

Princípios da Citogenética Clínica e da Análise Genômica

A citogenética clínica é o estudo dos cromossomos, sua estrutura e sua herança, aplicado à prática médica. Por mais de 50 anos, tem sido evidente que anomalias cromossômicas — mudanças microscopicamente visíveis no número ou na estrutura dos cromossomos — poderiam ser responsáveis por várias condições clínicas que são, assim, referidas como **transtornos cromossômicos**. Focados no conjunto completo do material genético, os citogeneticistas foram os primeiros a trazer uma perspectiva ampla do genoma para a prática médica. Atualmente, a análise cromossômica — com resolução e precisão cada vez maiores nos níveis citológico e genômico — é um procedimento diagnóstico importante em diversas áreas da medicina clínica. A análise genômica atual, que usa abordagens a serem exploradas neste capítulo, incluindo **microarranjos cromossômicos** e **sequenciamento de genoma completo** representa impressionante melhora na capacidade e resolução, comparadas àquelas conceitualmente similares aos métodos microscópicos focados nos cromossomos (Fig. 5-1).

Transtornos cromossômicos formam a principal categoria de doenças genéticas. Eles são responsáveis por uma grande proporção de todas as perdas reprodutivas, malformações congênitas e deficiência intelectual, e têm um papel importante na patogênese do câncer. Transtornos citogenéticos específicos são responsáveis por centenas de síndromes distintas que são, coletivamente, mais comuns do que todos os distúrbios de genes únicos juntos. Anomalias citogenéticas estão presentes em quase 1% dos nativos, em aproximadamente 2% das gestações em mulheres com mais de 35 anos que se submetem ao diagnóstico pré-natal, e em metade dos abortos espontâneos do primeiro trimestre.

O espectro de análise de mudanças microscopicamente visíveis no número e na estrutura cromossômica até anomalias na estrutura ou sequência do genoma detectáveis em nível de sequenciamento de genoma completo envolve literalmente todo o campo da genética médica (Fig. 5-1). Neste capítulo, serão apresentados os princípios gerais da análise cromossômica e genômica, com foco nas **mutações cromossômicas** e **mutações regionais** introduzidas no capítulo anterior. A discussão sobre distúrbios causados por desequilíbrio genômico foi restrita — quer seja para as centenas a milhares de genes encontrados em cromossomos individuais ou para números menores de genes localizados

numa determinada região do genoma. Aplicações desses princípios a alguns dos distúrbios cromossômicos e genômicos mais comuns e mais bem conhecidos serão apresentadas no Capítulo 6.

INTRODUÇÃO À CITOGENÉTICA E À ANÁLISE GENÔMICA

A morfologia geral e a organização dos cromossomos humanos, bem como sua composição molecular e genômica, foram introduzidas nos Capítulos 2 e 3. Para serem examinadas pela análise cromossômica para propósitos clínicos, as células devem ser capazes de se proliferar em cultura. As células mais acessíveis que atendem a esse requisito são os leucócitos, especificamente os linfócitos T. Para preparar uma cultura de curto prazo adequada à análise citogenética dessas células, uma amostra de sangue periférico é obtida e os leucócitos são coletados, colocados em meio de cultura de tecidos e estimulados a dividirem-se. Após alguns dias, as células em divisão são paradas em **metáfase**, através de agentes químicos que inibem o fuso mitótico. As células são tratadas com solução hipotônica para liberar os cromossomos, os quais são, então, fixados, espalhados em lâminas e corados por uma das diversas técnicas de coloração, dependendo do procedimento diagnóstico específico que está sendo executado. Elas estão, em seguida, prontas para a análise.

Embora sejam ideais para a análise clínica rápida, as culturas de células preparadas a partir de sangue periférico possuem a desvantagem de ter curta duração (3 a 4 dias). Culturas de longo prazo, adequadas para armazenamento permanente e estudos posteriores, podem ser obtidas de uma variedade de outros tecidos. A biópsia da pele, um procedimento cirúrgico pequeno, pode fornecer amostras de tecidos que em cultura produzem **fibroblastos**, os quais podem ser utilizados para uma variedade de estudos bioquímicos e moleculares, bem como para análises genômicas e cromossômicas. Os leucócitos também podem ser transformados em cultura para formar linhagens de células **linfoblastoides**, que são potencialmente imortais. A **medula óssea** possui a vantagem de conter uma alta proporção de células em divisão, de modo que poucas células são necessárias para qualquer cultura; no entanto, ela só

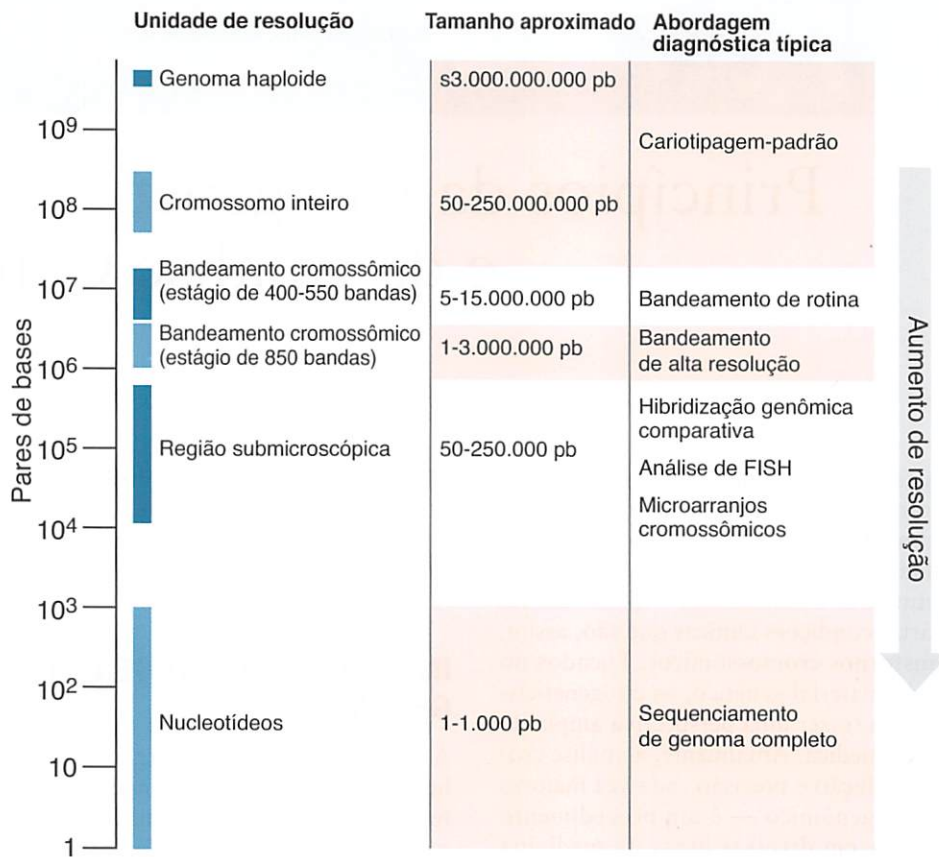


Figura 5-1 Espectro de resolução da análise cromossômica e genômica. A resolução típica e a faixa de eficiência são dadas para várias abordagens diagnósticas usadas rotineiramente na análise cromossômica e genômica. Veja o texto para detalhes e exemplos específicos. FISH, hibridização *in situ* por fluorescência.

pode ser obtida através de procedimento de biópsia de medula, relativamente invasivo. É principalmente utilizada no diagnóstico de malignidades hematológicas suspeitas. As células fetais derivadas do fluido amniótico (amniócitos) ou obtidas através da biópsia das vilosidades coriônicas também podem ser cultivadas em cultura com sucesso, para análises citogenéticas, genômicas, bioquímicas ou moleculares. As células de vilosidades coriônicas também podem ser analisadas diretamente após a biópsia, sem ser necessário colocá-las em cultura. Notavelmente, pequenas quantidades de DNA fetal livre de células são encontradas no plasma materno e podem ser testadas pelo sequenciamento de genoma completo (veja a discussão aprofundada no Capítulo 17).

