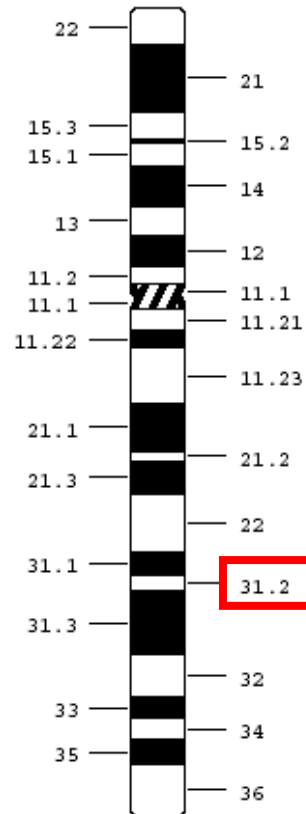


Citogenética Clássica

Nomenclatura ISCN

CHROMOSOME 7

550

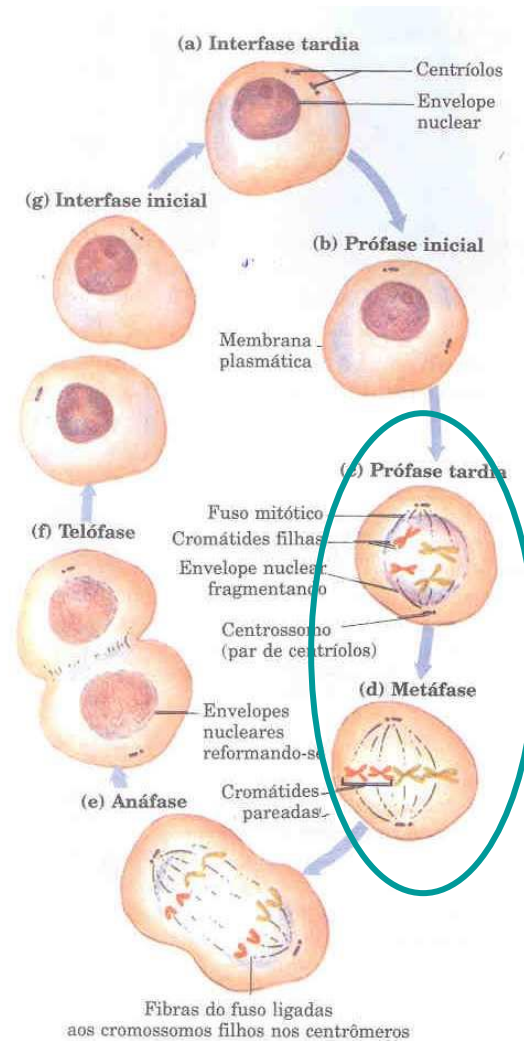


AMOSTRAS para Análise Cromossômica

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

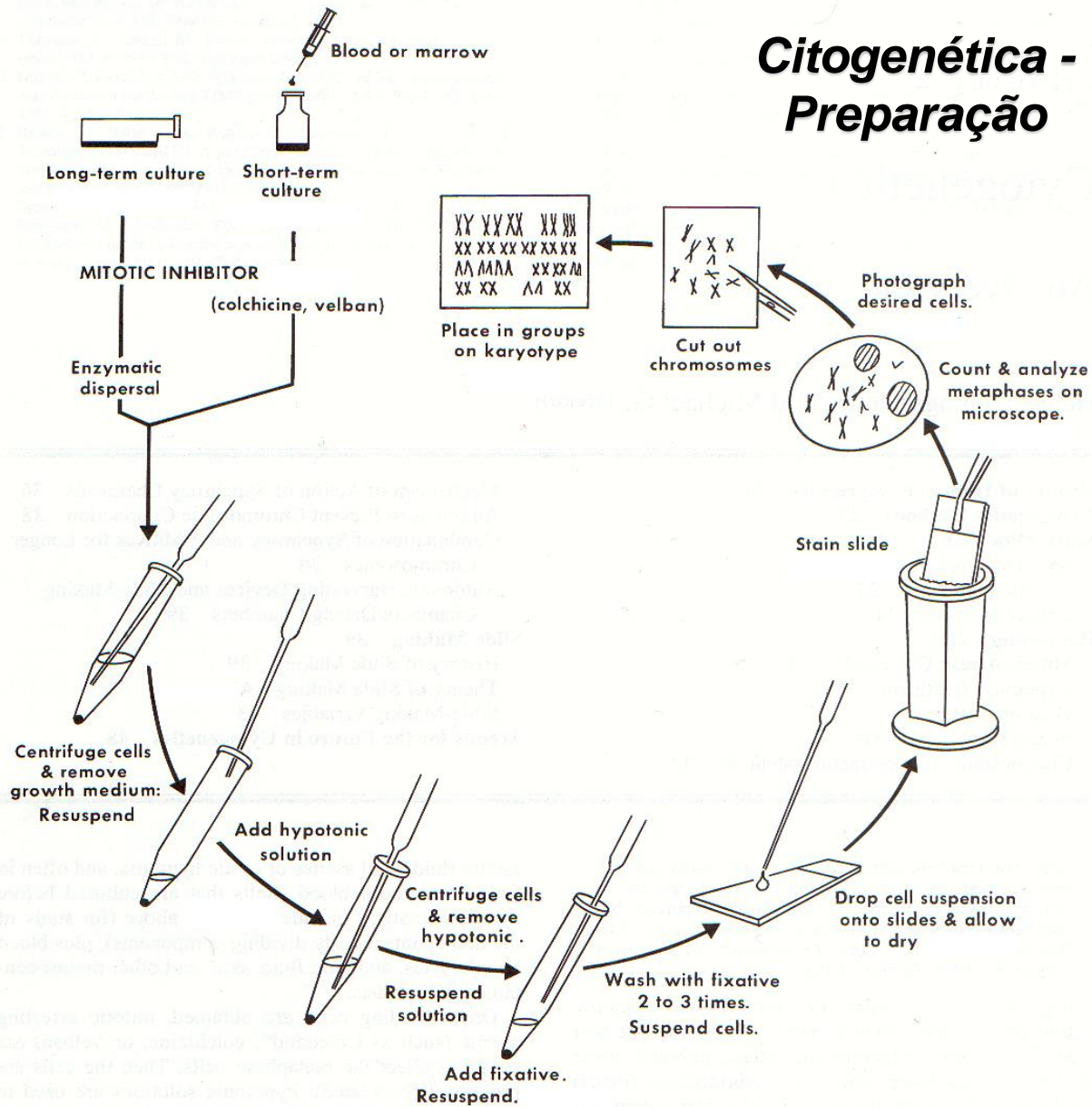
Diagnóstico de Cromossomopatias

Análise Citogenética



Cariótipo de Sangue Periférico

Citogenética - Preparação





Citogenética Clássica

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

Técnicas de Citogenética clássica

Metáfase corada por Giemsa



Bandamento GTG



Bandamento CBG



Bandamento NOR



Técnicas de Bandamento Cromossômico

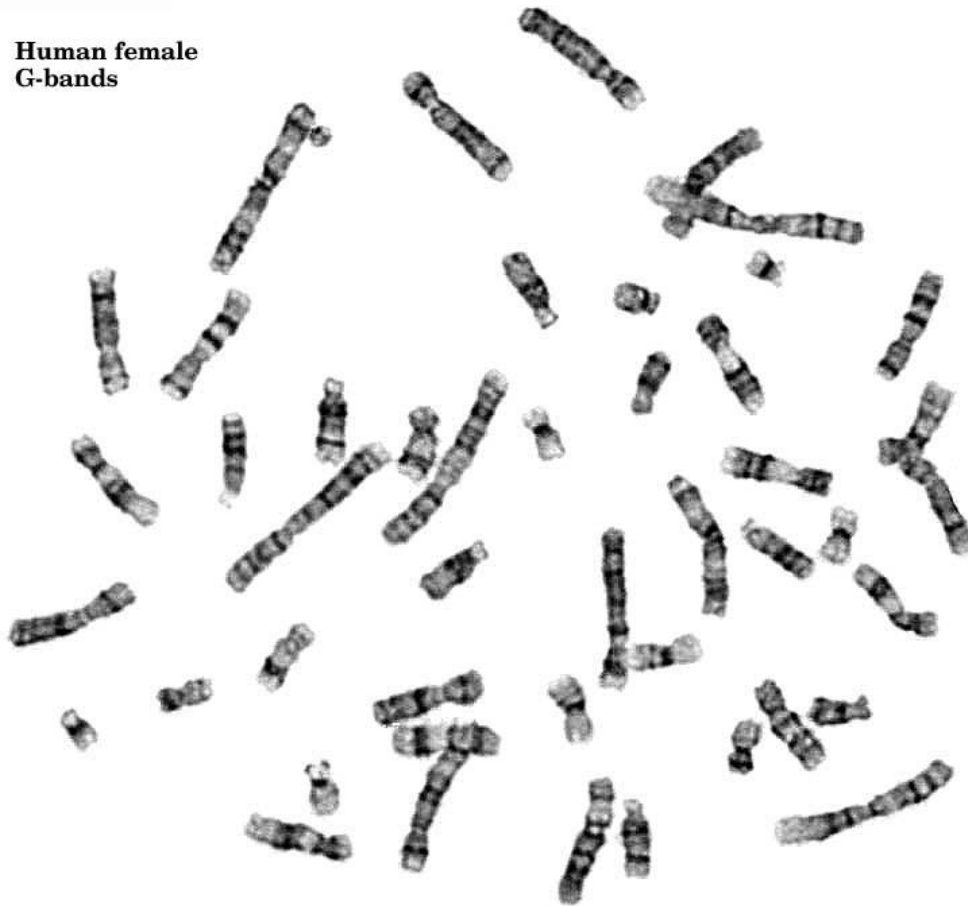
- **GTG** → Alterações Numéricas e Estruturais
- **CBG** → Centrômeros e Heterocromatina (1q;9q;16q;Y)
- **NOR** → Cromossomos acrocêntricos
13, 14, 15, 21,22

Padrão de Bandas de Alta Resolução : Pró metáfase.

De 550 a 850 bandas

Bandas G

**Human female
G-bands**



Ideograma

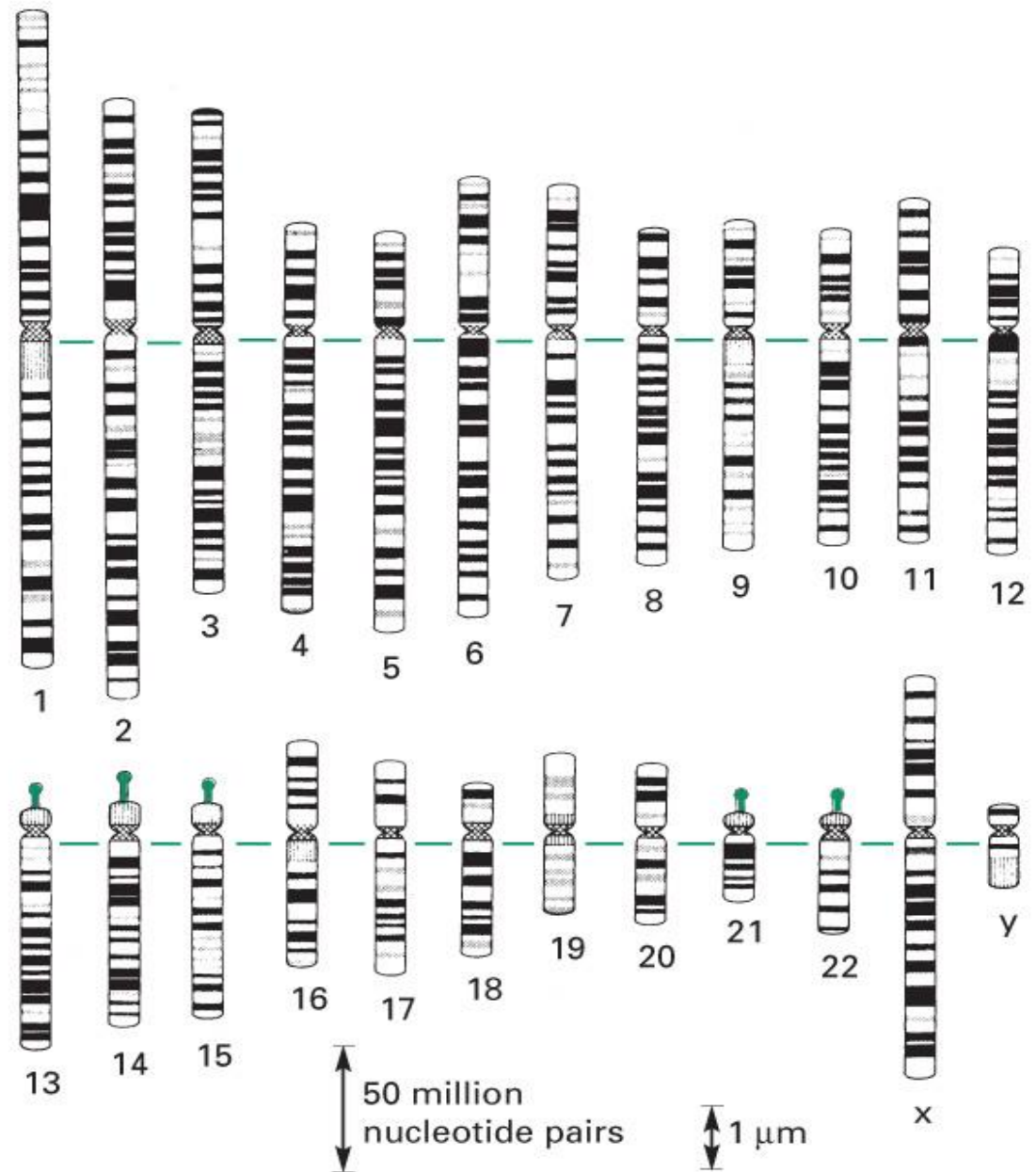
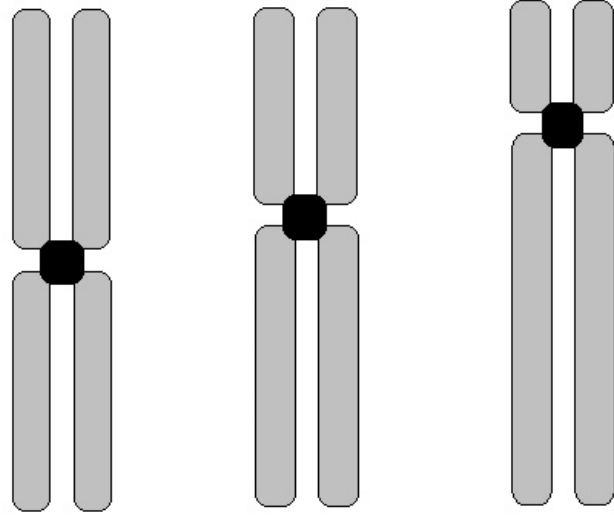


Figure 4-

lar Biology of the Cell, 4th Edition.