A análise molecular do genoma, incluindo o sequenciamento de genoma completo, pode ser conduzida em qualquer material clínico apropriado, desde que se possa obter DNA de boa qualidade. As células não precisam estar em divisão para essa finalidade e, dessa forma, é possível estudar o DNA a partir, por exemplo, de amostras de tecidos e tumores, bem como a partir de sangue periférico. Qual abordagem é mais apropriada para um diagnóstico em particular ou uma investigação científica é uma área que tem evoluído rápido, assim como o aumento da resolução, da sensibilidade e da facilidade nas análises cromossômicas e genômicas (Quadro).

Identificação Cromossômica

Os 24 tipos de cromossomos encontrados no genoma humano podem ser rapidamente identificados, em nível citológico, através de procedimentos específicos de coloração. O mais comum desses, o bandeamento Giemsa (**bandeamento G**), foi desenvolvido no início da década de 1970 e foi a primeira ferramenta analítica do genoma completo utilizada amplamente para pesquisa e diagnóstico clínico (Figs. 2-1 e 2-10). Este tem sido o padrão-ouro para detecção e caracterização de anormalidades genômicas estruturais e numéricas em amostras no diagnóstico clínico de distúrbios constitucionais (pós- e pré-natal) e adquiridos (câncer).

O bandeamento G e outros procedimentos de coloração podem ser usados para descrever cromossomos individuais e suas variações ou anomalias, utilizando-se um sistema de classificação cromossômica aceito internacionalmente. A Figura 5-2 mostra um ideograma do padrão de bandas de um conjunto cromossômico humano normal em metáfase, ilustrando o padrão alternado de bandas claras e escuras usado na identificação cromossômica. O padrão de bandas em cada cromossomo é enumerado em cada braço do centrômero ao telômero para vários cromossomos, como mostrado em detalhe na Figura 5-3. A identidade de qualquer banda em particular (e, portanto, da sequência de DNA e dos genes nela inseridos) pode ser precisamente descrita

INDICAÇÕES CLÍNICAS PARA A ANÁLISE CROMOSSÔMICA E GENÔMICA

A análise cromossômica é indicada como procedimento rotineiro de exame diagnóstico para condições específicas encontradas na medicina clínica. Algumas condições clínicas gerais indicam a necessidade de análise citogenética e genômica:

- **Problemas de crescimento e desenvolvimento precoces.** Falha no crescimento, atraso no desenvolvimento, fácies dismórficas, múltiplas malformações, estatura baixa, genitália ambígua e deficiência intelectual são achados frequentes nas crianças com anomalias cromossômicas. A menos que se tenha um diagnóstico definitivo não cromossômico, a análise cromossômica e genômica deve ser realizada em pacientes que apresentem quaisquer desses problemas.
- **Natimorto e morte neonatal.** A incidência de anomalias cromossômicas é muito mais alta entre natimortos (até aproximadamente 10%) do que entre nativos (aproximadamente 0,7%). Ela é também elevada entre crianças que morrem no período neonatal (aproximadamente 10%). A análise cromossômica deveria ser realizada para todas as perdas fetais e natimortos que não tenham uma base clara indicando uma anomalia cromossômica. Nesses casos, a cariotipagem (ou outro modo compreensível de escanear o genoma) é essencial para um aconselhamento genético preciso. Essas análises podem gerar informações importantes para o diagnóstico pré-natal em futuras gestações.
- **Problemas de fertilidade.** Estudos cromossômicos são indicados para mulheres que apresentam amenorreia e para casais com história de infertilidade ou abortos recorrentes. Uma anomalia cromossômica é vista em um ou outro progenitor em 3% a 6% dos casos, nos quais há infertilidade ou dois ou mais abortos.
- **História familiar.** Uma anomalia cromossômica ou genômica conhecida ou suspeita num familiar de primeiro grau é indicativa de análise cromossômica e genômica.
- **Neoplasia.** Virtualmente todos os cânceres estão associados com uma ou mais anomalias cromossômicas (Cap. 15). A avaliação cromossômica e genômica no próprio tumor, ou na medula óssea no caso de neoplasias hematológicas malignas, pode oferecer informação diagnóstica ou prognóstica.
- **Gestação.** Existe um alto risco de anomalias cromossômicas em fetos concebidos por mulheres com idade avançada, tipicamente definida como mais de 35 anos (Cap. 17). A análise cromossômica e genômica dos cromossomos fetais pode ser oferecida como parte da rotina dos cuidados pré-natais em tais gestações. Como uma abordagem de triagem para os distúrbios cromossômicos mais comuns, testes pré-natais não invasivos, usando o sequenciamento de genoma completo, estão atualmente disponíveis para mulheres gestantes de todas as idades.

sem ambiguidade através da utilização desse sistema de numeração hierárquica baseado nessas regiões.

Cromossomos humanos são frequentemente classificados em três tipos que podem ser facilmente distinguidos na metáfase, pela posição do **centrômero**, a constrição primária visível na metáfase (Fig. 5-2): cromossomos **metacêntricos**, com um centrômero mais ou menos central e braços aproximadamente do mesmo tamanho; cromossomos **submetacêntricos**, com o centrômero deslocado do centro

e braços com tamanhos claramente diferentes; e cromossomos **acrocêntricos**, com o centrômero próximo a uma das extremidades. Um quarto tipo potencial de cromossomo, o **telocêntrico**, com o centrômero numa extremidade e apenas um único braço, não ocorre no cariótipo humano normal, mas é ocasionalmente observado em rearranjos cromossômicos. Os cromossomos acrocêntricos humanos (cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22) possuem pequenas e distintas massas de cromatina, conhecidas como **satélites**, conectadas ao braço curto por hastes finas (chamadas de **contrições secundárias**). As hastes desses cinco pares cromossômicos possuem centenas de cópias de genes de RNA ribossômico (o principal componente dos ribossomos; Cap. 3), bem como uma variedade de sequências repetitivas.

Além das mudanças no padrão de bandas, intervalos que não se coram — denominados **sítios frágeis** — são ocasionalmente observados em locais específicos de vários cromossomos, estando propensos à instabilidade genômica regional. Mais de 80 sítios frágeis comuns são conhecidos, muitos dos quais são variações hereditárias. Uma pequena proporção de sítios frágeis está associada a distúrbios clínicos específicos; o sítio frágil que mais demonstra ser clinicamente significativo é encontrado próximo à extremidade do braço longo do cromossomo X em homens com uma forma específica e comum de deficiência intelectual ligada ao X, a **síndrome do X frágil** (Caso 17), bem como em algumas mulheres portadoras do mesmo distúrbio genético.

Análise Cromossômica de Alta Resolução

O cariótipo de bandas G padrão, com resolução de 400 a 550 bandas, como é visto numa típica preparação em metáfase, permite a detecção de deleções e duplicações maiores que aproximadamente 5 a 10 Mb em qualquer parte do genoma (Fig. 5-1). No entanto, a sensibilidade do bandeamento G com essa resolução pode ser baixa para regiões do genoma em que os padrões de banda são menos específicos.

Para aumentar a sensibilidade da análise cromossômica, o bandeamento de alta resolução (também chamado de **bandeamento em prometáfase**) pode ser conseguido através da coloração dos cromossomos obtidos em um estágio inicial da mitose (prófase ou prometáfase), quando eles ainda estão num estado relativamente descondensado (Cap. 2). O bandeamento de alta resolução é especialmente útil quando se suspeita de uma anormalidade cromossômica estrutural sutil. A coloração de cromossomos em prometáfase pode revelar 850 bandas ou mais, em um conjunto haploide, embora esse método seja substituído atualmente pela análise de microarranjos (veja a seguir). Uma comparação dos padrões de bandas em três estágios distintos de resolução é mostrada para um cromossomo na Figura 5-4, demonstrando o aumento na precisão diagnóstica obtido em cromossomos mais longos. O desenvolvimento da análise cromossômica de alta resolução, no início da década de 1980, permitiu a descoberta de várias das novas **síndromes de microdeleção**,

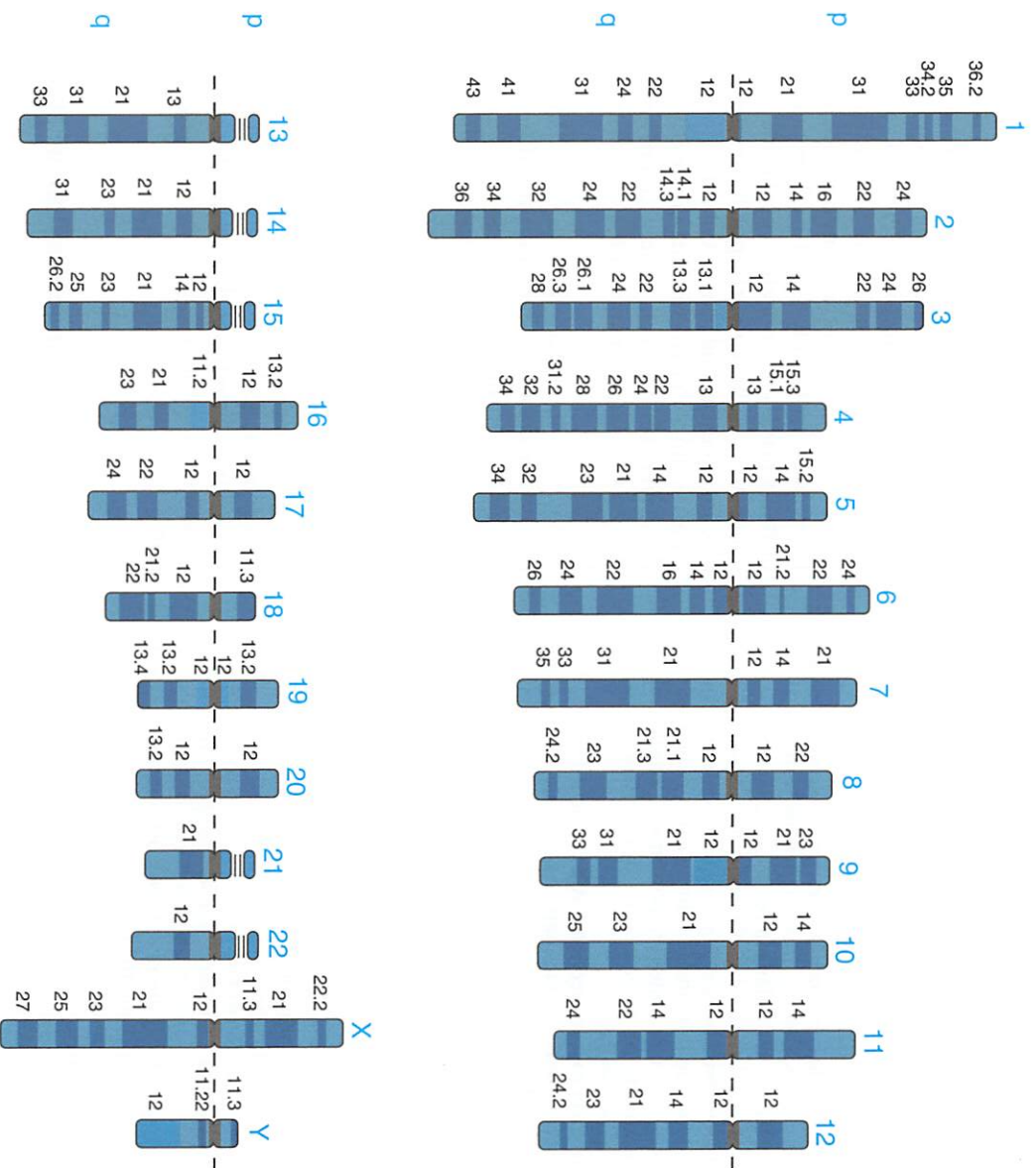


Figura 5-2 Ideograma mostrando o padrão de bandas G para cromossomos humanos em metáfase, com cerca de 400 bandas por cariótipo haploide. Conforme o desenho, os cromossomos estão tipicamente representados com as cromátides-irmãs alinhadas tão próximas que elas não são reconhecidas como entidades distintas. Os centrômeros são indicados pela constrição primária e regiões estreitas em *cinza-escuro* separando os braços p e q. Por conveniência e clareza, apenas as bandas G escuras estão enumeradas. Para exemplos de um esquema completo de numeração, veja a Figura 5-3. *Veja Fontes e Agradecimentos.*

causadas por deleções ou duplicações genômicas menores, com tamanho de cerca de 2 a 3 Mb (Fig. 5-1). Entretanto, o longo tempo necessário e a dificuldade técnica característica deste método impedem seu uso rotineiro na análise genômica completa.

Hibridização *In Situ* por Fluorescência

O bandejamento cromossômico de alta resolução direcionado foi amplamente substituído no início da década de 1990 pela hibridização *in situ* por fluorescência (FISH, do inglês, *fluorescence in situ hybridization*), um método para detectar a presença ou ausência de uma determinada sequência de DNA, ou avaliar o número ou a organização de um cromossomo ou região cromossômica, *in situ* (literalmente, “no local”) na célula. Essa convergência de abordagens genômica e citogenética — denominada com vários termos, tais como *citogenética molecular*, *citogenômica* ou

cromotômica — expandiu dramaticamente tanto o alcance quanto a precisão da análise cromossômica na rotina da prática clínica.