Cariótipo: Montando e Classificando os Cromossomos

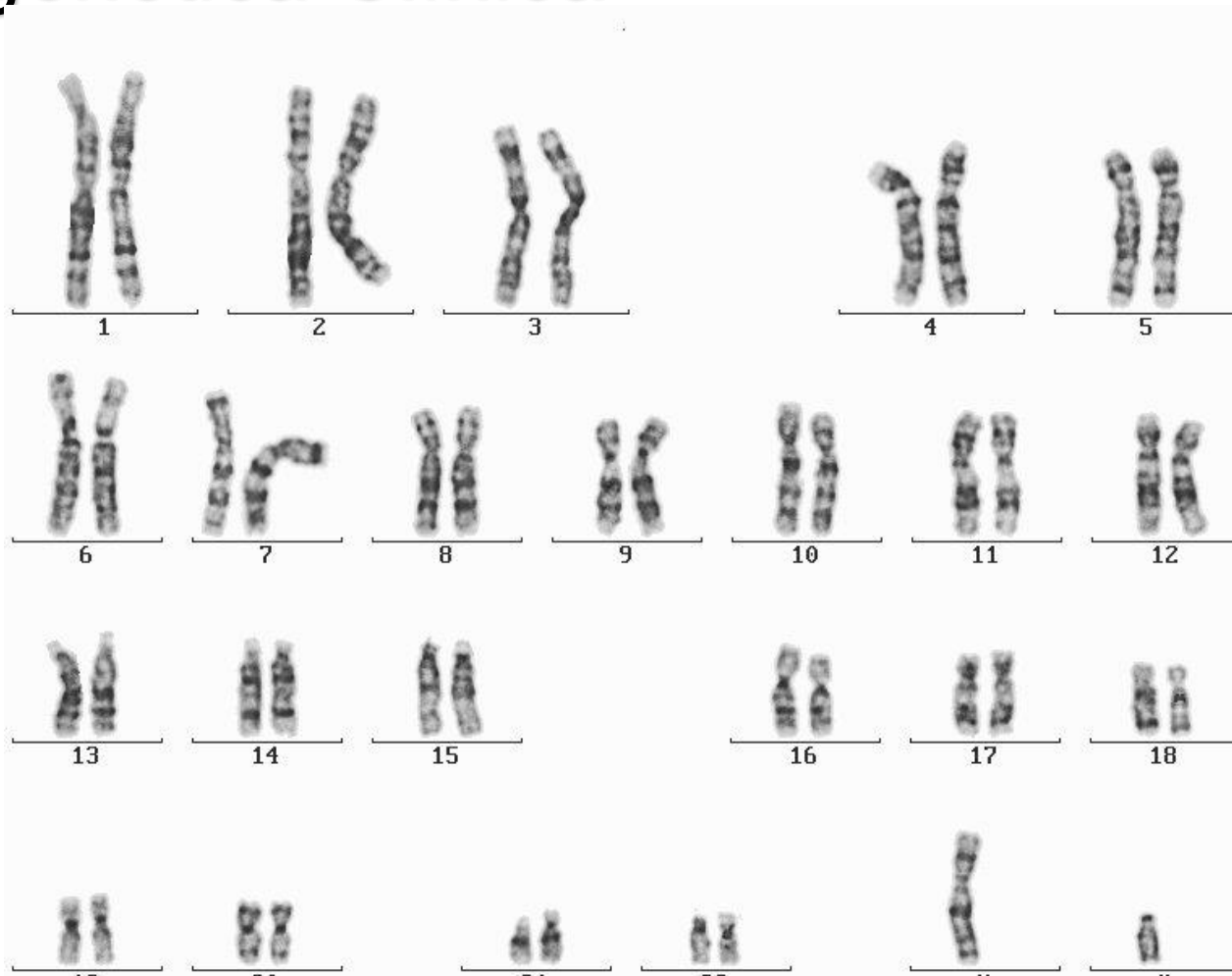


METACENTRIC

SUBMETACENTRIC

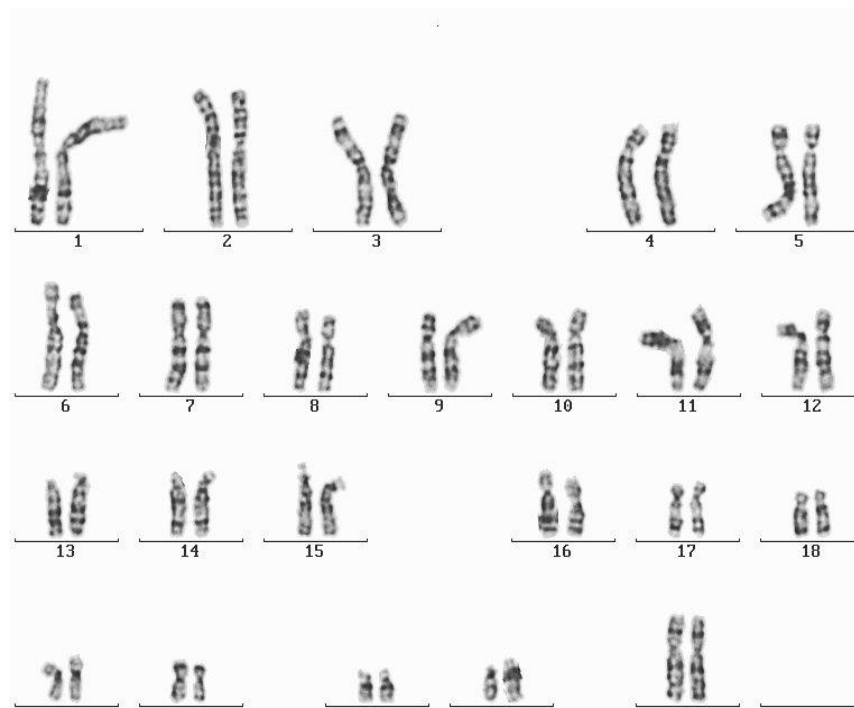
ACROCENTRIC

Citogenética Clínica



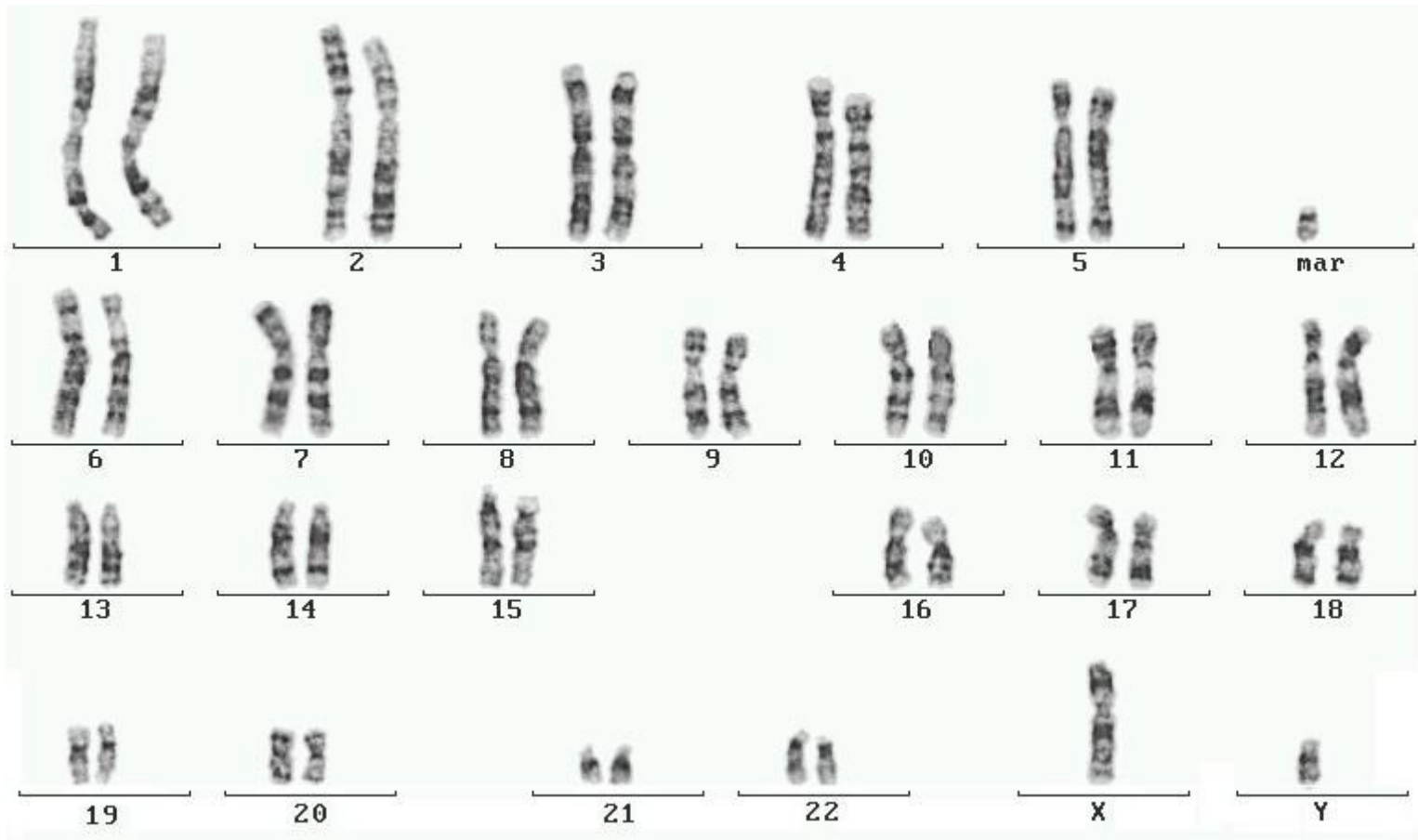
Bandamento GTG: Cariótipo de homem normal 46, XY.
Banco de dados do Departamento de Genética da FMRP - USP

Citogenética Clínica

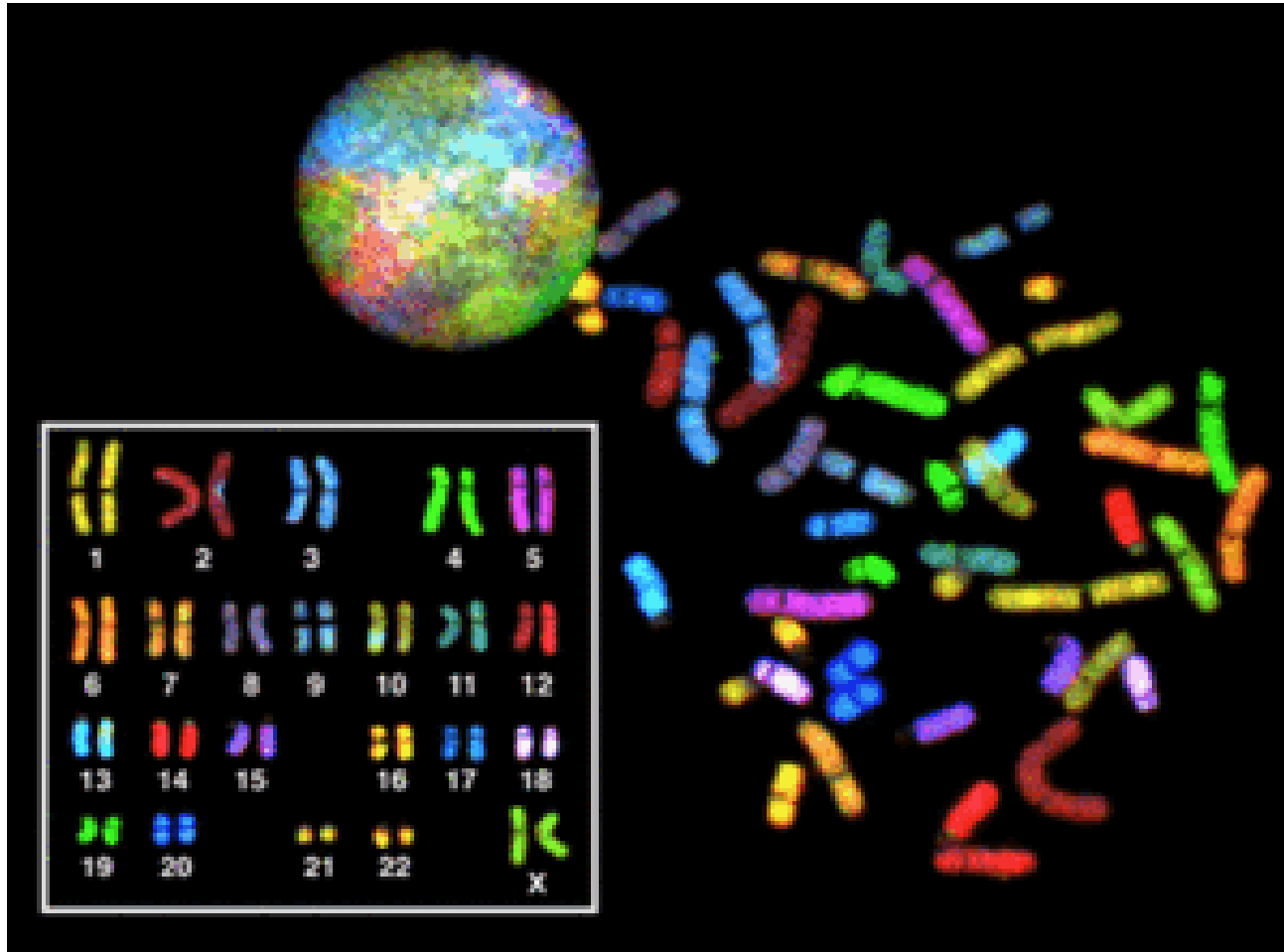


Bandamento GTG: Cariótipo de mulher normal 46, XX.
Banco de dados do Departamento de Genética da FMRP - USP

Cariótipo 47,XY,+mar



Citogenética Molecular

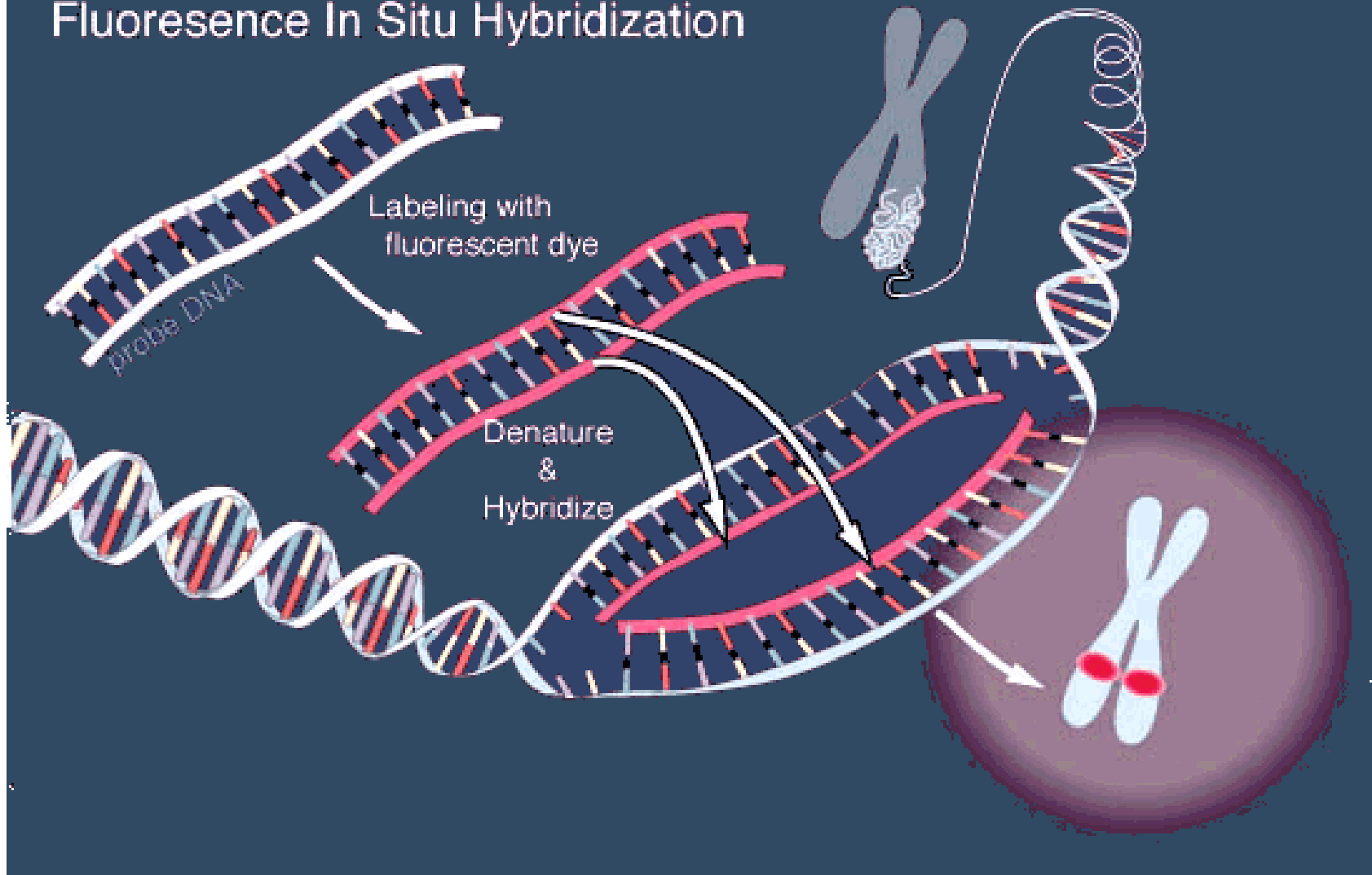


Citogenética Molecular

I. FISH

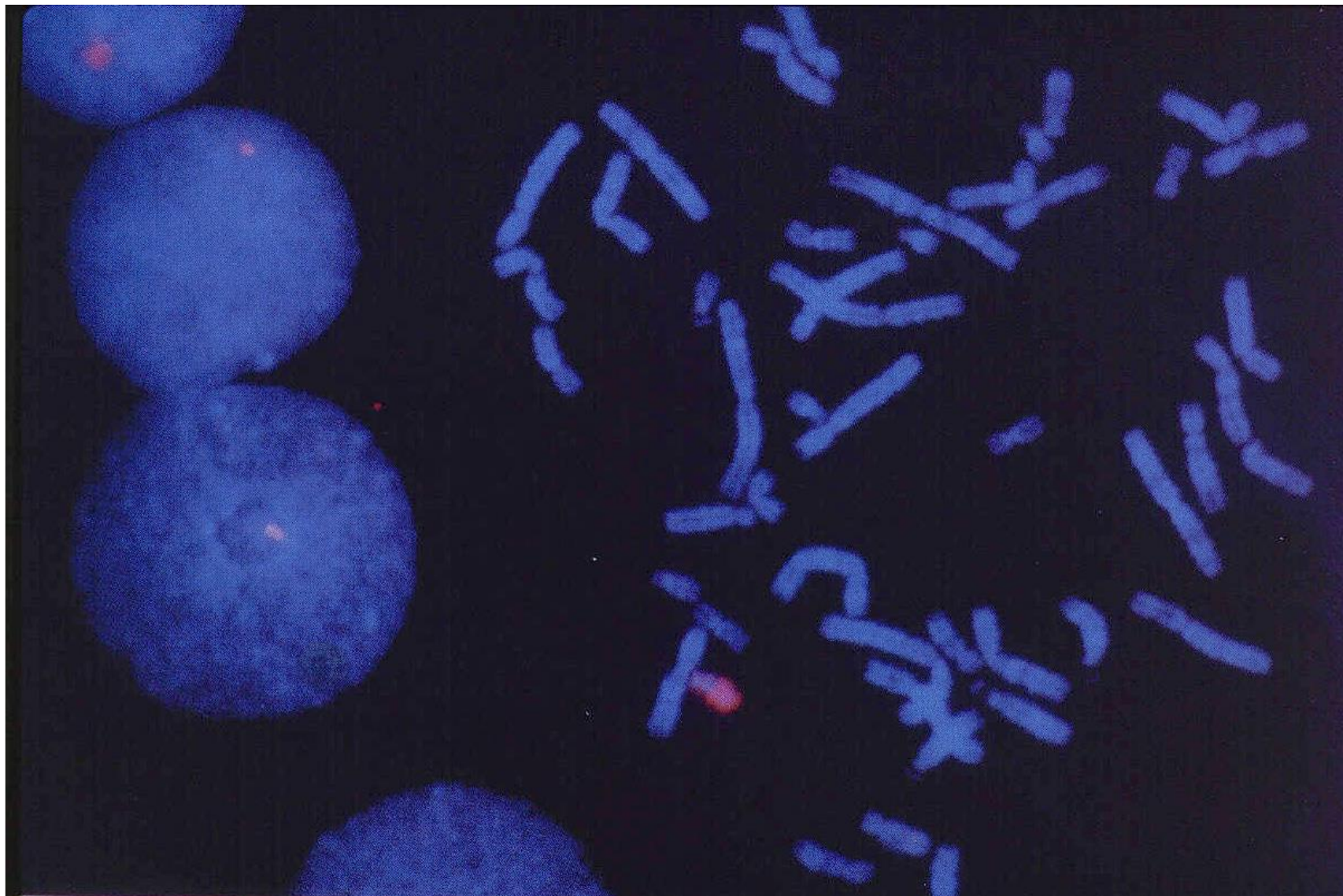
- **FISH (Fluorescence *in situ* hybridization):**
 - **Determinar/Validar a presença ou ausência de seqüências específicas de DNA ou RNA;**
 - **Confirmar alterações cromossômicas observadas pela citogenética clássica, citogenética molecular e citogenômica ;**
 - **Detectar alterações crípticas e submicroscópicas.**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

Fluorescence In Situ Hybridization



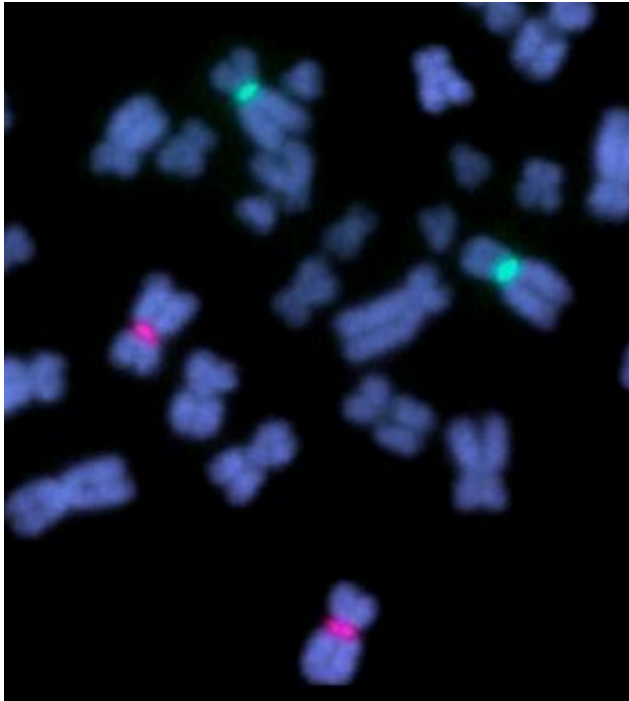
FISH

Sonda Yq marcada com biotina

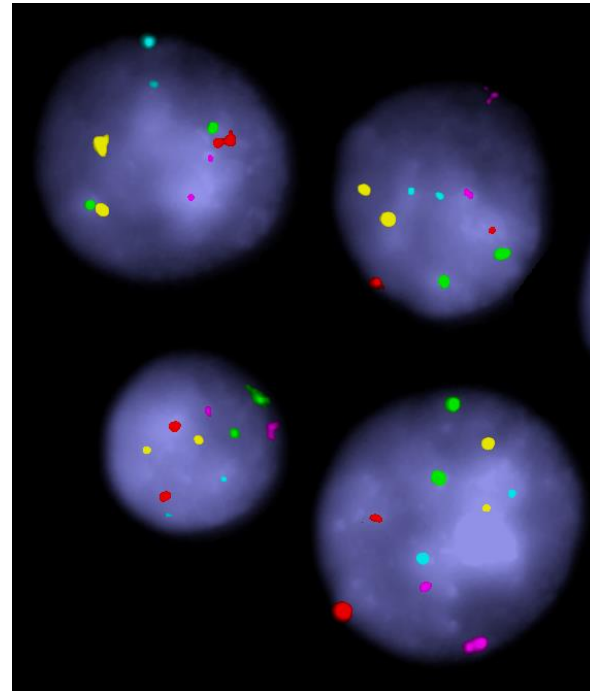


Fluorescence *in situ* hybridization - FISH

Sondas centroméricas

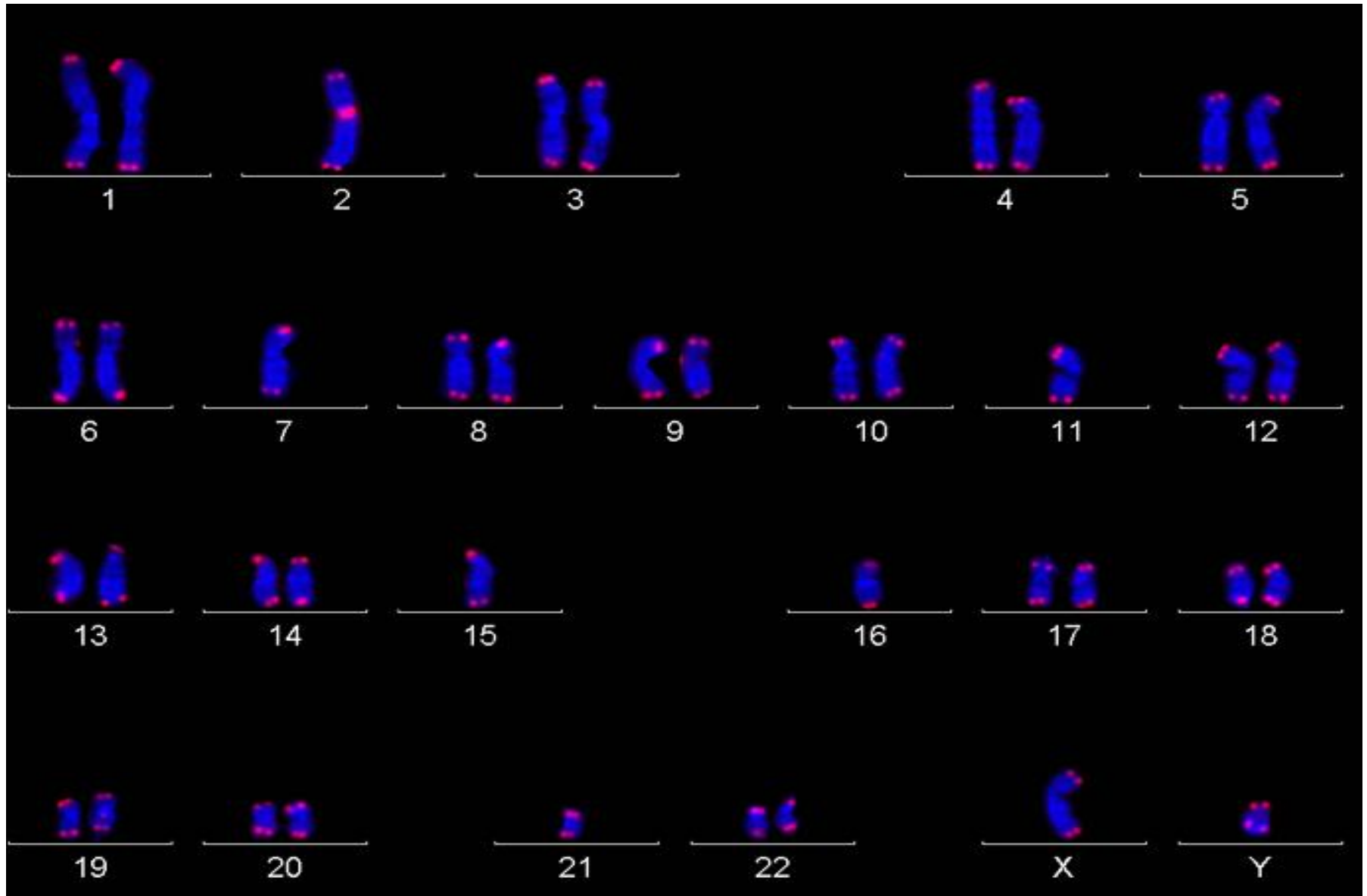


Marcação diferencial dos centrômeros dos cromossomos 6 (verde) e 7 (vermelho)



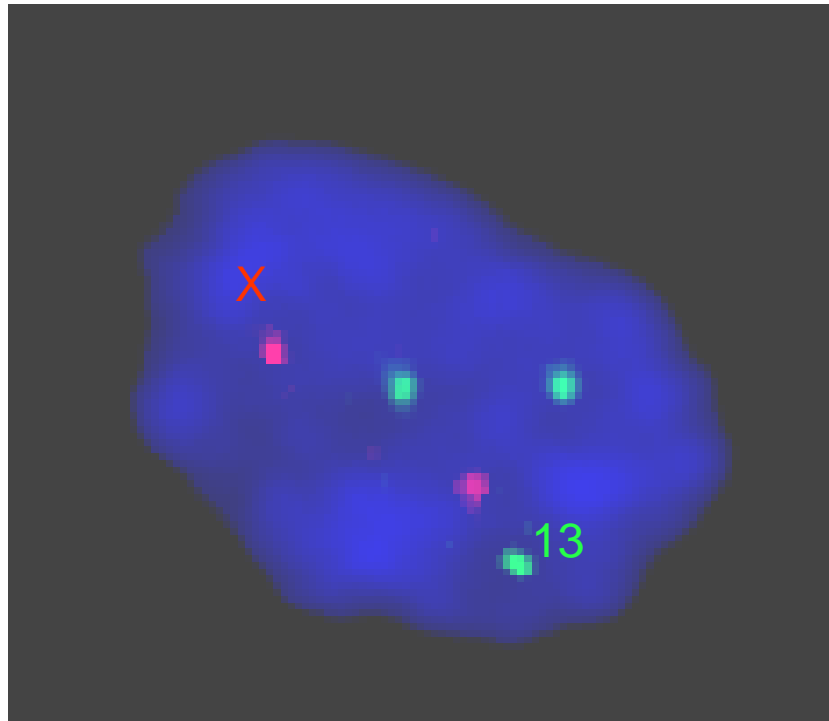
5 diferentes sondas centroméricas específicas hibridadas em núcleo interfásico.