A tecnologia da FISH tem a vantagem da disponibilidade de se encomendar coleções de clones de DNA recombinantes contendo DNA de toda a extensão do genoma, geradas originalmente como parte do Projeto Genoma Humano. Clones contendo sequências específicas de DNA humano podem ser utilizados como sondas para detectar a região correspondente do genoma em preparações cromossômicas ou no núcleo interfásico, para uma variedade de objetivos de pesquisa ou diagnósticos, como ilustrado na Figura 5-5:

- Sondas de DNA específicas para cromossomos individuais, regiões cromossômicas ou genes podem ser marcadas com diferentes fluorocromos e usadas para identificar rearranjos cromossômicos específicos ou para diagnosticar rapidamente a existência de número cromossômico anormal no material clínico.

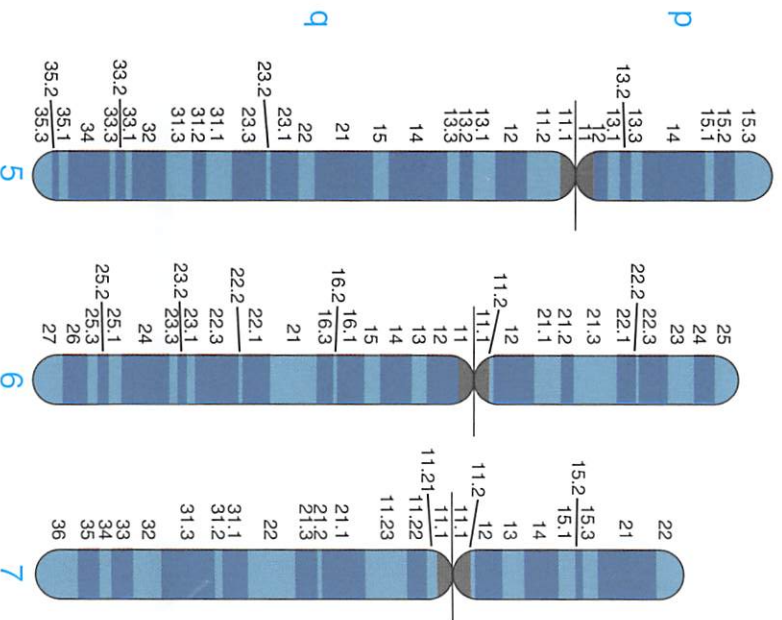


Figura 5-3 Exemplos de padrões de bandas G para os cromossomos 5, 6 e 7, no estágio de condensação de 550 bandas. Os números das bandas permitem a identificação inequívoca de cada banda G escura ou clara, por exemplo, cromossomo 5p15.2 ou cromossomo 7q21.2. *Veja Fontes e Agradecimentos.*

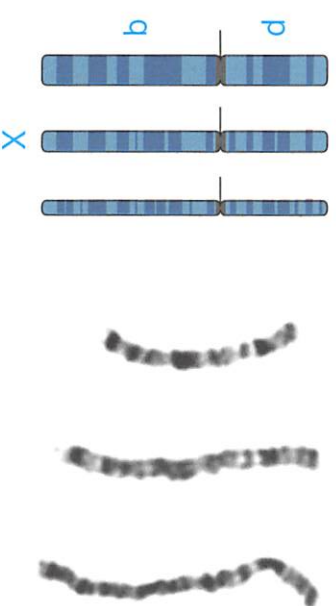


Figura 5-4 O cromossomo X: ideogramas e fotomicrografias na metáfase, prometáfase e prófase (da esquerda para a direita). *Veja Fontes e Agradecimentos.*

- Sondas de DNA repetitivo permitem a detecção de DNA-satélite ou outros elementos repetitivos de DNA localizados em regiões cromossômicas específicas. Sondas de DNA-satélite, especialmente aquelas que pertencem à família α -satélite de repetições centroméricas (Cap. 2), são amplamente utilizadas para determinar o número de cópias de um determinado cromossomo.

Embora a tecnologia da FISH forneça resolução e especificidade muito maiores do que a análise por bandejamento G, ela não permite a análise eficiente do genoma inteiro, e, assim, sua utilização é limitada pela necessidade de um alvo

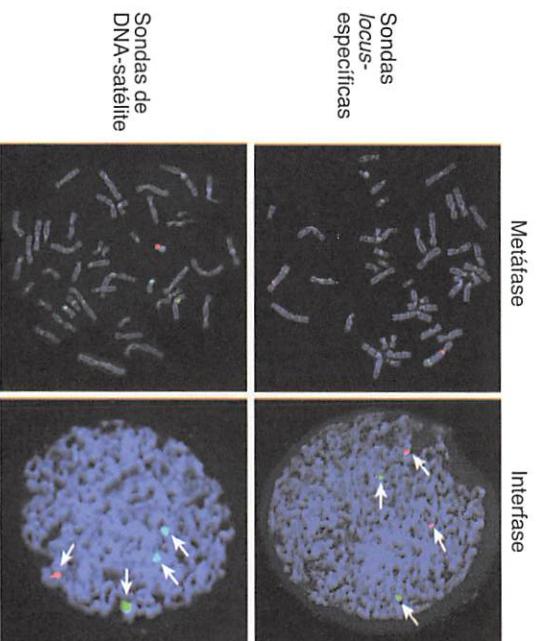


Figura 5-5 Híbridação *in situ* por fluorescência dos cromossomos humanos em metáfase e interfase, com diferentes tipos de sonda de DNA. *Parte superior*, sondas de DNA de cópia única específicas para as seqüências dentro das bandas 4q12 (fluorescência *vermelha*) e 4q31.1 (fluorescência *verde*). *Parte inferior*, sondas de DNA repetitivo α -satélite específicas para os centrômeros dos cromossomos 18 (*azul-claro*), X (*verde*) e Y (*vermelho*). *Veja Fontes e Agradecimentos.*

específico com base numa região genômica suspeita em um diagnóstico clínico.

Análise Genômica Usando Microarranjos

Embora o cariótipo de bandas G continue sendo o teste diagnóstico de primeira linha para a maioria das aplicações clínicas, ele tem sido complementado ou mesmo substituído pelas abordagens genômicas amplas para detectar o desequilíbrio no número de cópias em alta resolução (Fig. 5-1), ampliando o conceito da análise específica de FISH para testar o genoma inteiro. Em vez de examinar as células e cromossomos *in situ* com uma sonda de cada vez, as técnicas de microarranjos cromossômicos interrogam simultaneamente o genoma inteiro, representado em uma matriz ordenada de segmentos genômicos em uma lâmina microscópica contendo segmentos de DNA sobrepostos ou regularmente espaçados que representam o genoma inteiro. Em uma abordagem baseada na hibridização genômica comparativa (CGH, do inglês, *comparative genome hybridization*), é possível detectar ganhos e perdas relativos no número de cópias de forma ampla no genoma através da hibridização de duas amostras — uma do genoma-contrôle e outra do paciente — para certos microarranjos. Um excesso de seqüências de um ou de outro genoma indica uma super ou sub-representação dessas seqüências no genoma do paciente em relação ao controle (Fig. 5-6). Uma abordagem alternativa utiliza “arranjos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)”, os quais contêm versões de seqüências correspondentes de dois alelos de vários SNPs espalhados pelo genoma (conforme introduzido no Capítulo 4). Nesse caso, a representação e a intensidade relativa dos alelos em diferentes regiões do genoma

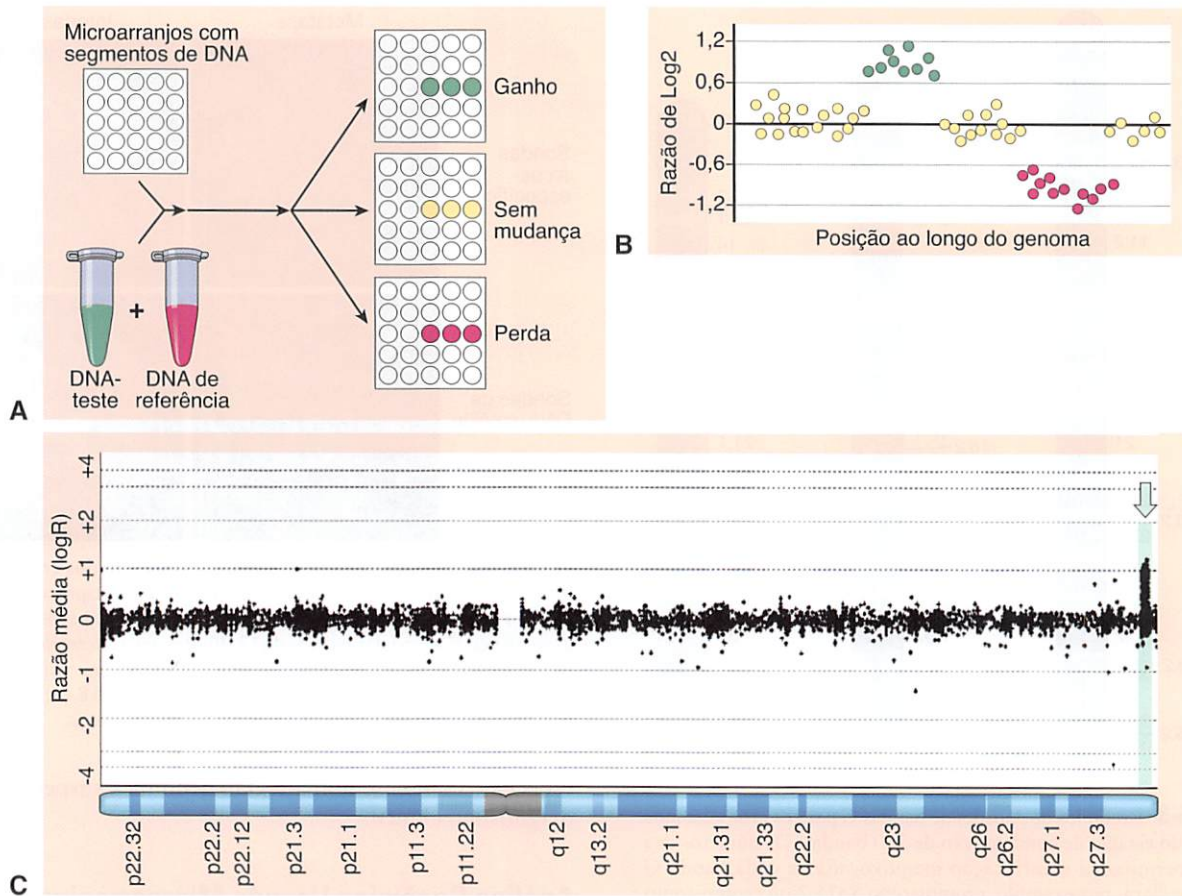


Figura 5-6 Microarranjo cromossômico para detectar a dosagem cromossômica e genômica. A, Esquema de ensaio de arranjos baseado na hibridização genômica comparativa (CGH), na qual o genoma do paciente (destacado em *verde*) é cohibridizado com o arranjo de um genoma-controle de referência (destacado em *vermelho*). As sondas são misturadas e permite-se que elas hibridizem com sua sequência complementar no arranjo. As intensidades relativas da hibridização de duas sondas são mensuradas, indicando a dosagem equivalente entre os dois genomas (*em amarelo*) ou um ganho (*em verde*) ou uma perda (*em vermelho*) na amostra do paciente. B, Uma plotagem típica do logaritmo das razões de fluorescência em função da posição ao longo do genoma. C, Resultado do arranjo de CGH de um paciente com síndrome de Rett (Caso 40), indicando duplicação de aproximadamente 800 kb em uma banda Xq28 contendo o gene *MECP2*. As razões de fluorescência LogR foram plotadas ao longo do comprimento do cromossomo X. Cada ponto representa a razão para uma sequência individual no arranjo. Sequências correspondentes ao gene *MECP2* e regiões próximas estão duplicadas no genoma do paciente, levando a uma razão aumentada indicada pela seta verde e pelo quadro sombreado nessa região do cromossomo. *Veja Fontes & Agradecimentos.*

indicam se o cromossomo ou a região cromossômica está presente na dosagem apropriada (Fig. 5-6).

Em testes clínicos rotineiros para distúrbios cromossômicos suspeitos, o espaçamento das sondas de microarranjos fornece uma resolução de 250 kb ao longo de uma porção inteira do genoma humano. Uma maior densidade de sondas pode ser utilizada para atingir resolução ainda maior (<25-50 kb) sobre regiões de interesse clínico em particular, tais como aquelas associadas a distúrbios do desenvolvimento ou anomalias congênitas conhecidos (Fig. 5-6; para outros exemplos, Cap. 6). Essa abordagem, a qual tem sido utilizada num número cada vez maior de laboratórios clínicos, complementa a cariotipagem convencional e proporciona uma avaliação muito mais sensível e de maior resolução do genoma. Os microarranjos têm sido utilizados com sucesso na identificação

de anormalidades cromossômicas e genômicas em crianças com atraso de desenvolvimento não explicado, deficiência intelectual ou defeitos congênitos, revelando uma série de alterações genômicas patogênicas que não foram detectadas pelo bandeamento G convencional. Com base nesse campo em significativo crescimento, os microarranjos genômicos amplos vêm substituindo o cariótipo por bandeamento G como teste rotineiro de primeira linha em determinadas populações de pacientes.

Entretanto, duas importantes limitações dessa tecnologia devem ser mencionadas. Primeiramente, métodos baseados em microarranjos mensuram apenas o número relativo de cópias de sequências de DNA, mas não se elas foram translocadas ou rearranjadas a partir de sua posição normal no genoma. Dessa forma, a confirmação da suspeita de anormalidade cromossômica ou genômica através

de cariotipagem ou FISH é importante para determinar a natureza da alteração e, portanto, seu risco de recorrência, seja para o indivíduo ou para outros membros da família. Em segundo lugar, a análise genômica de alta resolução pode revelar variações, particularmente diferenças pequenas no número de cópias, que possuem significado clínico incerto. Um número cada vez maior de tais variações tem sido documentado e catalogado, mesmo dentro da população geral. Como abordado no Capítulo 4, muitas delas parecem ser variações do número de cópias benignas. Sua existência ressalta a natureza única de cada genoma individual e enfatiza o desafio diagnóstico de avaliar o que é considerado um cariótipo “normal” e o que parece ser patogênico.