Sondas teloméricas



Fluorescence in situ hybridization – FISH

Citogenética Interfásica

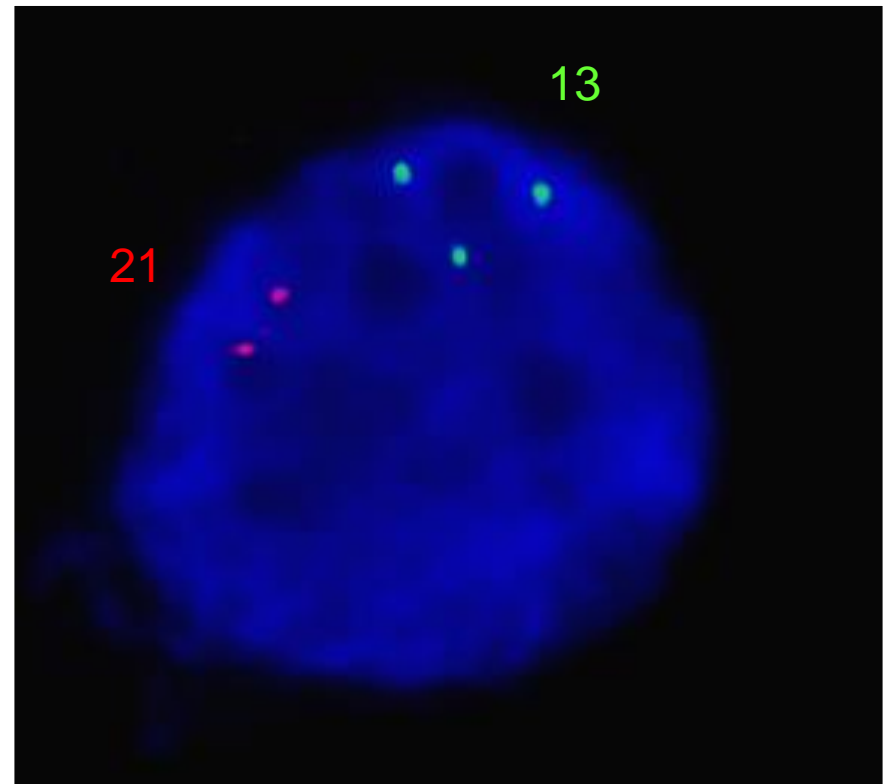
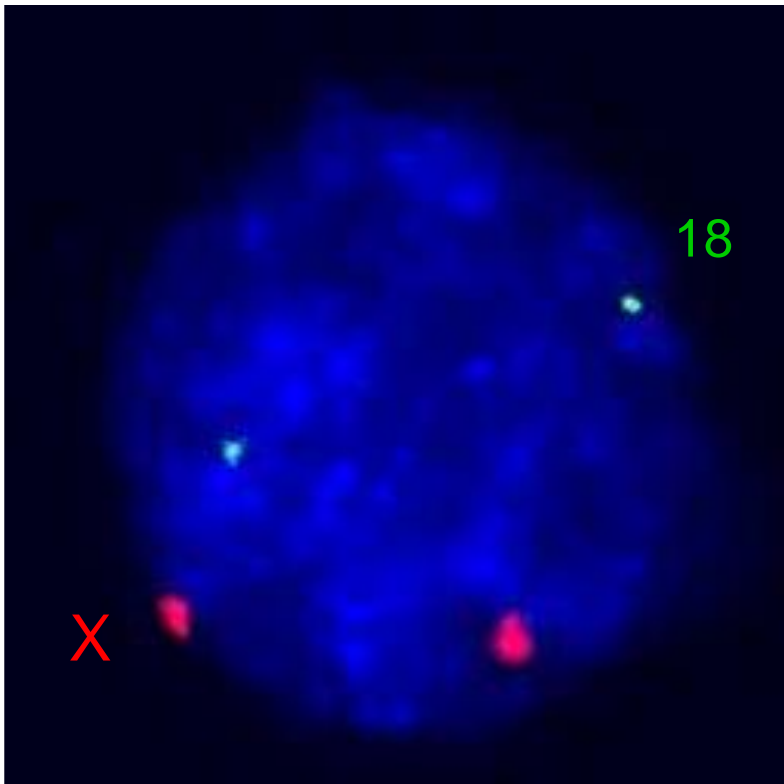


Síndrome de Edwards

Trissomia 13

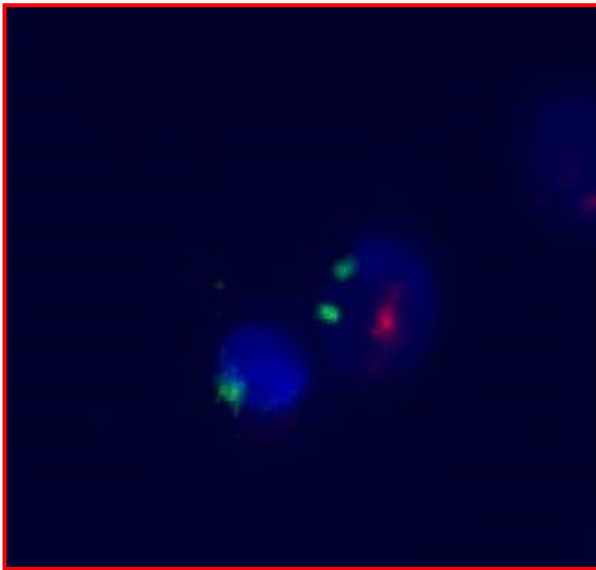
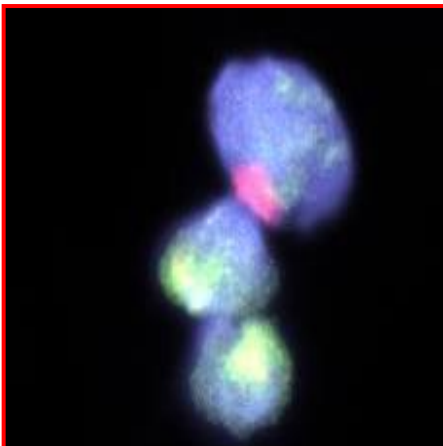
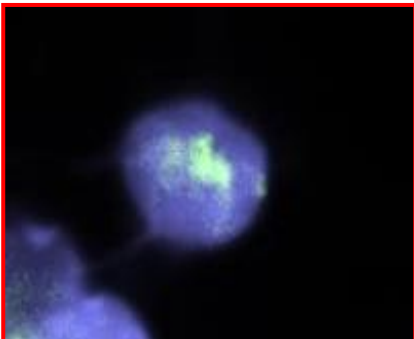
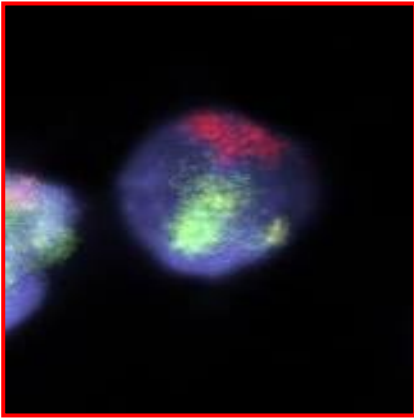
Feto do sexo feminino

FISH em Blastômero para Diagnóstico Pré Implantacional



FISH com sondas dos cromossomos 13 e 14

WCP

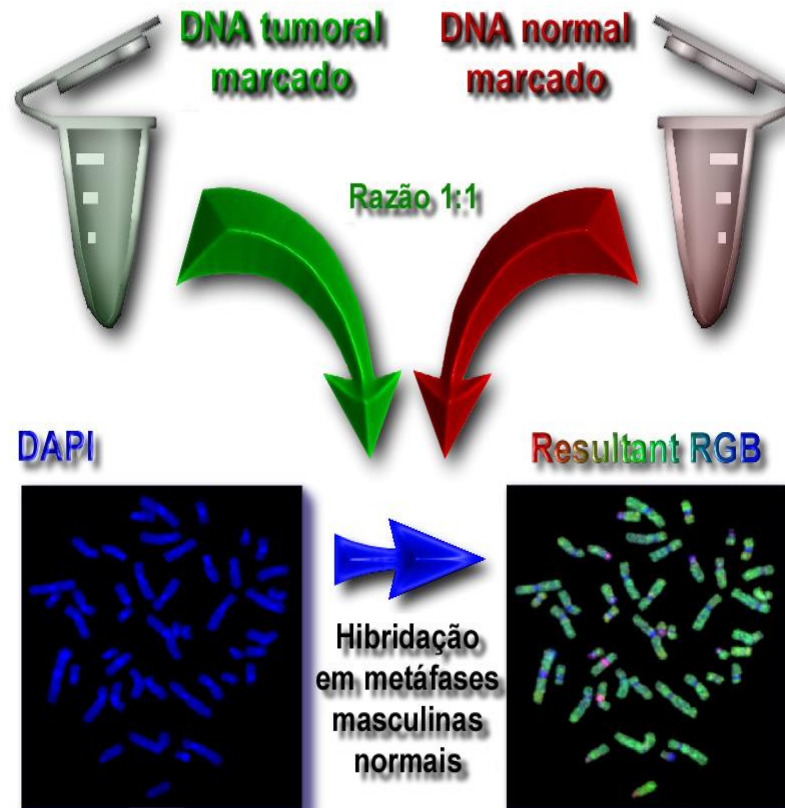


LSI

Citogenética Molecular

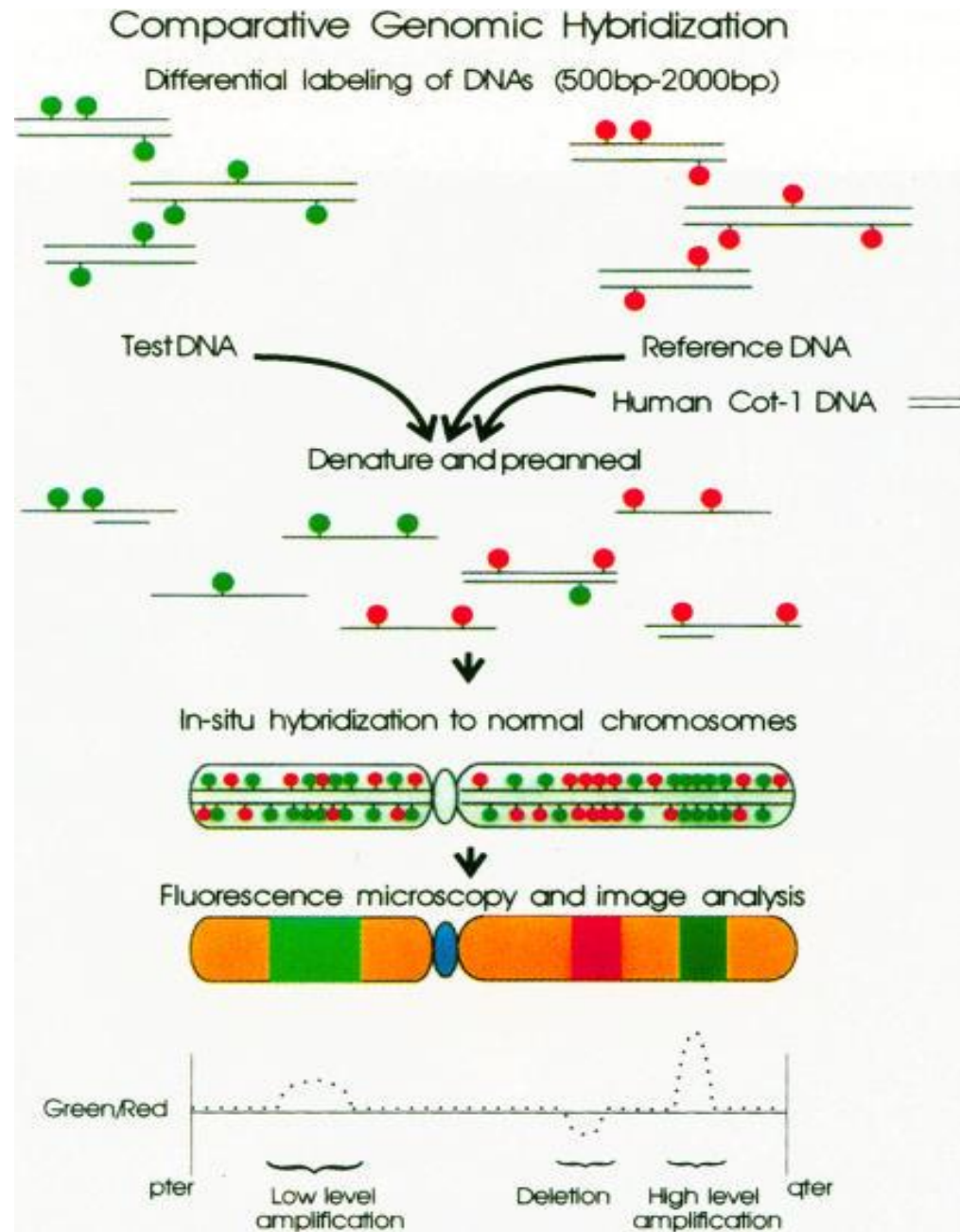
II. CGH (Comparative Genomic Hybridization)

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

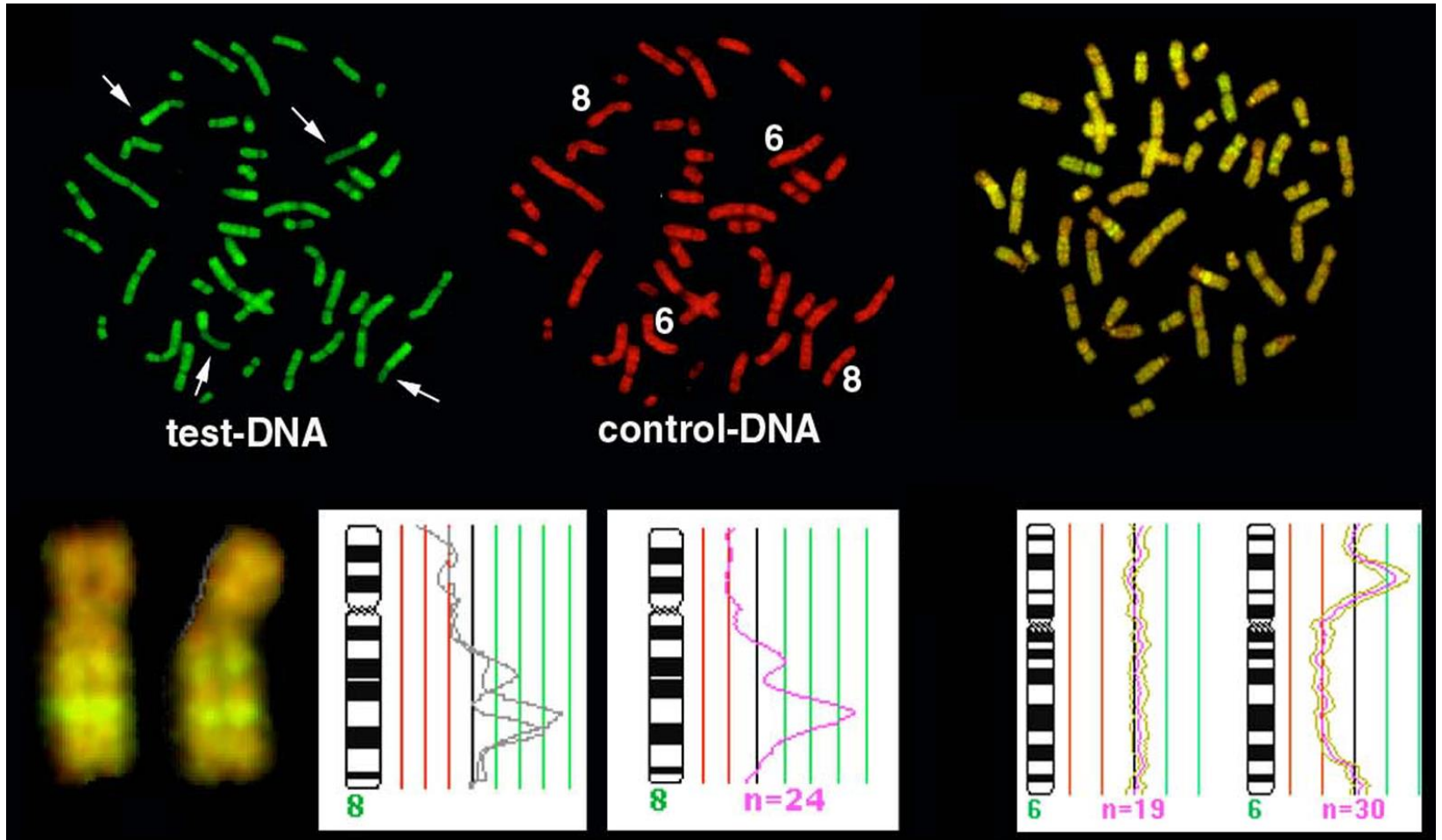


CGH

Metafásica



CGH Metafásica (Comparative Genomic Hybridization)



Aplicações da técnica de CGH

- **Determinação de regiões de perda e/ou ganho de material genético**
 - **Tecido fresco;**
 - **Tecido arquivado em parafina.**
- **Identificação de pequenos marcadores;**

CITOGENÉTICA MÉDICA

CITOGENÉTICA MÉDICA

- 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.

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)

Protocolos

Citogenética Clínica

1. Exclusão de Mosaicismo

Sangue periférico: análise de 100 metáfases, nível de 3% (cl=95%).

ID: S.Turner, S. Klinefelter; genitália ambígua, infertilidade(??)

2. Cromossomo Marcador/Anel:

GTG; 100 células; cariótipo parental; CBG; Ag-NOR; SKY; FISH.

3. Heteromorfismos Cromossômicos:

Cariótipo dos pais; CBG; AR (inv); FISH (CEP).

4. X-Frágil

DM ligada ao X: cariótipo 46,Y,fra(X)(q27.3)

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

arrays-CGH de 1 kb a 1 Mb.