Análise Genômica pelo Sequenciamento de Genoma Completo

No extremo, mas ainda no mesmo espectro da análise citogenética e da análise por microarranjos, a mais recente resolução em testes clínicos para detectar distúrbios cromossômicos e genômicos seria sequenciar genomas de pacientes em sua totalidade. De fato, como a eficiência do sequenciamento de genoma completo tem aumentado e seu custo tem caído, está se tornando cada vez mais conveniente considerar o sequenciamento de amostras de pacientes em um cenário clínico (Fig. 5-1).

Os princípios subjacentes a essa abordagem são simples, pois o número e a composição de qualquer segmento específico do genoma de um indivíduo irão refletir a sequência de DNA gerada a partir desse genoma. Embora as sequências obtidas rotineiramente com a tecnologia atual sejam em geral pequenas (cerca de 50 a 500 pb) em comparação ao tamanho de um cromossomo ou até mesmo de um único gene, um genoma com representação anormalmente baixa ou alta dessas sequências, a partir de um determinado cromossomo ou segmento cromossômico, tem maior probabilidade de apresentar anormalidades numéricas ou estruturais para este cromossomo. Para detectar anormalidades numéricas de um cromossomo inteiro, geralmente não é necessário sequenciar o genoma completo; até mesmo um número limitado de sequências que se alinham em um cromossomo de interesse particular deve revelar se essas sequências são encontradas em número esperado (p. ex., equivalente a duas cópias por genoma diploide no caso de um autossomo) ou quando elas estão significativamente super ou sub-representadas (Fig. 5-7). Esse conceito está sendo aplicado atualmente no diagnóstico pré-natal de fetos com desequilíbrio cromossômico (Cap. 17).

Entretanto, para detectar rearranjos balanceados do genoma, nos quais não há ganho ou perda de DNA, é necessária uma sequência mais completa do genoma. Aqui, em vez de sequências que se alinham perfeitamente com a sequência de referência do genoma humano, encontram-se sequências raras

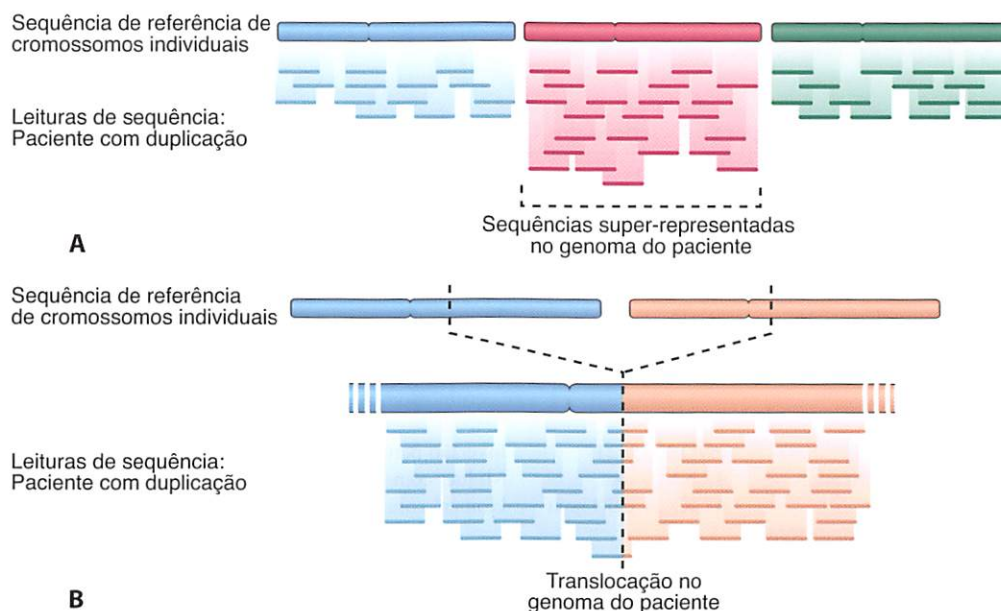


Figura 5-7 Estratégias para detecção de anomalias cromossômicas numéricas e estruturais pela análise do sequenciamento de genoma completo. Embora um pequeno número de leituras seja ilustrado esquematicamente aqui, na prática muitos milhões de leituras de sequências são analisadas e alinhadas ao genoma de referência para obter suporte estatisticamente significativo no diagnóstico de uma aneuploidia ou anomalia cromossômica estrutural. A, Alinhamento de sequências de leitura do genoma de um paciente à sequência de referência de três cromossomos individuais. A super-representação das sequências do cromossomo em *vermelho* indica que o paciente é aneuploide para esse cromossomo. B, O alinhamento das sequências de leitura do genoma de um paciente para a sequência de referência de dois cromossomos revela várias leituras que contêm sequências contíguas para *ambos* os cromossomos. Isso indica uma translocação no genoma do paciente envolvendo os cromossomos em *azul* e em *laranja* nas posições designadas pelas *linhas tracejadas*.

que se alinham em duas *regiões diferentes e normalmente não contíguas* na sequência de referência (quer sejam no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes) (Fig. 5-7). Essa abordagem tem sido utilizada para identificar genes específicos envolvidos em alguns tipos de câncer e em crianças com vários defeitos congênitos devido a translocações, envolvendo a justaposição de sequências que são normalmente localizadas em cromossomos diferentes (Caps. 6 e 15).

ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS

As anomalias cromossômicas podem ser tanto numéricas quanto estruturais, e podem envolver um ou mais autosomos, cromossomos sexuais ou ambos simultaneamente. A incidência global de anomalias cromossômicas é de aproximadamente um em cada 154 nativos (Fig. 5-8), e seu impacto é, conseqüentemente, substancial, tanto para a medicina clínica quanto para a sociedade. Sem dúvida, o tipo mais comum de anomalia cromossômica clinicamente significativa é a **aneuploidia**, uma anomalia cromossômica numérica devido a um cromossomo extra ou ausente. Um cariótipo aneuploide está sempre associado a anormalidades físicas ou mentais ou a ambas. **Anomalias estruturais** (rearranjos envolvendo um ou mais cromossomos) também são relativamente comuns (Fig. 5-8). Dependendo de se o rearranjo cromossômico leva ou não a um desequilíbrio de conteúdo genômico, este pode ter ou não um efeito fenotípico. No entanto, como explicado mais adiante neste capítulo, mesmo anomalias cromossômicas balanceadas podem aumentar o risco de prole anormal na geração seguinte.

As anomalias cromossômicas são descritas segundo um conjunto padronizado de abreviações e nomenclaturas que indicam a natureza e (no caso de análises executadas por FISH ou microarranjos) a tecnologia utilizada. Algumas das abreviações mais comuns, exemplos de cariótipos anormais e anomalias estão listados na Tabela 5-1.

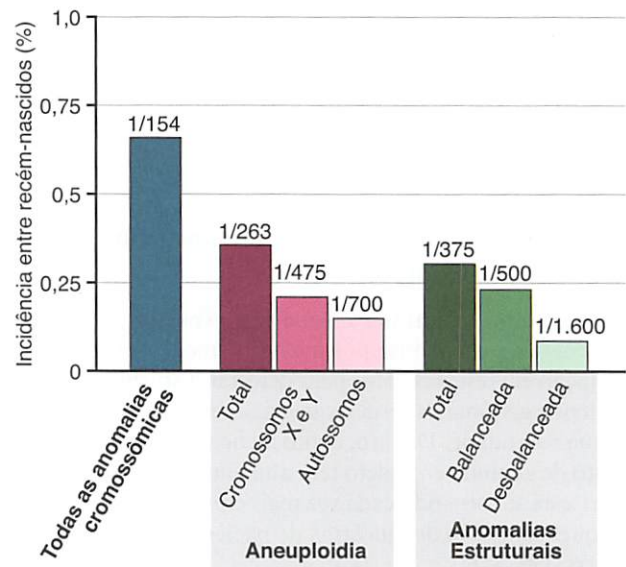


Figura 5-8 Incidência de anomalias cromossômicas em recém-nascidos, baseada na análise cromossômica de 68.000 recém-nascidos. *Veja Fontes & Agradecimentos.*

TABELA 5-1 Algumas Abreviações Usadas para a Descrição dos Cromossomos e de suas Anomalias, com Exemplos Representativos

Abreviação	Significado	Exemplo	Condição
		46,XX	Cariótipo feminino normal
		46,XY	Cariótipo masculino normal
cen	Centrômero		
del	Deleção	46,XX,del(5)(q13)	Mulher com deleção terminal de um cromossomo 5 distal à banda 5q13
der	Cromossomo derivativo	der(1)	Translocação cromossômica derivada do cromossomo 1 e contendo o centrômero do cromossomo 1
dic	Cromossomo dicêntrico	dic(X;Y)	Translocação cromossômica contendo o centrômero de ambos os cromossomos, X e Y
dup	Duplicação		
inv	Inversão	inv(3)(p25q21)	Inversão pericêntrica do cromossomo 3
mar	Cromossomo marcador	47,XX, + mar	Mulher com um cromossomo extra, não identificado
mat	Origem materna	47,XX, + del(1)mat	Homem com um cromossomo extra der(1) herdado da sua mãe
p	Braço curto do cromossomo		
pat	Origem paterna		
q	Braço longo do cromossomo		
r	Cromossomo em anel	46,X,r(X)	Mulher com cromossomo X em anel
rob	Translocação robertsoniana	rob(14;21)(q10;q10)	Quebra e reunião ocorreram na banda 14q10 e na banda 21q10 nas regiões centroméricas dos cromossomos 14 e 21
t	Translocação	46,XX,t(2;8)(q22;p21)	Mulher com translocação balanceada entre os cromossomos 2 e 8, com quebras nas bandas 2q22 e 8p21
+	Ganho de	47,XX, + 21	Mulher com trissomia do 21
-	Perda de	45,XY,-22	Homem com monossomia do 22
/	Mosaicismo	46,XX/47,XX, + 21	Mulher com duas populações de células, uma com cariótipo normal e uma com trissomia do 21

Dosagem, Equilíbrio e Desequilíbrio Gênicos

Para distúrbios cromossômicos e genômicos, é o aspecto *quantitativo* da expressão gênica que constitui a base da doença, em contraste com os distúrbios de gene único, nos quais a patogênese normalmente reflete aspectos *qualitativos* da função gênica. As consequências clínicas de qualquer anormalidade cromossômica em particular vão depender do desequilíbrio resultante de partes do genoma, da combinação específica de genes contidos na ou afetados pela anormalidade, e da possibilidade de transmissão para a próxima geração.

O conceito central para pensar em distúrbios cromossômicos e genômicos é o de *dosagem gênica* e seu equilíbrio ou desequilíbrio. Como será visto nos próximos capítulos, esse mesmo conceito é geralmente aplicado ao serem considerados alguns distúrbios de gene único e sua base mutacional subjacente (Caps. 7, 11 e 12); no entanto, ele assume importância uniforme para anormalidades cromossômicas, nas quais geralmente há maior preocupação com a dosagem gênica dentro de uma região cromossômica relevante do que efetivamente com a sequência normal ou anormal desses genes. Aqui, a sequência dos genes é tipicamente considerada normal e não levaria a qualquer condição clínica, exceto pelo fato de sua dosagem estar incorreta.

A maioria dos genes no genoma humano está presente em duas doses e é expressa a partir de ambas as cópias. Alguns genes, entretanto, são expressos a partir de uma única cópia (p. ex., genes “imprantados” e genes ligados ao X sujeitos à inativação do X; Cap. 3). Análises extensas de casos clínicos têm demonstrado que a dosagem relativa desses genes é crítica para o desenvolvimento normal. Uma ou três doses em vez de duas geralmente não contribuem para a função normal do gene ou do conjunto de genes que são tipicamente expressos a partir de duas cópias. Do mesmo modo, anormalidades do *imprinting* genômico ou da inativação do X que causam expressão anormal das duas cópias de um gene ou de um conjunto de genes em vez de uma, invariavelmente levam a distúrbios clínicos.

Predizer resultados clínicos para distúrbios cromossômicos e genômicos pode ser um desafio enorme para o aconselhamento genético, particularmente no grupo pré-natal. Muitos desses dilemas diagnósticos serão apresentados ao longo desta seção e nos Capítulos 6 e 17, mas há uma série de princípios gerais que devem ser mantidos em mente, enquanto se exploram tipos específicos de anormalidades cromossômicas nas seções que se seguem (Quadro).

Anomalias Cromossômicas Numéricas

Um complemento cromossômico com qualquer número de cromossomos diferente de 46 é dito ser **heteroploide**. Um múltiplo exato do número cromossômico haploide (n) é chamado **euploide**, e qualquer outro número cromossômico é **aneuploide**.

CARIÓTIPOS E GENOMAS DESBALANCEADOS EM RECÉM-NASCIDOS: ORIENTAÇÕES GERAIS PARA O ACONSELHAMENTO

- *Monossomias são mais deletérias que trissomias.* As monossomias completas geralmente não são viáveis, exceto para a monossomia do cromossomo X. As trissomias completas são viáveis para os cromossomos 13, 18, 21, X e Y.
- *O fenótipo na aneuploidia parcial depende de uma série de fatores,* incluindo o tamanho do segmento desbalanceado, qual a região do genoma foi afetada, quais os genes envolvidos e se o desbalanço é monossômico ou trissômico.
- *O risco em casos de inversão depende da localização da inversão no que diz respeito ao centrômero e do tamanho do segmento invertido.* Para inversões que não envolvem o centrômero (inversões paracêntricas), há um baixo risco de um fenótipo anormal na próxima geração. Mas para inversões que envolvem o centrômero (inversões pericêntricas), o risco de defeitos congênitos na prole pode ser significativo e aumenta com o tamanho do segmento invertido.
- *Para um cariótipo mosaico envolvendo qualquer anomalia cromossômica, todas as apostas estão fora!* O aconselhamento é particularmente desafiador porque o grau de mosaicismo em tecidos ou estágios relevantes do desenvolvimento é geralmente desconhecido. Assim, há incerteza sobre a severidade do fenótipo.