Cromossomopatias

**Doenças Humanas Causadas
por Alterações
Cromossômicas**

Importância/Relevância

| Cariótipo anormal | Abortos de 1º Trimestre | Fetos de mães > 35 anos | Nativos |
|----------------------------------|------------------------------------|---|----------------|
| Incidência total | 1/2 | 1/50 | 1/160 |
| Percentagem das anormalidades | | | |
| Numéricas | 96% | 85% | 60% |
| Estruturais Balanceadas | - | 10% | 30% |
| Estruturais não balanceadas | 4% | 5% | 10% |

Classificação

□ Anomalias Numéricas

- **Euploidias**
 - **Triploidias**
 - **Tetraploidias**
- **Aneuploidias**
 - **Tetrassomias**
 - **Trissomias**
 - **Monossomias**

□ Anomalias Estruturais

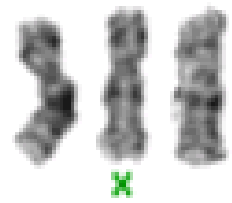
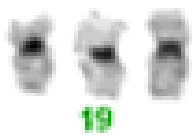
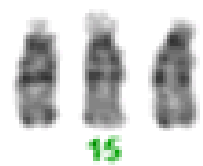
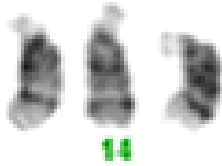
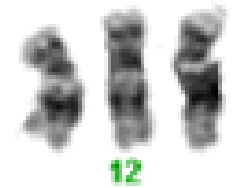
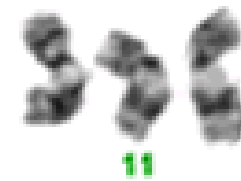
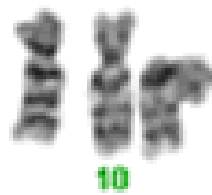
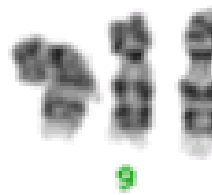
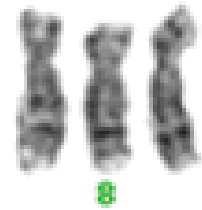
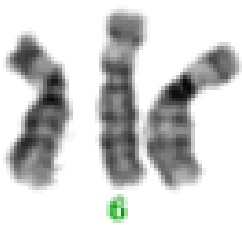
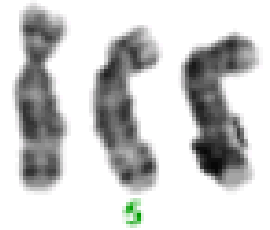
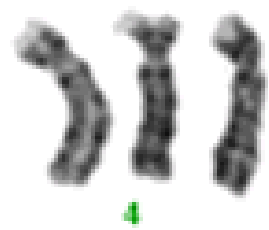
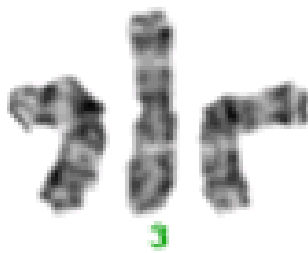
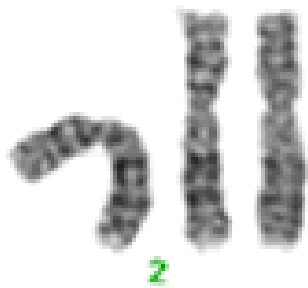
- **Balanceadas**
 - **Inversão**
 - **Paracêntrica**
 - **Pericêntrica**
 - **Translocação**
 - **Recíproca**
 - **Robertsoniana**
 - **Inserção**
- **Não Balanceadas**
 - **Deleção**
 - **Duplicação**
 - **Anéis**
 - **Isocromossomos**
 - **Dicêntricos**

Anomalias Numéricas: Euploidias

Triploidias ($3n$)

Triploidia

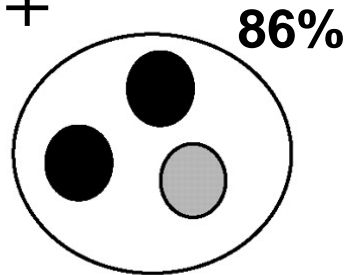
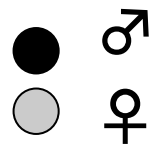
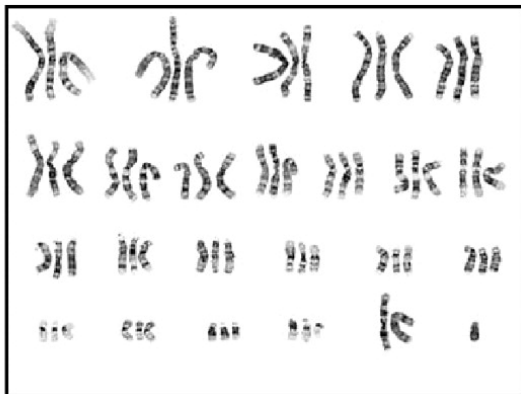




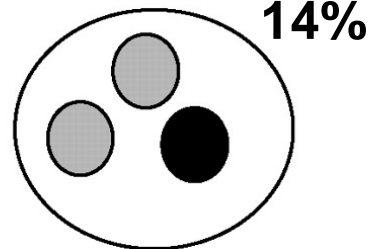
Y

Triploidia 3n

Triploidia (n = 69)



Diandria



Digynia

- Feto: crescimento normal
- Placenta: mola parcial

Perda fetal precoce

- Feto: Retardo de crescimento e macrocefalia relativa
- Placenta: pequena, não cística

Perda fetal tardia

Anomalias Numéricas: Euploidias

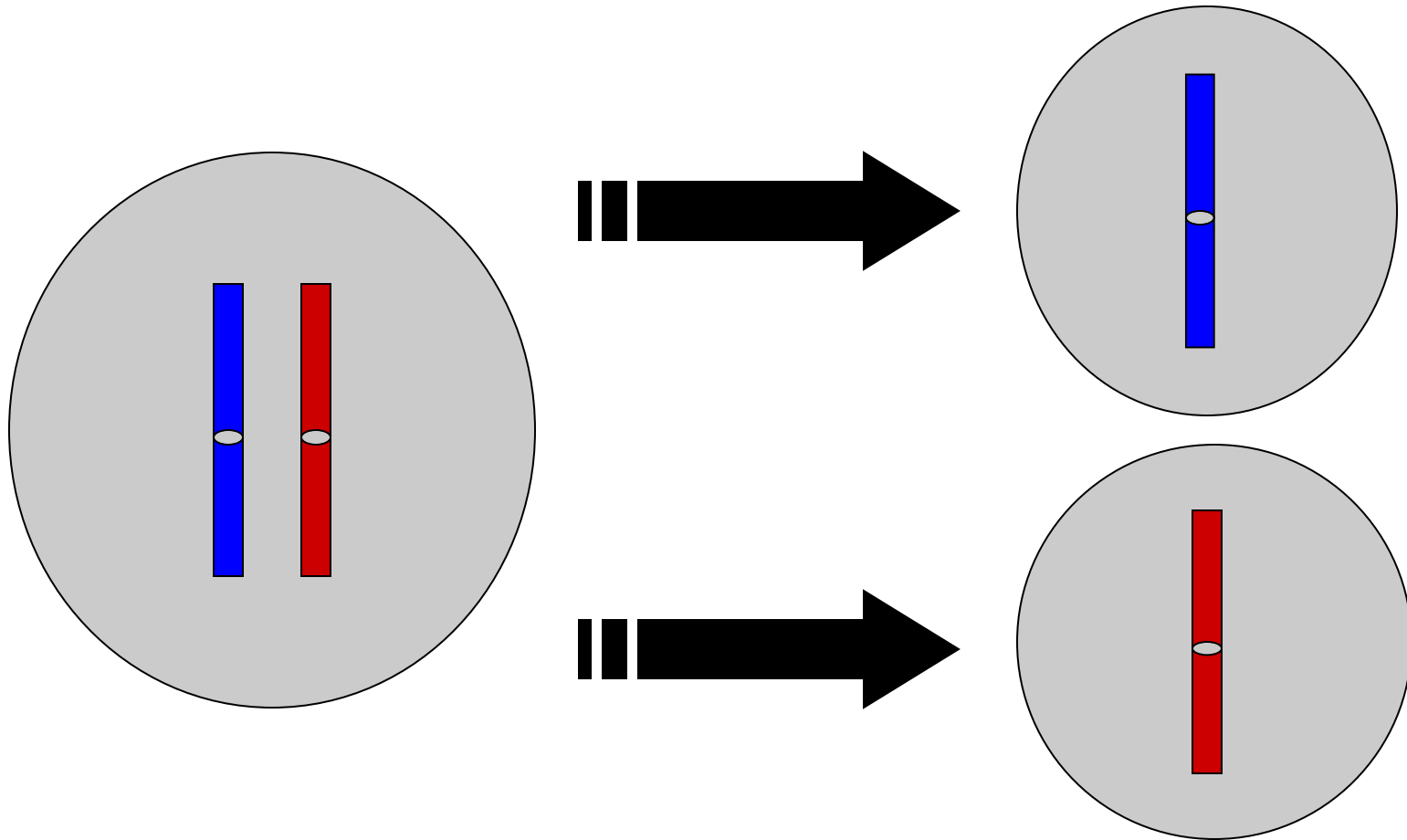
Tetraploidias(4n)

Tetraploidia (4n)

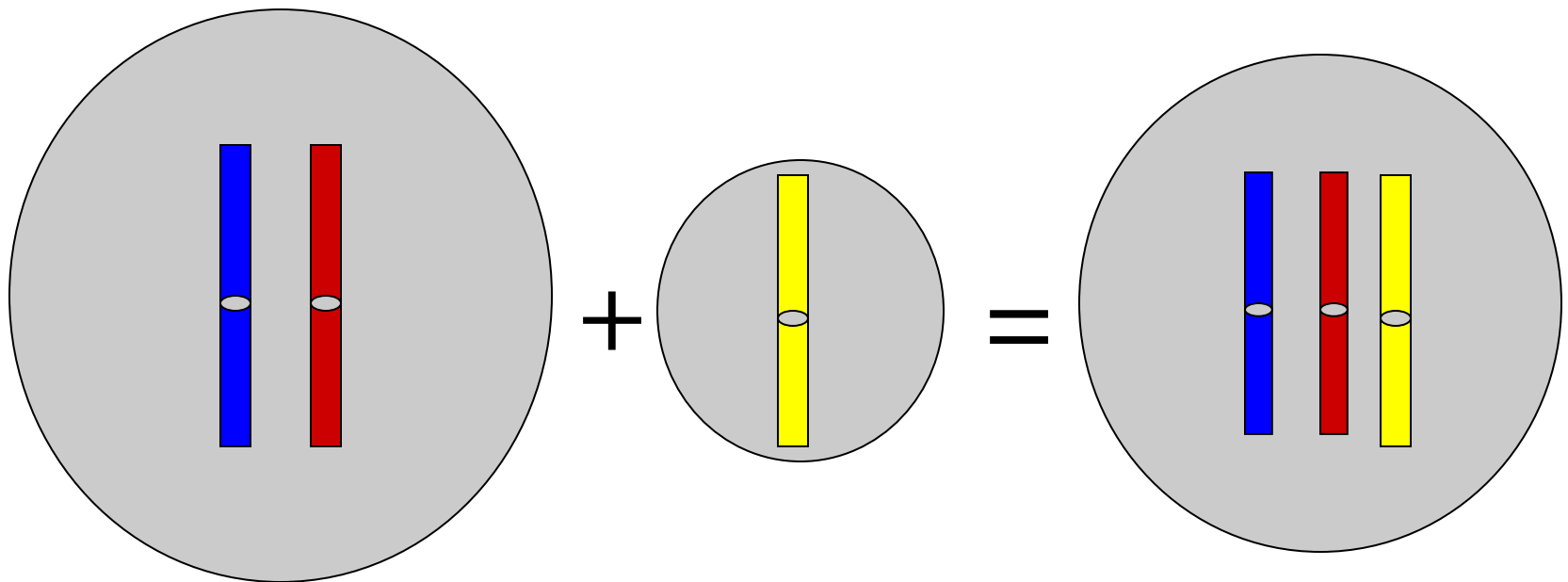
- **Aborto precoce**
- **92,XXXX e 92,XXYY**
 - **Falha de clivagem no zigoto**

Anomalias Numéricas: Aneuploidias

Meiose I - separação dos cromossomos homólogos

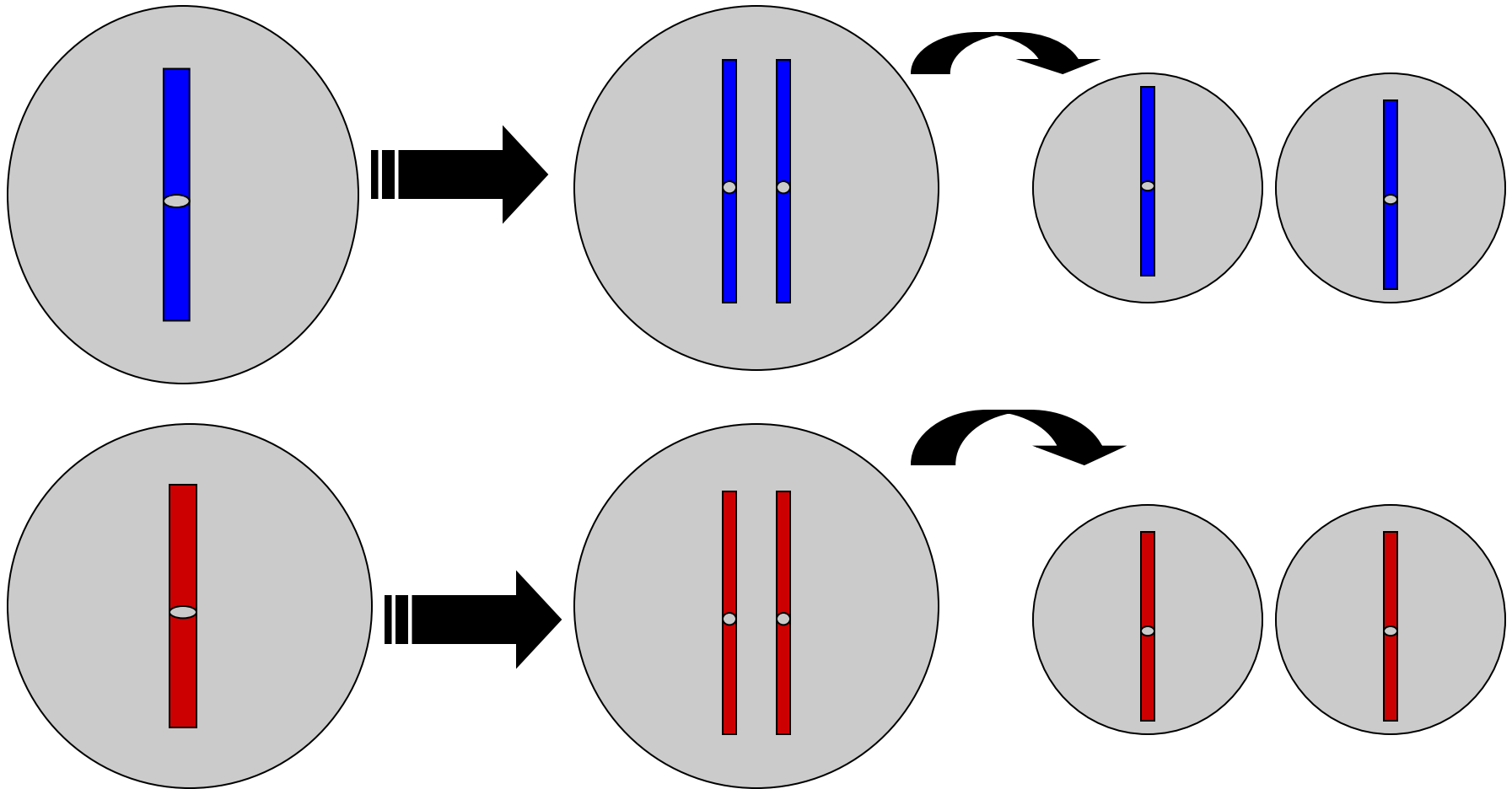


Não disjunção na Meiose I

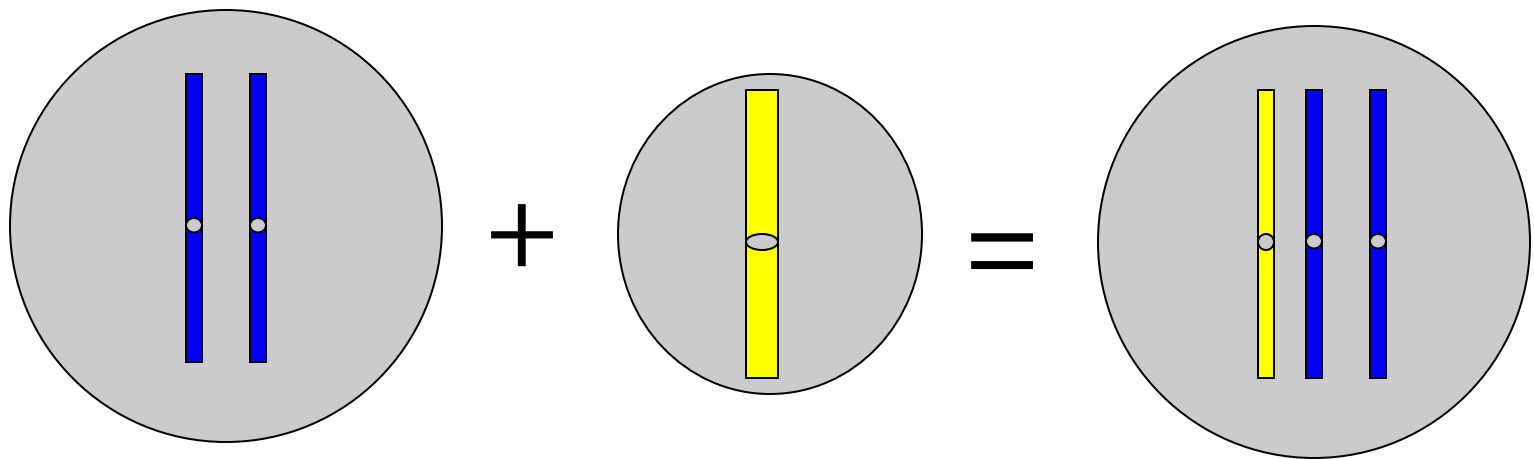


3 cromossomos diferentes = heterodissomia

Meiose II - separação das cromátides irmãs



Não disjunção na Meiose II



**2 cromossomos iguais =
homodissomia**

Trissomias

- **1. Trissomia do 21**
- **2. Trissomia do 18**
- **3. Trissomia do 13**

Trissomia do 21

Síndrome de Down



John Langdon Down (1866):
Primeiro relato médico

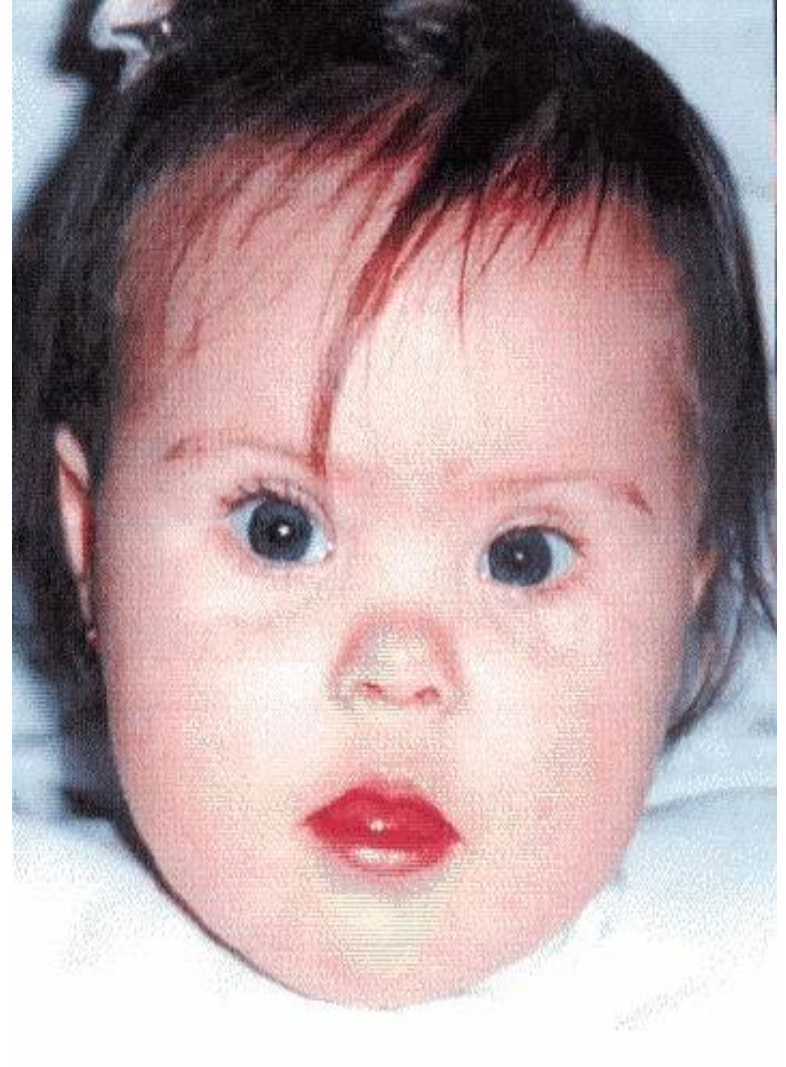


Jerome Lejeune (1959):
Trissomia do cromossomo 21

1. Trissomia do 21 - S. de Down

- Incidência entre 1:1.000 e 1:700 RN
- Aneuploidia cromossômica mais comum em nativos
- 1ª causa de deficiência mental genética
- Só 20% dos conceptos com S. de Down nascem, 80% são abortos espontâneos
- Quadro clínico muito variável, e nem todos os pacientes apresentam todas as características

Trissomia do 21



Caucasóides

Trissomia do 21



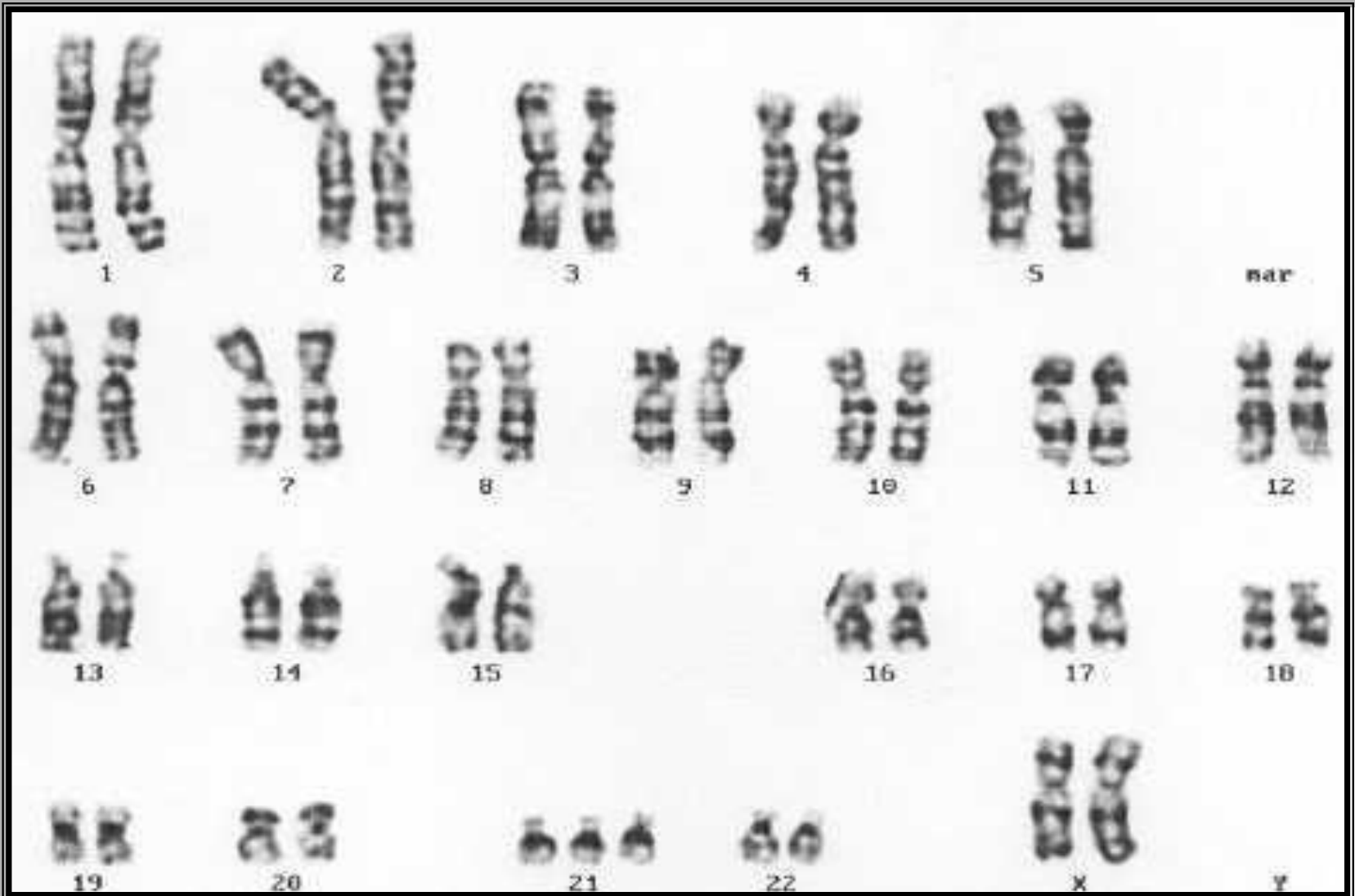
Negróides

Trissomia do 21



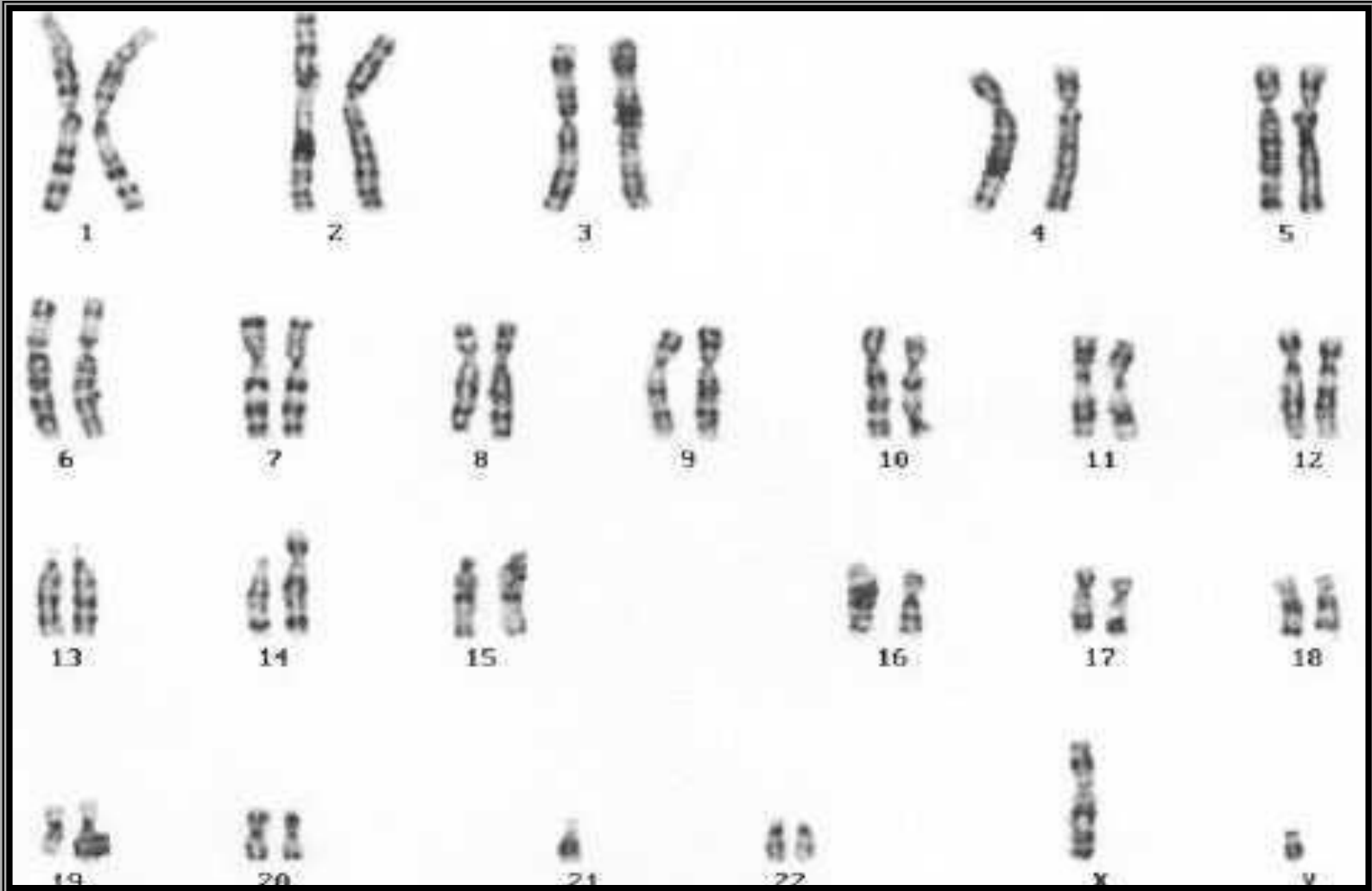
Indígena e Oriental

Trissomia do 21



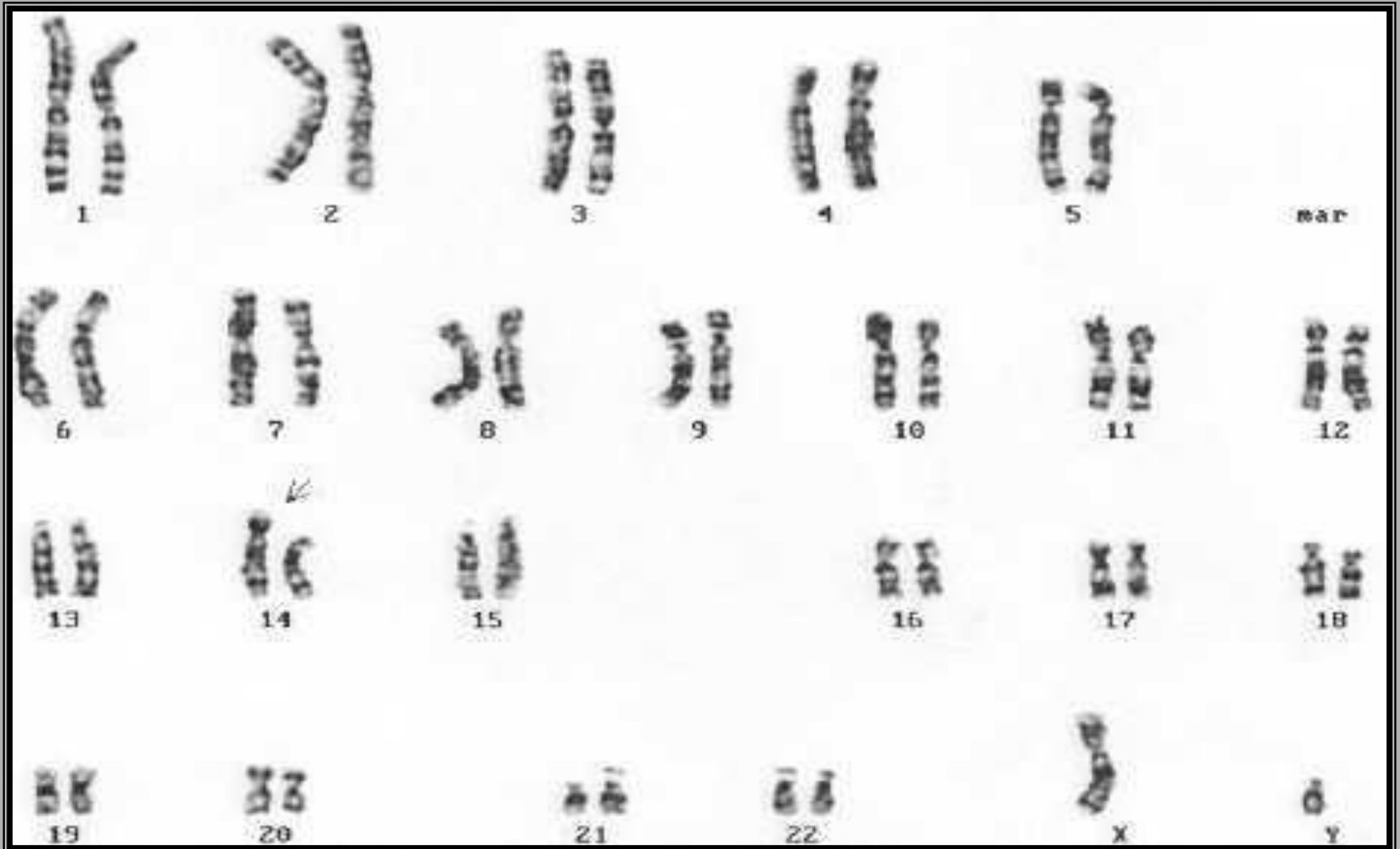
47 XX+ 21

Trissomia do 21



45 XY t (14;21)

Trissomia do 21



46 XY t (14;21) = S. de Down

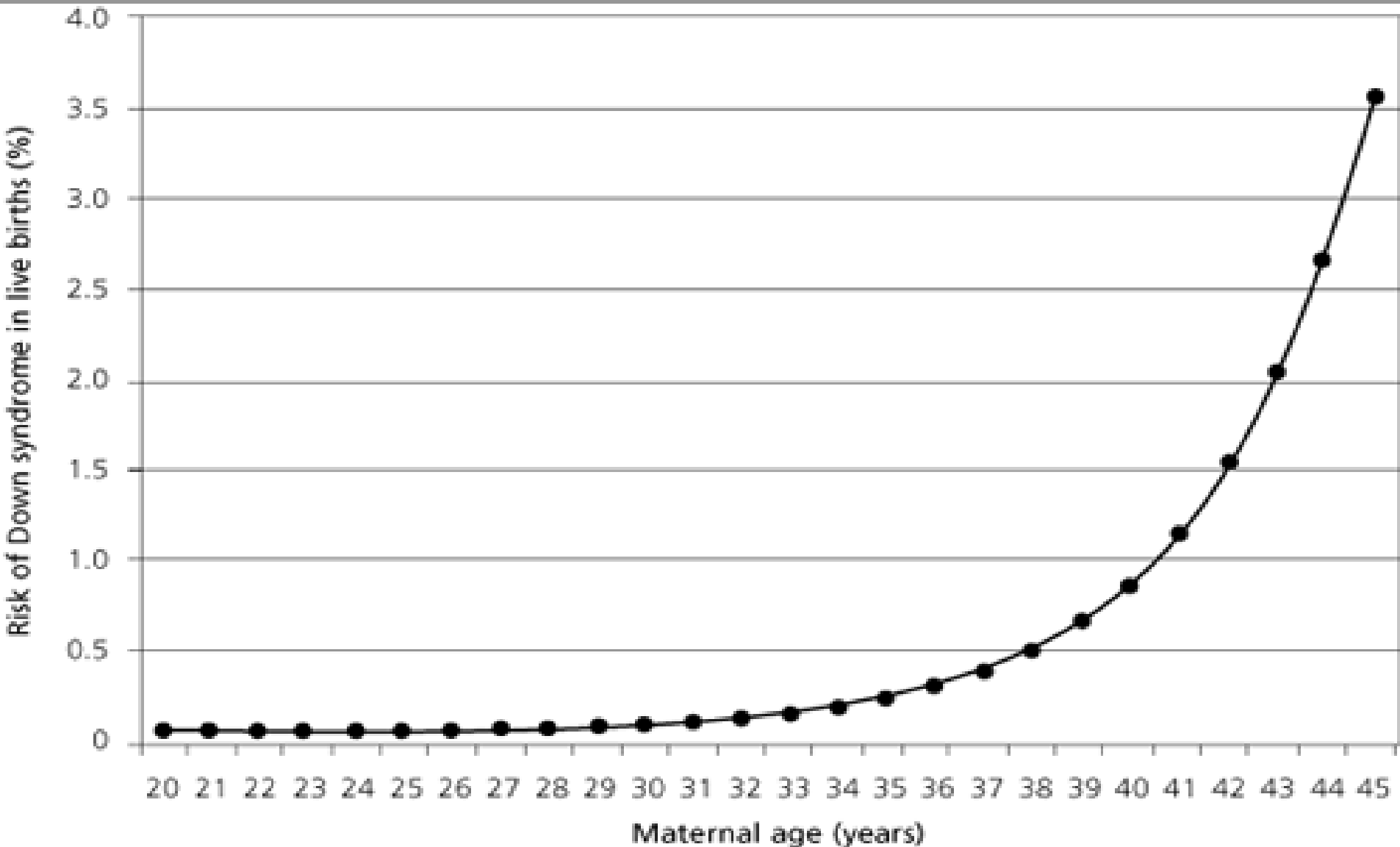
Trissomia do 21 - S. de Down

- 90% dos pacientes têm trissomia livre
- 10% dos pacientes têm translocações
 - 90% das translocações são eventos novos
 - 10% das translocações são herdadas

Translocação

Frente a uma criança portadora de translocação é obrigatório exame citogenético dos pais para aconselhamento genético

Idade Materna e SD



Trissomia do 18

Síndrome de Edwards

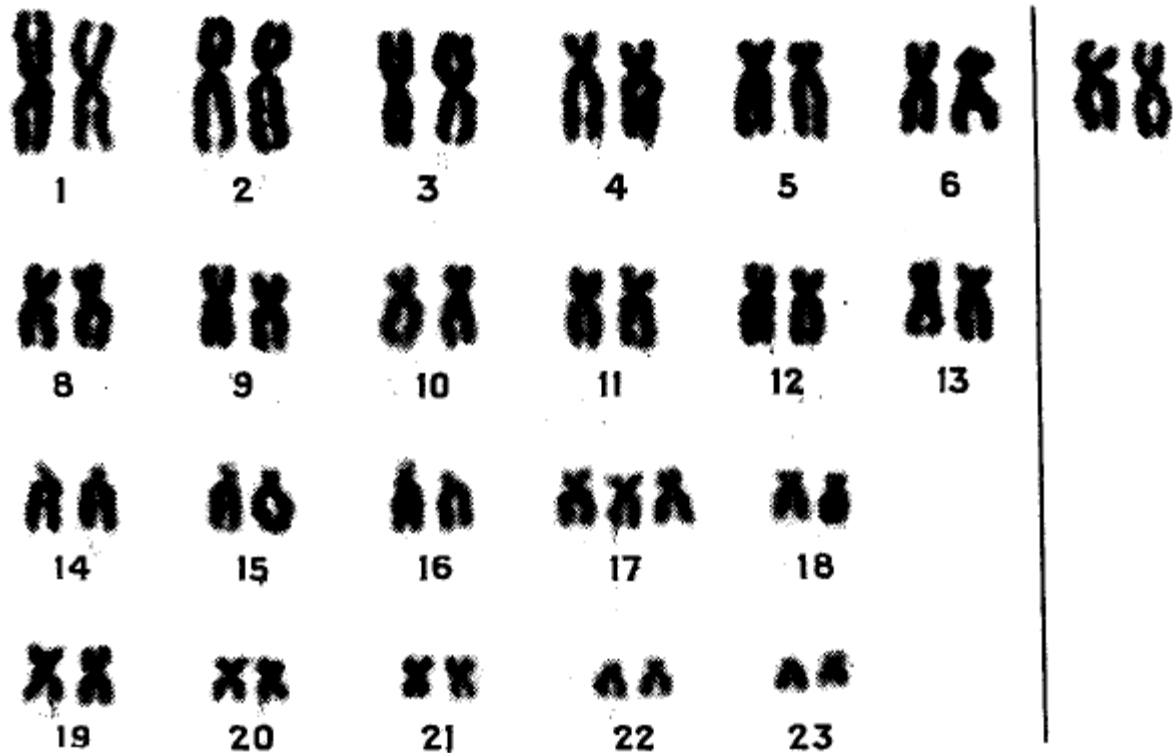


Fig. 5—Chromosomes arranged in pairs.

THE LANCET

Volume 275, Issue 7128,
9 April 1960, Pages 787-
790

Jonh Hilton Edwards
(1960):Relata o fenótipo
associado à trissomia 18

(erronamente descrito
como cromossomo 17!)

Trissomia do 18 - S. de Edwards

- 2ª trissomia autossômica mais comum em humanos
- Incidência de 1:8.000 RN
- 95% são abortados
- Somente 5 a 10% estão vivos no 1o ano de vida
- Quadro clínico: hipertonia, dolicocefalia, retrognatia, sobreposição 2^o, 3^o e 5^o dedos das mãos sobre o 4^o, pés em mata-borrão

Trissomia do 18 - S. de Edwards

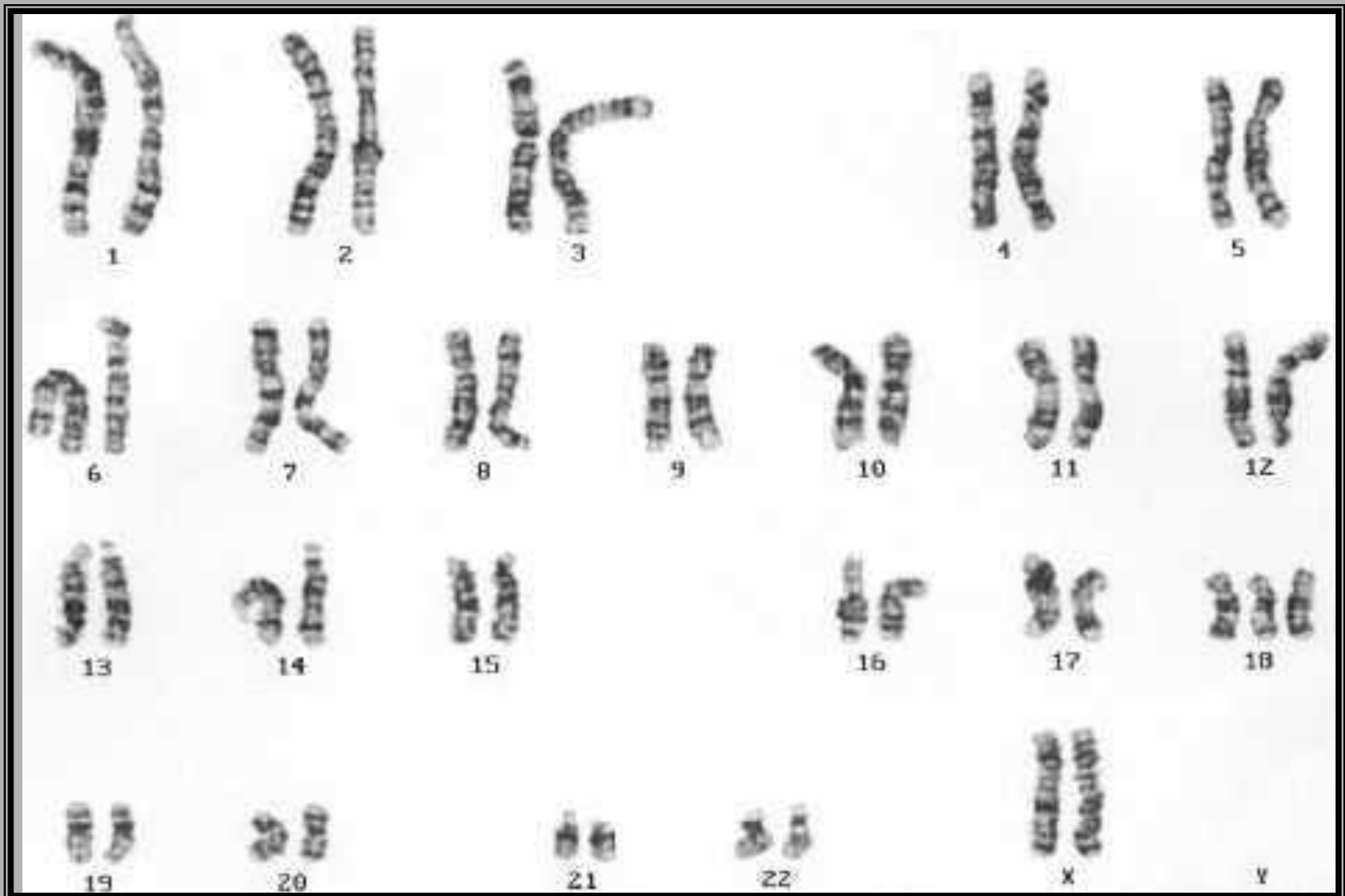


Trissomia do 18 - S. de Edwards



Pé em “mata-borrão”

Trissomia do 18



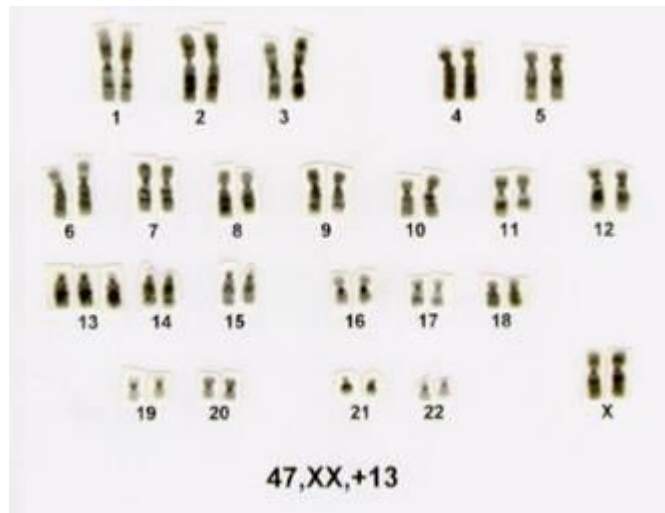
47 XX +18

Trissomia do 13

Síndrome de Patau



Primeira observação em 1657



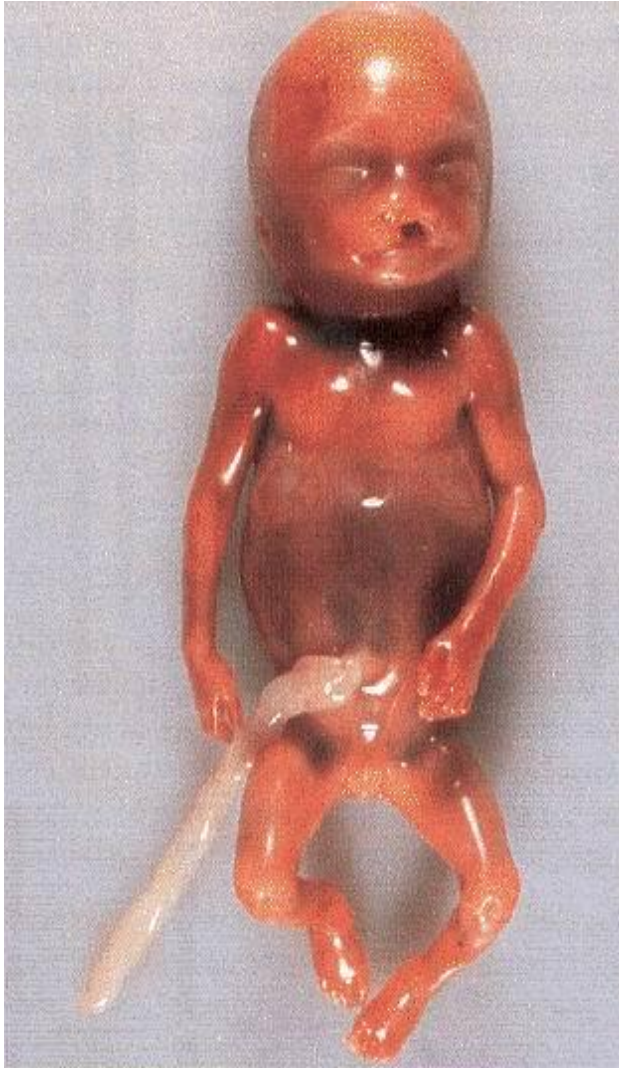
Klaus Patau (1960):
Trissomia do cromossomo
13

Trissomia do 13

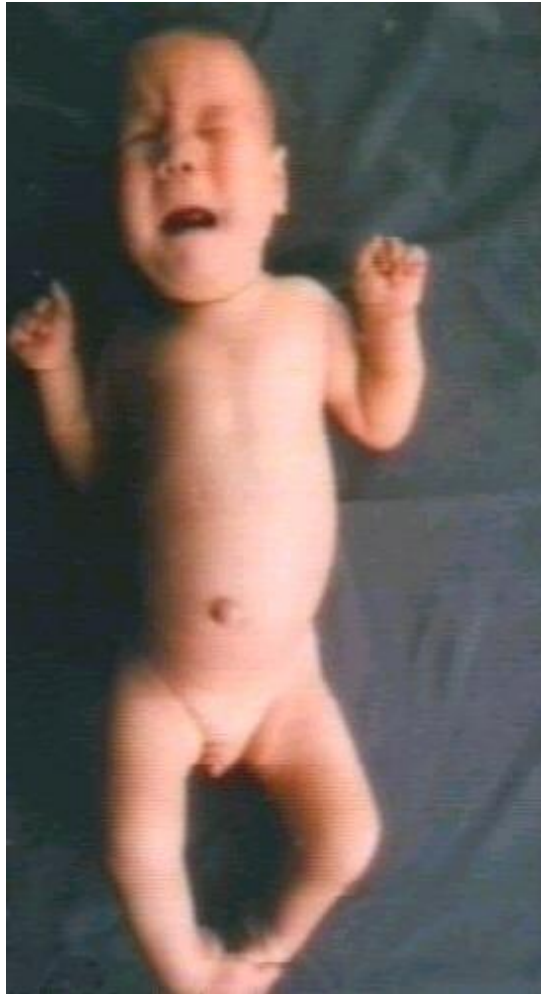
S. de Patau

- 3ª trissomia autossômica mais comum em nativos
- Incidência de 1:12.000 a 1:25.000 RN
- 98% dos conceptos são abortados
- Prognóstico reservado, rara sobrevivida no 1º ano de vida
- Quadro clínico: malformações do SNC (holopresencefalia), malformações oculares, lábio fendido, malformações cardíacas, polidactilia pós axial

Trissomia do 13



Trissomia do 13



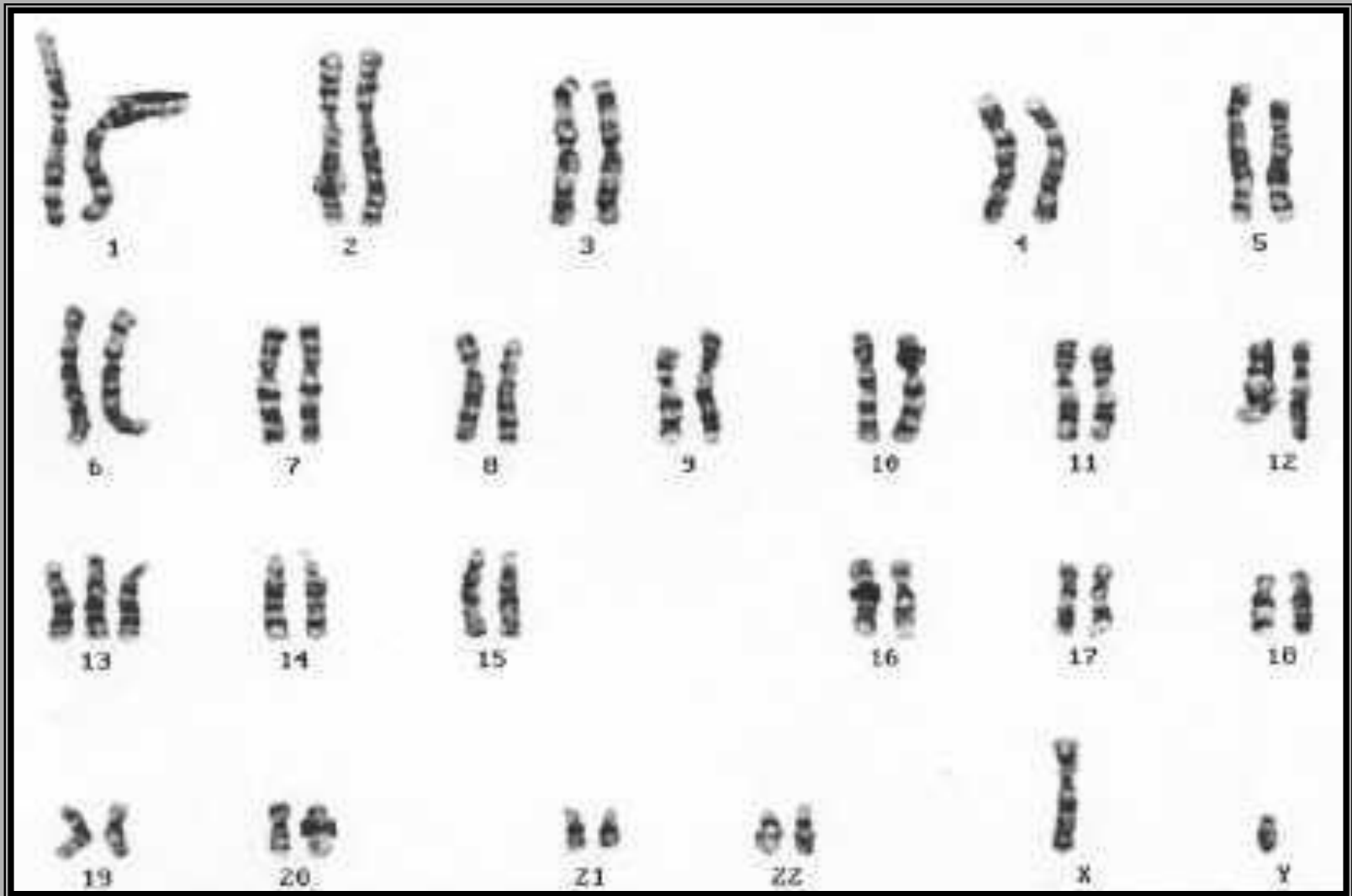
Trissomia do 13



Polidactila pós-axial



Trissomia do 13



47 XY + 13

Anormalidades Estruturais

Anormalidades estruturais

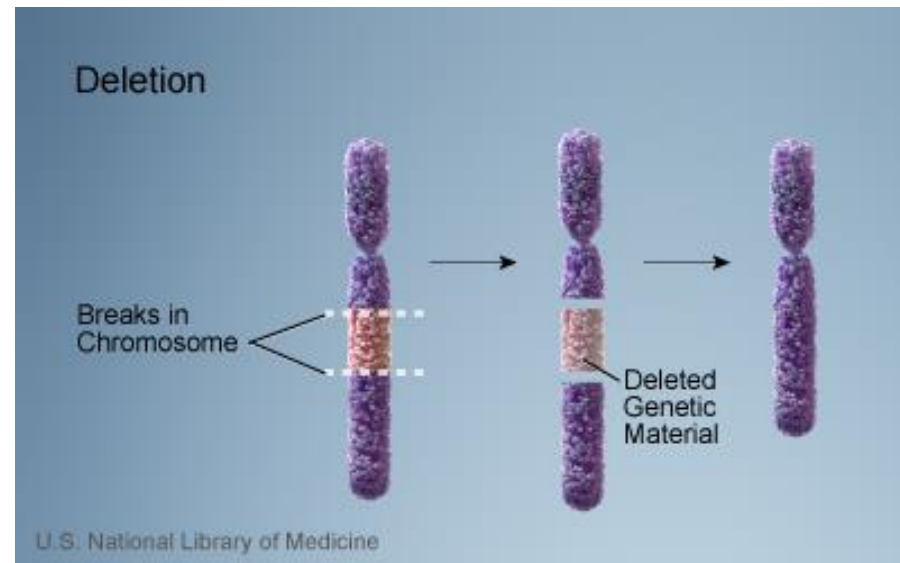
- Quebra cromossômica seguida de reconstituição numa combinação anormal
- Podem ser herdadas ou ocorrerem espontaneamente
- Os **rearranjos não balanceados** levam a quadro clínico variado, quase sempre com deficiência mental
- Os **rearranjos balanceados** ocorrem em 1:500 RN, normalmente são assintomáticas, mas pode haver clínica por causa de microdeleções

Rearranjos não-balanceados

- **1. Deleção**
- **2. Duplicação**
- **3. Cromossomo em anel**
- **4. Isocromossomos**

1. Deleção

- Perda de um segmento cromossômico
- A clínica depende do segmento deletado
- A deleção pode ser terminal - perda de um segmento distal do cromossomo porque houve 1 quebra cromossômica
- A deleção pode ser intersticial - perda de um segmento intermediário de um cromossomo porque houveram 2 quebras cromossômicas

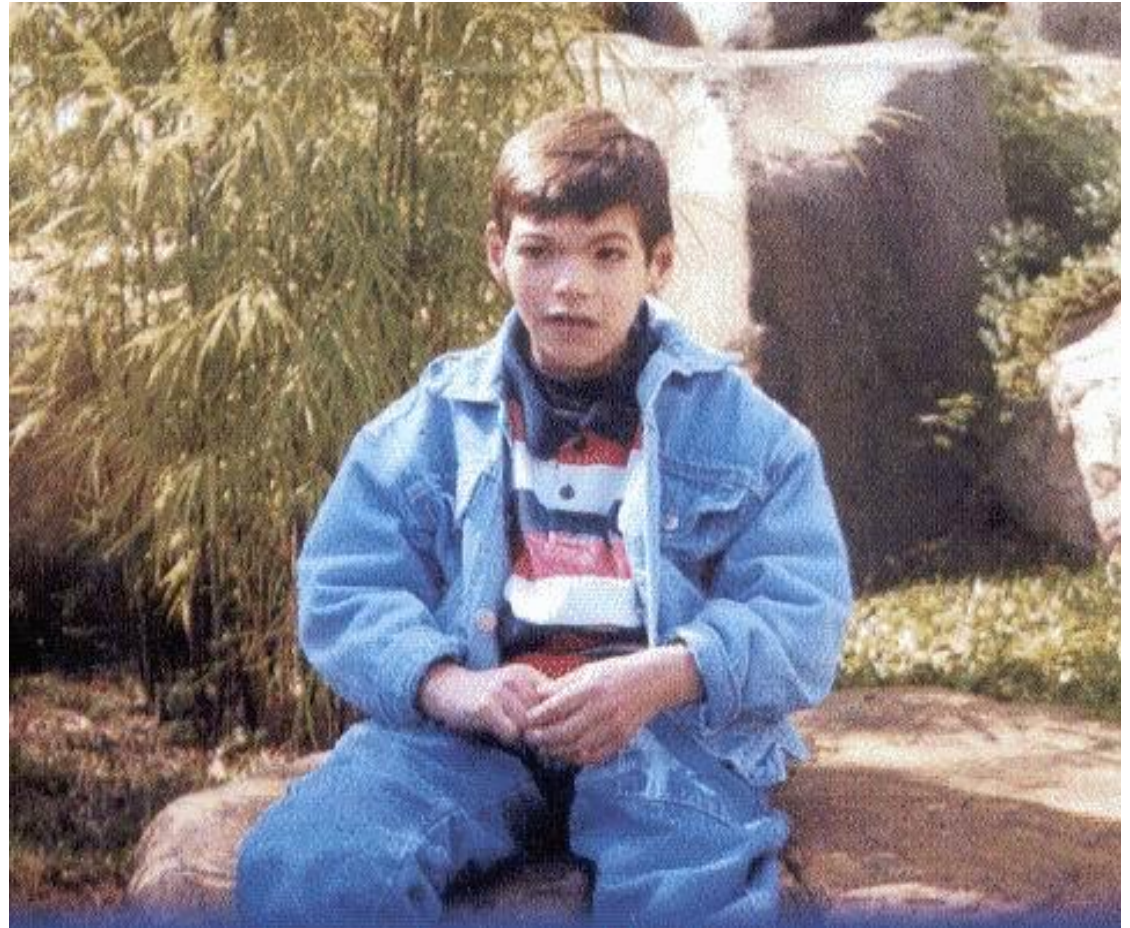


1. Deleção



Paciente portador de deleção do braço curto do cromossomo 4, com face típica descrita como nariz em “elmo” e telecanto

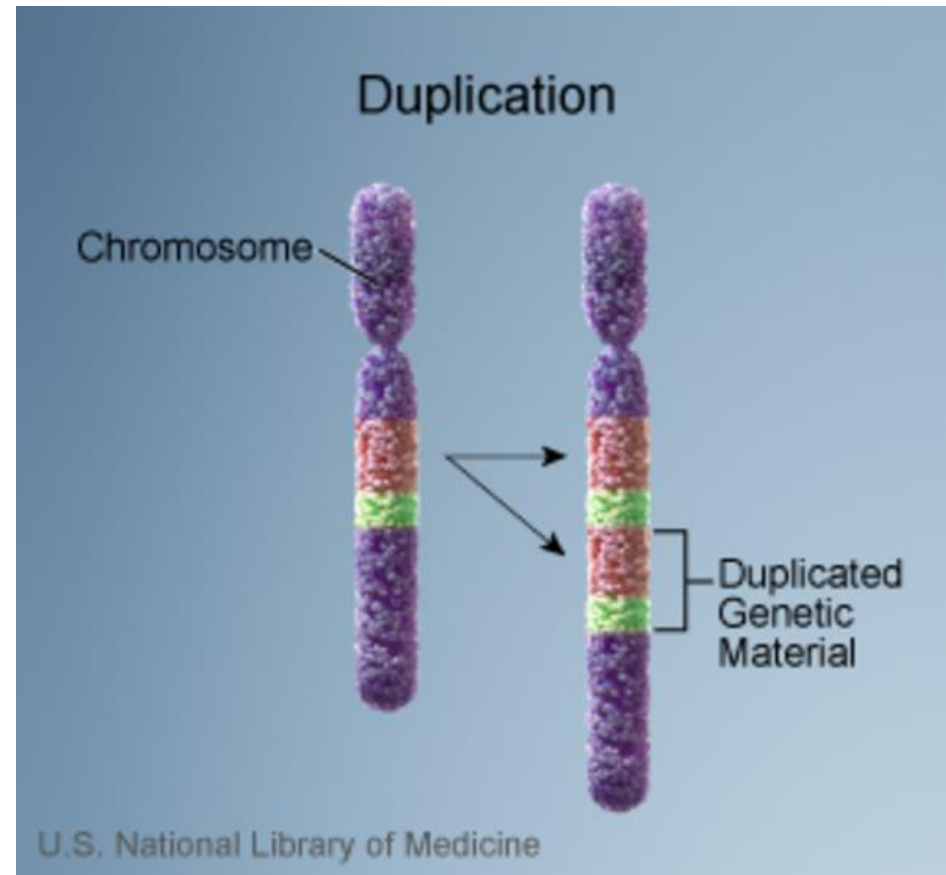
1. Deleção



Pacientes portadores de deleção do braço curto do cromossomo 5 - S. de Cri Du Chat, com microcefalia, olhos amendoados e hipertelorismo

2. Duplicação

- Presença de dois segmentos semelhantes de um mesmo cromossomo
- Normalmente é menos nociva que a deleção
 - duplicação em gametas pode resultar em desequilíbrio cromossômico



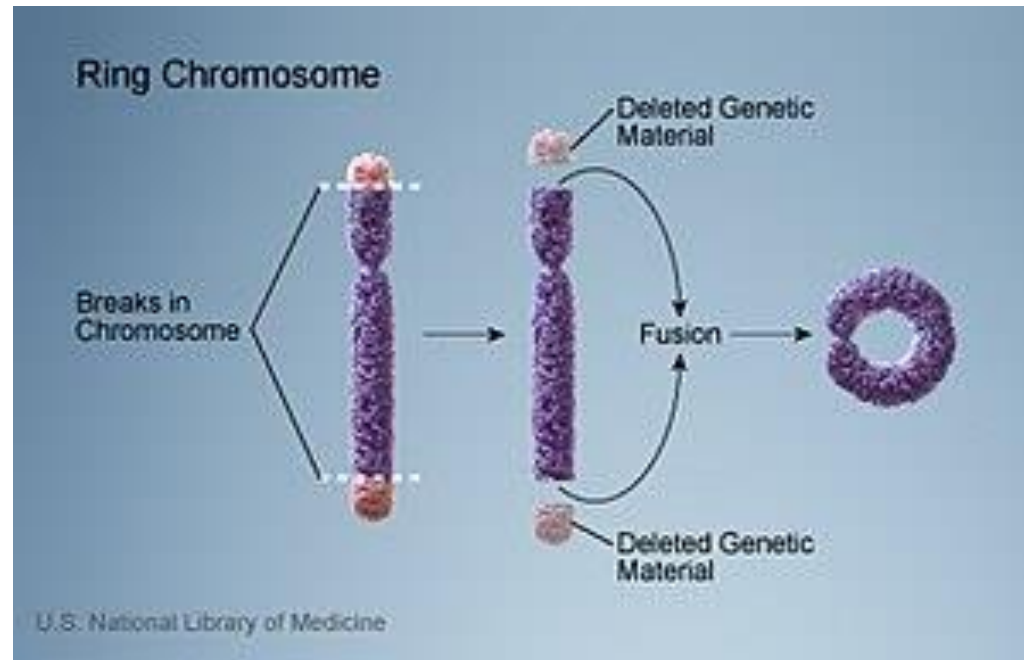
2. Duplicação



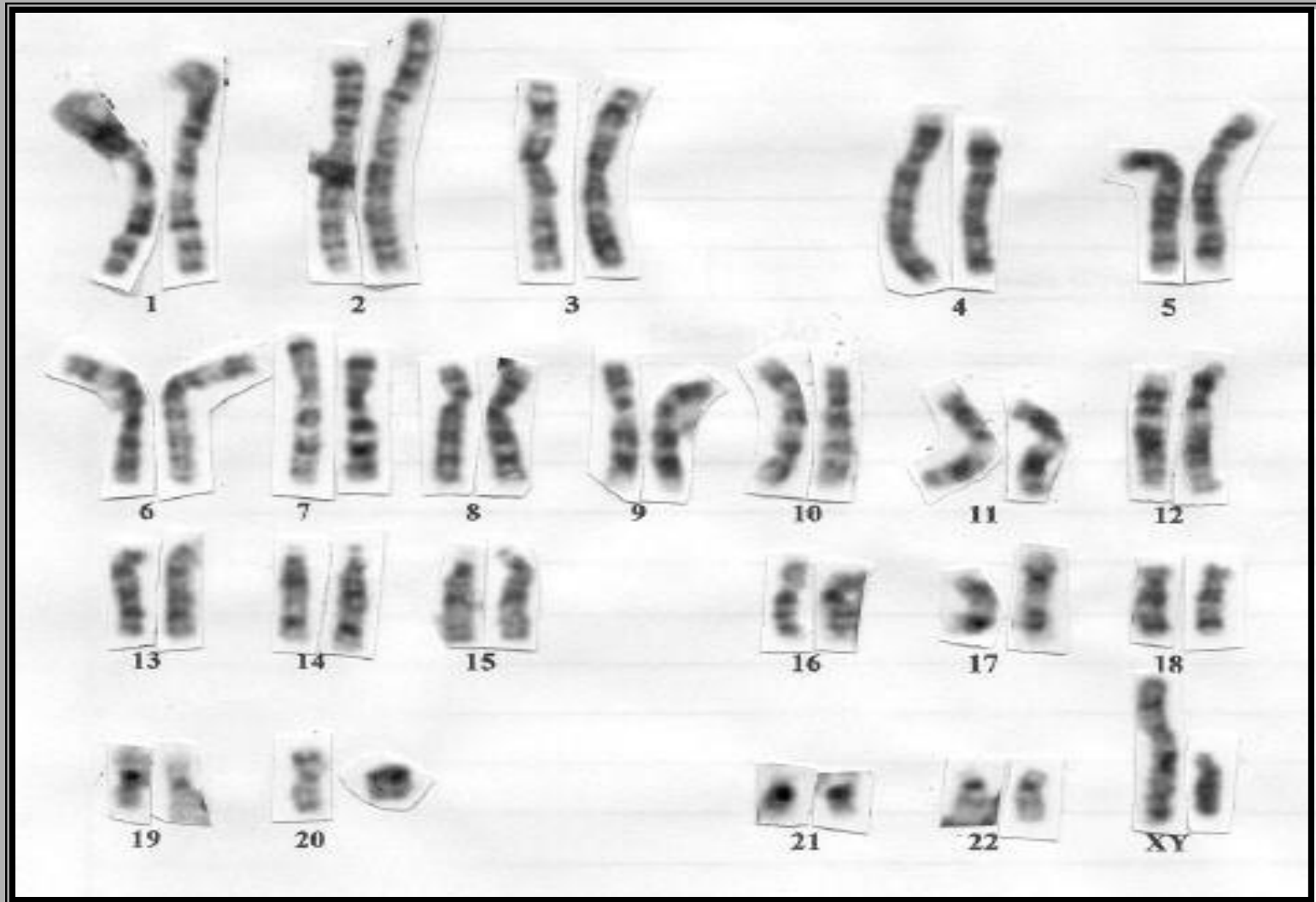
Paciente portadora do cariótipo 46 XX dup (1) (p31-p22)

3. Cromossomo em anel

- Forma-se quando um cromossomo perde as 2 extremidades e volta a se reunir numa estrutura circular
- São instáveis, tem dificuldade de mitose, por isto podem aparecer somente numa proporção das células



3. Cromossomo em anel



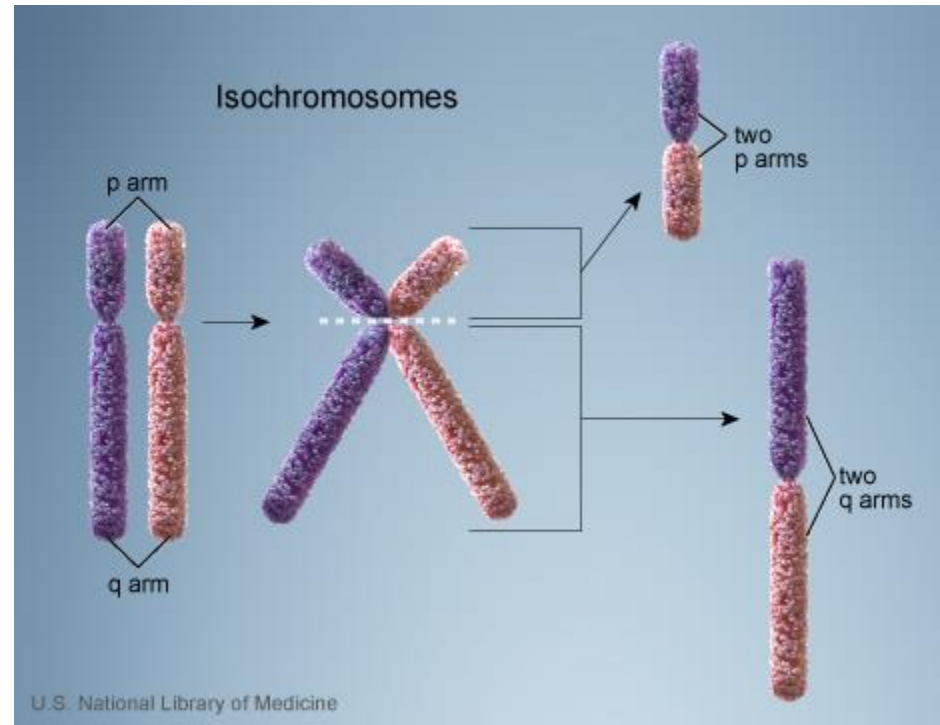
46 XY r (20)

46 XY r (20)



4. Isocromossomos

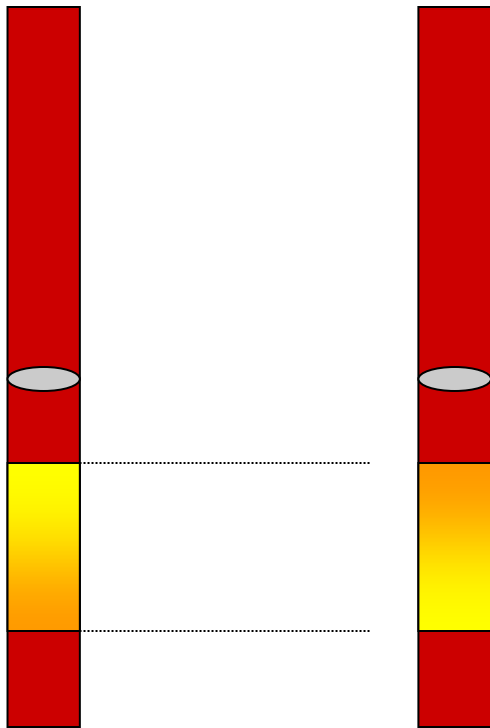
- É um cromossomo no qual um braço está deletado e o outro duplicado
- O mais comum é um isocromossomo do braço longo do cromossomo X em indivíduos com Síndrome de Turner



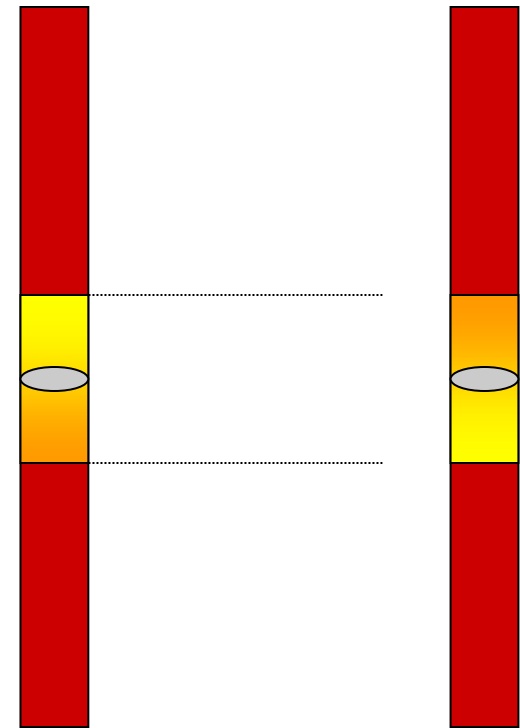
Rearranjos balanceados

- **1. Inversões**
- **2. Translocações**
- **3. Cromossomos marcadores**

1. Inversões



paracêntrica



pericêntrica

1. Inversões

- Um único cromossomo sofre 2 quebras e é reconstituído com o segmento entre as quebras invertido
- **Paracêntrica** - quando as 2 quebras ocorrem num mesmo braço
- **Pericêntrica** - quando há 1 quebra em cada braço do cromossomo

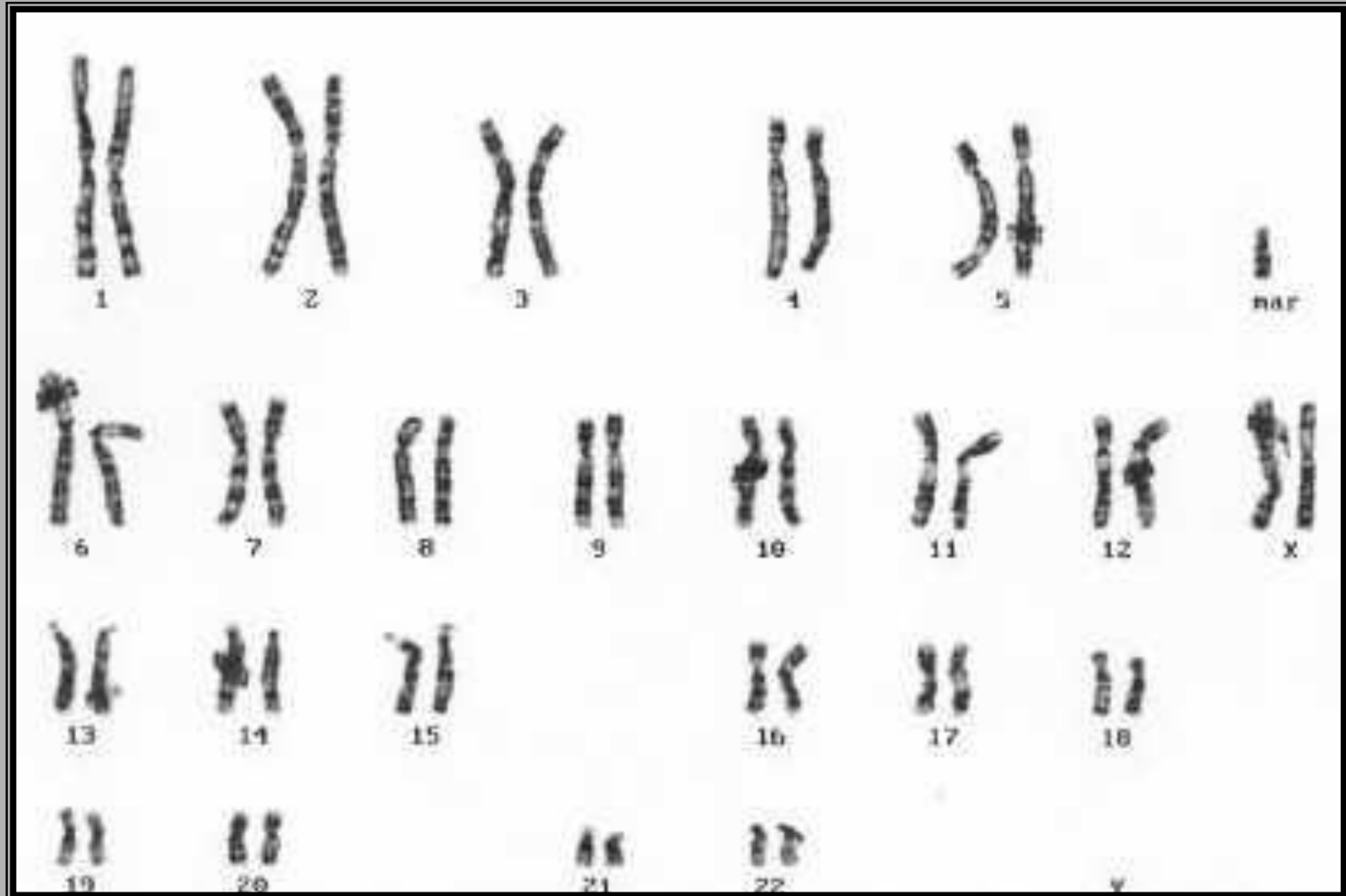
2. Translocações

- Troca de segmentos entre cromossomos não homólogos
- **Balanceada ou Recíproca** - o número total de material cromossômico não é alterado
- **Desbalanceada** - há alteração da quantidade de material cromossômico

3. Cromossomos marcadores

- Cromossomos extras, pequenos - supranumerários
- Não deixa de ser uma anormalidade numérica, mas como é um rearranjo pode ser considerado uma anormalidade estrutural
- **Fragmento** - quando tem centrômero
- **Marcador** - quando não tem centrômero

3. Cromossomos marcadores



46 XX + mar

Anormalidades numéricas dos cromossomos sexuais

- Incidência de 1:674 em mulheres
- Incidência de 1:774 em mulheres
- São causa de **distúrbio de diferenciação sexual** e ocasionalmente de deficiência mental
- São anomalias menos graves que dos cromossomos autossômicos, exceção é a ausência completa de pelo menos 1 cromossomo X - incompatível com a vida

Anormalidades do sexo genético ou cromossômico

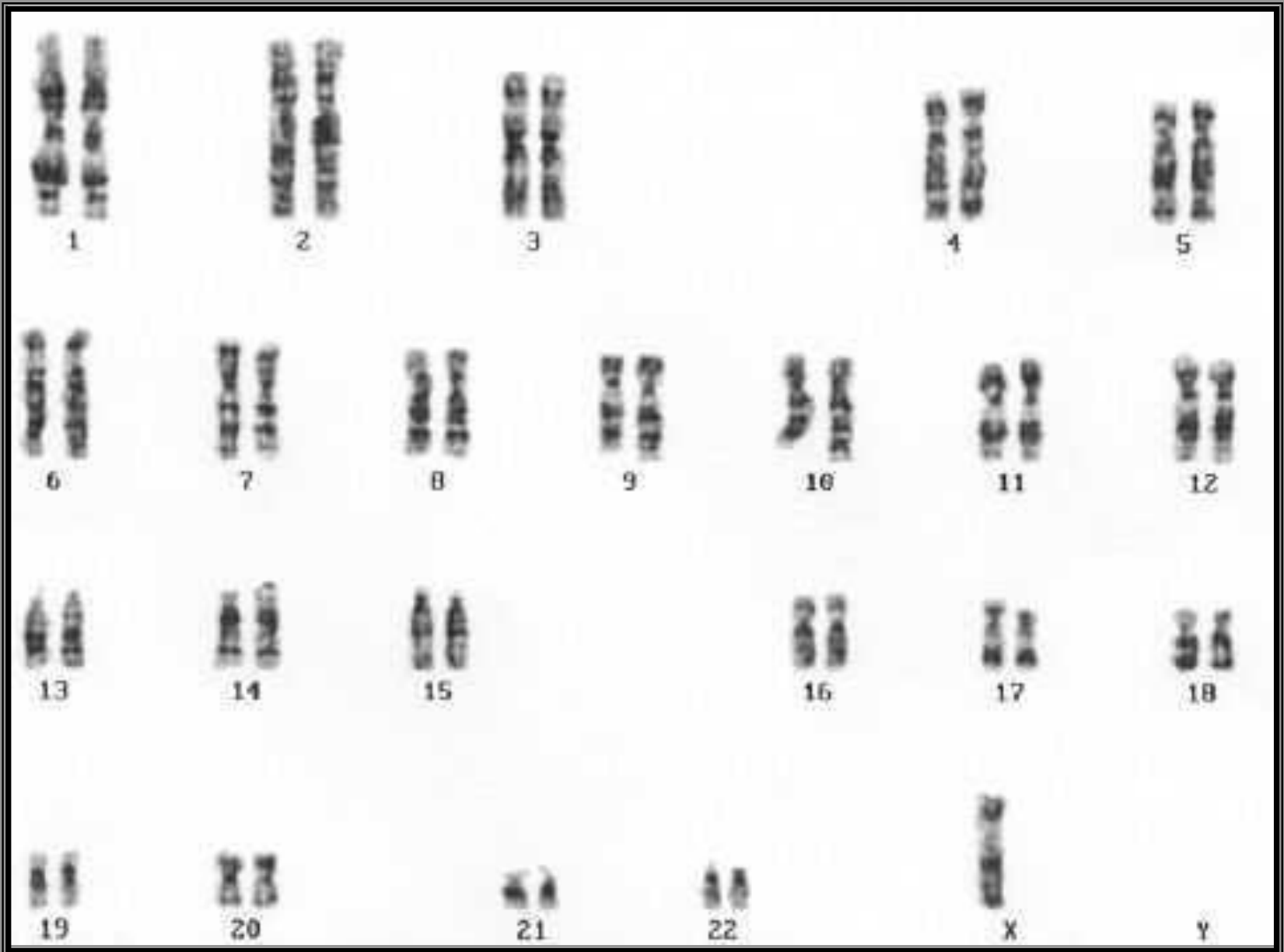
- **1. S. de Turner**
- **2. S. de Klinefelter**
- **3. S. do Triplo X**
- **4. S. 47, XYY**
- **5. S. da Tetra e Pentassomia do X**

1. Síndrome de Turner

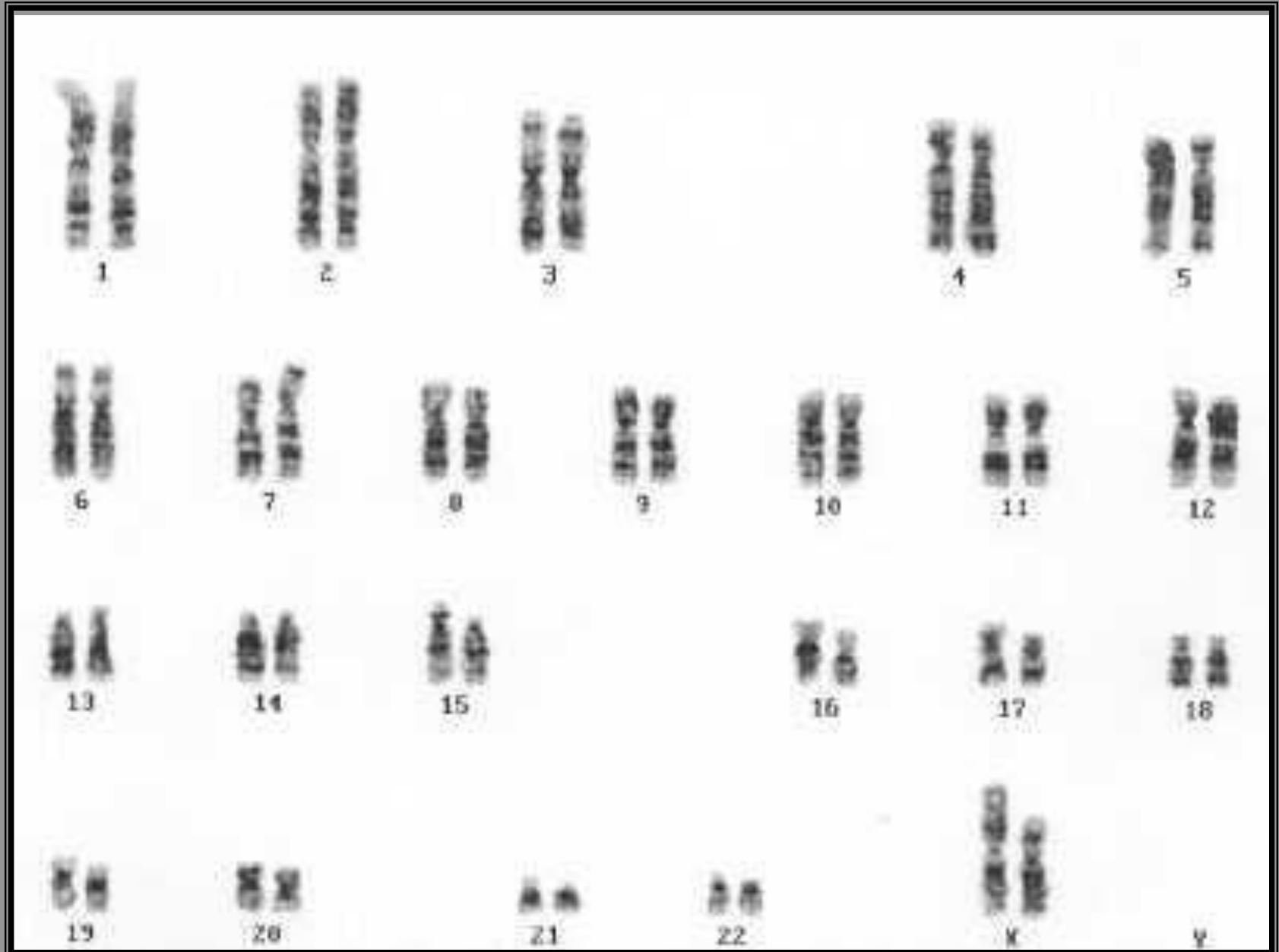
- Classicamente é uma monossomia do cromossomo X (45,X)
- Existem vários tipos de cariótipo:

| | |
|--|-------|
| 45, X | - 53% |
| mosaico 45, X/ 46, XX | - 15% |
| 46, X i(Xq) | - 10% |
| mosaico 45, X/ 46, X i(Xq) | - 8% |
| deleção 46, XXq ⁻ ou 46, XXp ⁻ | - 6% |
| outros mosaicos 45, X/? | - 8% |

45, X



46, X i(Xq)



1. Síndrome de Turner

Quadro clínico

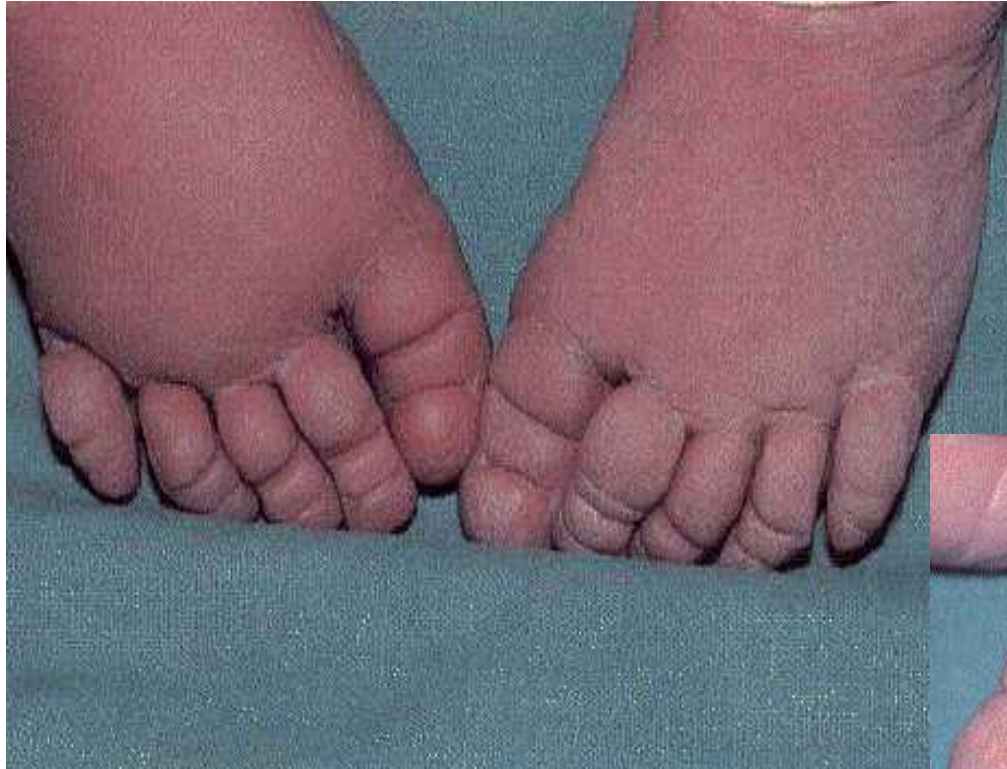
- linfedema de pés em recém-nascido, que regride com a idade
- edema de nuca no RN que evolui para pescoço alado
- cardiopatia
- baixa estatura proporcionada
- implantação de cabelos em tridente na nuca
- hiperconvexidade das unhas de mãos e pés

1. Síndrome de Turner



Edema de nuca - pescoço
alado

1. Síndrome de Turner



Linfedema de pés



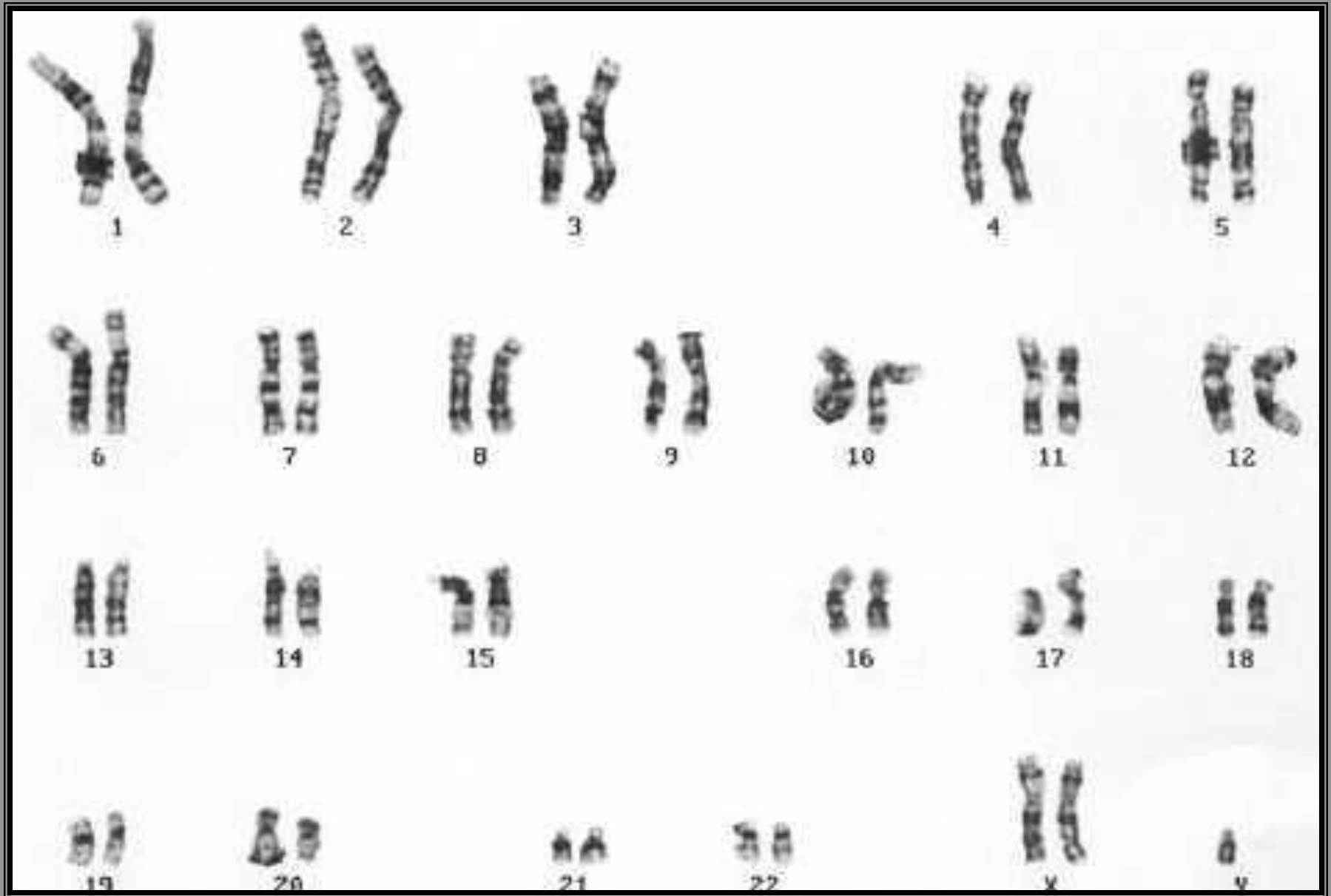
1. Síndrome de Turner

- Incidência de 1:2.500 a 1:5.000 em RN
- 99% dos conceptos com S. de Turner são abortados espontaneamente, apenas 1% nascem
- A S. de Turner é responsável por 15 a 20% das anomalias cromossômicas vistas em abortos
- As pacientes têm disgenesia gonadal - fitas e tecido conjuntivo no lugar de ovários, e útero infantil

2. Síndrome de Klinefelter

- Cariótipo 47, XXY
- Incidência de 1:1.000 RN do sexo masculino
- Incidência de 1:300 abortos de 1º trimestre
- Mosaicismo visto em 15% dos pacientes
- Fenótipo pouco marcante: alta estatura desproporcional, com membros longos (dolicoestenomelia), hipotrofia testicular que leva a hipogonadismo hipergonadotrófico, QI 10 a 15 pontos mais baixos que os irmãos não afetados
- Muitos pacientes só são diagnosticados quando adultos por causa da azoospermia

47, XXY



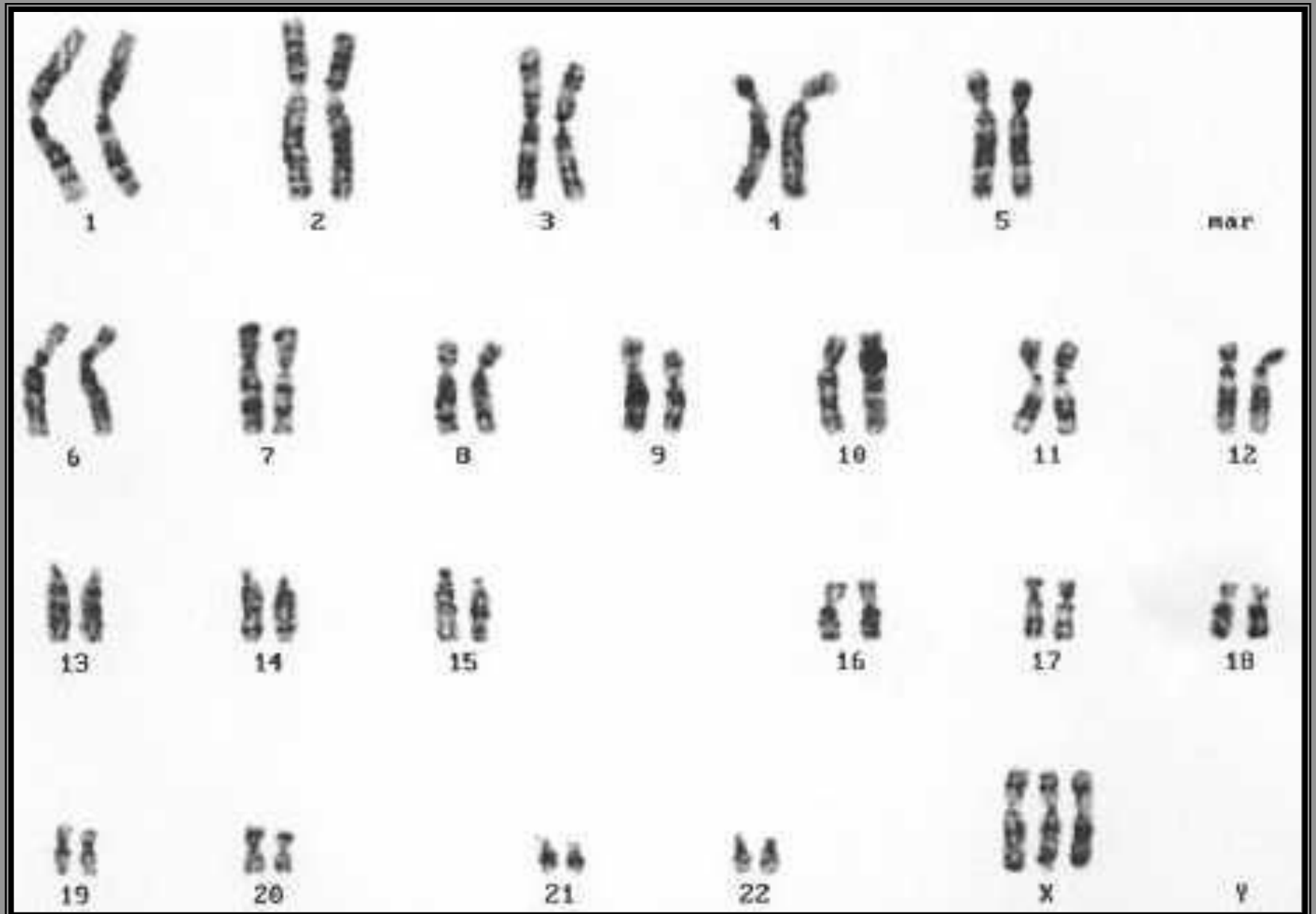
2. Síndrome de Klinefelter



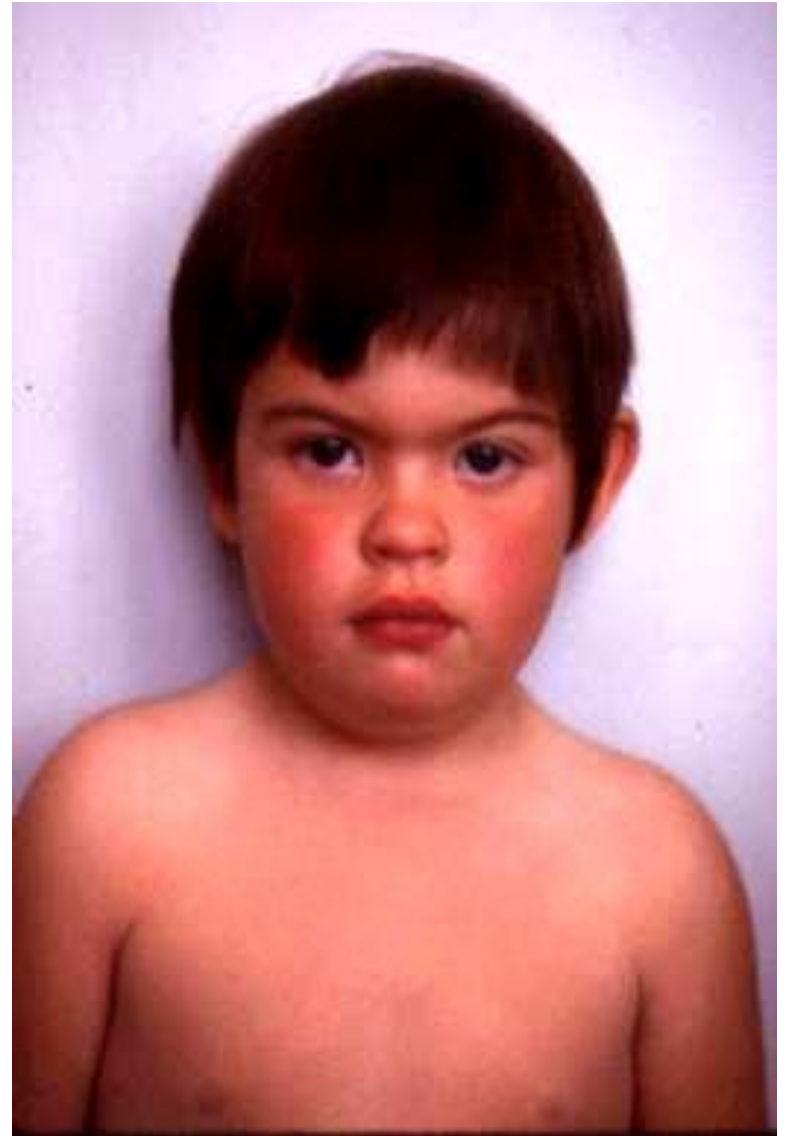
3. Síndrome do Triplo X

- Incidência de 1:1.000 RN
- Causa de deficiência mental
- Estatura acima da média
- Puberdade na maior parte das vezes na idade correta, mas pode acontecer precocemente
- Infertilidade

47, XXX



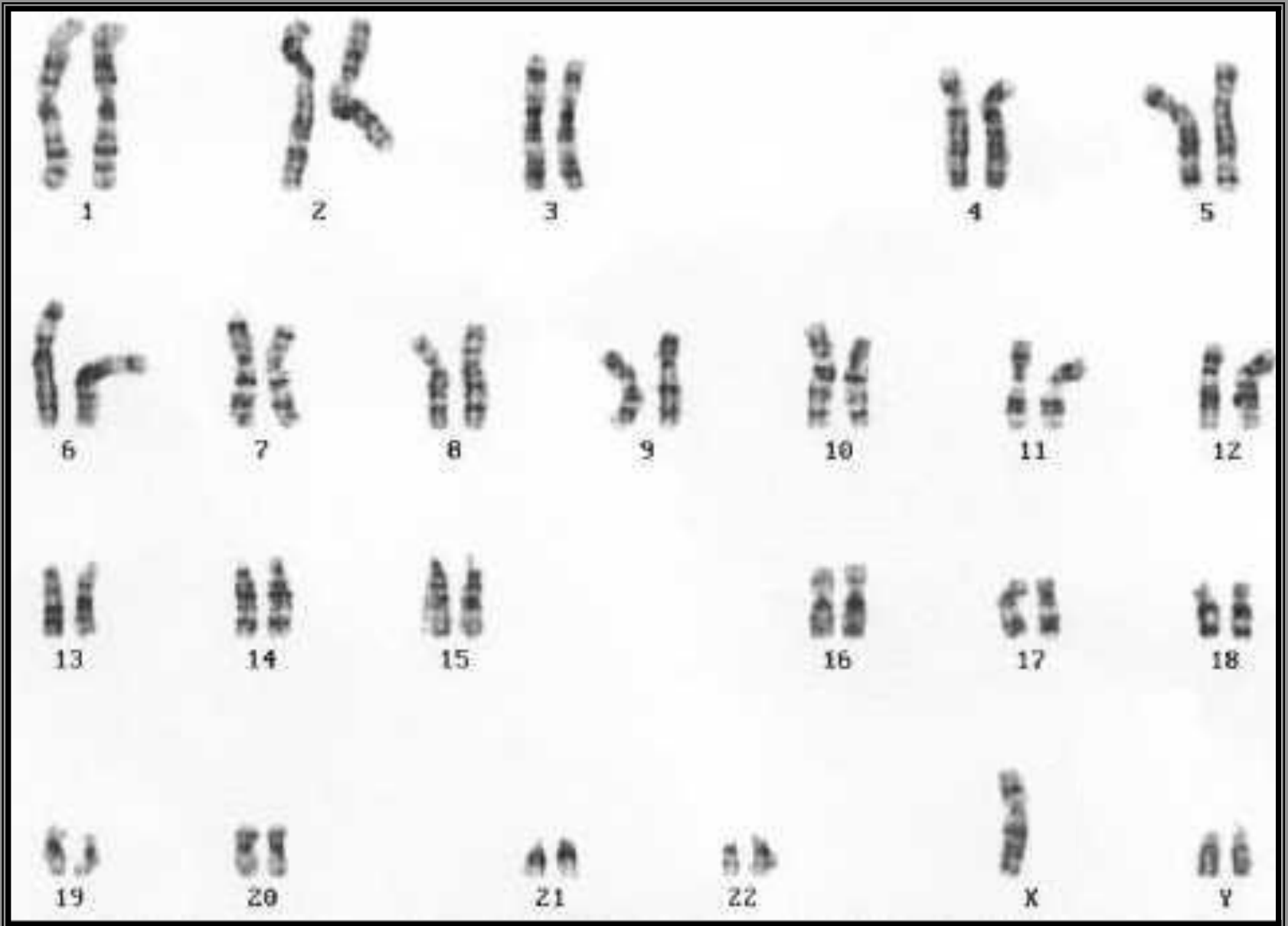
3. Síndrome do Triplo X



4. Síndrome 47, XYY

- Incidência de 1:1.000 na população geral
- Incidência de até 3% em penitenciárias e instituições para deficientes mentais
- Alta estatura
- Problemas de comportamento e adequação social

47, XYY



4. Síndrome 47, XYY