Triploidia e Tetraploidia

Além do número diploide ($2n$) característico das células somáticas normais, dois outros complementos cromossômicos euploides, **triploide** ($3n$) e **tetraploide** ($4n$), são ocasionalmente observados em material clínico. Ambas, triploidia e tetraploidia, foram observadas em fetos. A triploidia é observada em 1% a 3% das concepções reconhecidas; crianças triploides podem nascer vivas, embora elas não sobrevivam por muito tempo. Entre as poucas que sobrevivem pelo menos até o fim do primeiro trimestre de gestação, a maioria resulta da fertilização do óvulo por dois espermatozoides (dispermia). Outros casos são causados pela falha em uma das divisões meióticas em um dos genitores, resultando num óvulo ou espermatozoide diploide. A manifestação fenotípica de um cariótipo triploide depende da fonte do conjunto cromossômico extra; triploides com material cromossômico extra de origem materna são tipicamente abortados espontaneamente no início da gravidez, enquanto aqueles com conjunto cromossômico extra de origem paterna tipicamente possuem uma placenta degenerativa anormal (resultando na chamada **mola hidatiforme parcial**), com um feto pequeno. Os tetraploides são sempre 92, XXXX ou 92, XXYY e resultam provavelmente da falha em completar a divisão inicial de clivagem do zigoto.

Aneuploidia

A aneuploidia é o tipo de distúrbio cromossômico humano mais comum e clinicamente significativo, ocorrendo em pelo menos 5% de todas as gestações reconhecidas. A maioria

dos pacientes aneuploides possui ou **trissomia** (três em vez do par normal de um determinado cromossomo) ou, menos frequentemente, **monossomia** (apenas um representante de um determinado cromossomo). Tanto a trissomia quanto a monossomia podem ter graves consequências fenotípicas.

A trissomia pode existir em qualquer parte do genoma, mas a trissomia em todos os cromossomos é compatível com a vida apenas ocasionalmente. De longe, o tipo mais comum de trissomia em recém-nascidos vivos é a **trissomia do 21**, a constituição cromossômica encontrada em 95% dos pacientes com **síndrome de Down** (cariótipo 47,XX,+21 ou 47,XY,+21) (Fig. 5-9). Outras trissomias observadas em nativos incluem a trissomia do 18 e a trissomia do 13. É notável que esses autossomos (13, 18 e 21) são os três que possuem menor número de genes (Fig. 2-7); presumivelmente, a trissomia dos autossomos com maior número de genes é letal na maioria dos casos. A monossomia em um cromossomo inteiro quase sempre é letal; uma importante exceção é a monossomia do cromossomo X, como observado na **síndrome de Turner** (Caso 47). Essas condições são consideradas em maiores detalhes no Capítulo 6.

Embora as causas de aneuploidia não sejam completamente compreendidas, o mecanismo cromossômico mais comum é a **não disjunção meiótica**. Ela refere-se à falha na separação correta de um determinado par cromossômico durante uma das duas divisões meióticas, geralmente durante a meiose I. As consequências genômicas da não disjunção durante a meiose I e a meiose II são diferentes (Fig. 5-10). Se o erro ocorrer durante a meiose I, o gameta com 24 cromossomos conterá ambos os membros cromossômicos, paterno e materno, do par. Se ele ocorrer durante a meiose II, o gameta com o cromossomo extra conterá ambas as cópias do cromossomo materno ou paterno. (Estritamente falando, essas afirmações referem-se apenas ao centrômero paterno ou materno, uma vez que a recombinação entre os cromossomos homólogos normalmente ocorreu no início da meiose I precedente, resultando em algumas diferenças genéticas entre as cromátides e, conseqüentemente, entre os cromossomos-filhos correspondentes; Cap. 2.)

A disjunção adequada de um par de cromossomos homólogos durante a meiose I parece relativamente simples (Fig. 5-10). Na realidade, entretanto, ela requer uma façanha de engenharia complexa que envolve o controle temporal e espacial preciso do alinhamento entre os dois homólogos, de suas conexões fortes uns com os outros (sinapses), de suas interações com o fuso mitótico, e, finalmente, de seu desprendimento e do movimento subsequente para polos opostos e para as diferentes células-filhas. A propensão de um par cromossômico à não disjunção tem sido fortemente associada a alterações na frequência ou localização, ou ambas, dos eventos de recombinação na meiose I, os quais são críticos para a manutenção adequada da sinapse. Um par de cromossomos com muito poucas (ou mesmo nenhuma) recombinações, ou com recombinação muito próxima ao centrômero ou telômero, pode estar mais suscetível à não disjunção do que um par de cromossomos com um número e uma distribuição de eventos de recombinação mais típicos.

Em alguns casos, a aneuploidia pode também resultar da separação prematura de cromátides-irmãs na meiose I em

vez de na meiose II. Se isso ocorrer, as cromátides separadas podem se segregar ao acaso para o ovócito ou para o glóbulo polar, levando a um desequilíbrio do gameta.

A não disjunção também pode ocorrer durante uma divisão mitótica após a formação do zigoto. Se isso acontece nas divisões iniciais de clivagem, pode resultar em **mosaicism** clinicamente significativo (veja a seção posterior). Em algumas linhagens de células malignas e algumas culturas de células, a não disjunção mitótica pode levar a cariótipos muito anormais.

Anomalias Cromossômicas Estruturais

Os rearranjos estruturais resultam da quebra, recombinação ou troca cromossômica, seguida de reconstituição em uma combinação anormal. Enquanto os rearranjos podem ocorrer de várias maneiras, eles são, em conjunto, menos comuns que a aneuploidia; em geral, as anomalias cromossômicas estão presentes em um a cada 375 recém-nascidos (Fig. 5-8). Como as alterações numéricas, os rearranjos estruturais podem estar presentes em todas as células de uma pessoa ou sob a forma de mosaico.

Os rearranjos estruturais são classificados como **balanceados**, se o genoma possui o complemento normal de material cromossômico, ou **desbalanceados**, quando existe material adicional ou ausente. É evidente que essas designações dependem da resolução do(s) método(s) utilizado(s) para analisar um determinado rearranjo (Fig. 5-1); alguns que parecem balanceados em nível de bandeamento de alta resolução, por exemplo, podem ser desbalanceados quando estudados com microarranjos cromossômicos ou por análise de seqüências de DNA. Alguns rearranjos são estáveis, capazes de passar inalterados pelas divisões celulares de meiose e mitose, enquanto outros são instáveis. Alguns dos tipos de rearranjos estruturais mais comuns encontrados nos cromossomos humanos são ilustrados esquematicamente na Figura 5-11.

Rearranjos Desbalanceados

Os rearranjos desbalanceados são detectados em aproximadamente um a cada 1.600 nativos (Fig. 5-8); o fenótipo provavelmente será anormal devido à deleção ou à duplicação de múltiplos genes, ou (em alguns casos) a ambas. A duplicação de parte de um cromossomo leva a uma **trissomia parcial** nos genes dentro desse segmento; a deleção leva à **monossomia parcial**. Como conceito geral, qualquer mudança que perturbe o equilíbrio normal da dosagem gênica pode resultar em desenvolvimento anormal; uma ampla gama de fenótipos pode ocorrer, dependendo da natureza dos genes específicos, cujas dosagens estão alteradas em um determinado caso.

Grandes rearranjos estruturais que envolvem o desequilíbrio de, pelo menos, algumas megabases podem ser detectados em nível de bandeamento cromossômico de rotina, incluindo a cariotipagem de alta resolução. A detecção de alterações menores, no entanto, geralmente requer análise de maior resolução, envolvendo FISH ou análise de microarranjos cromossômicos.

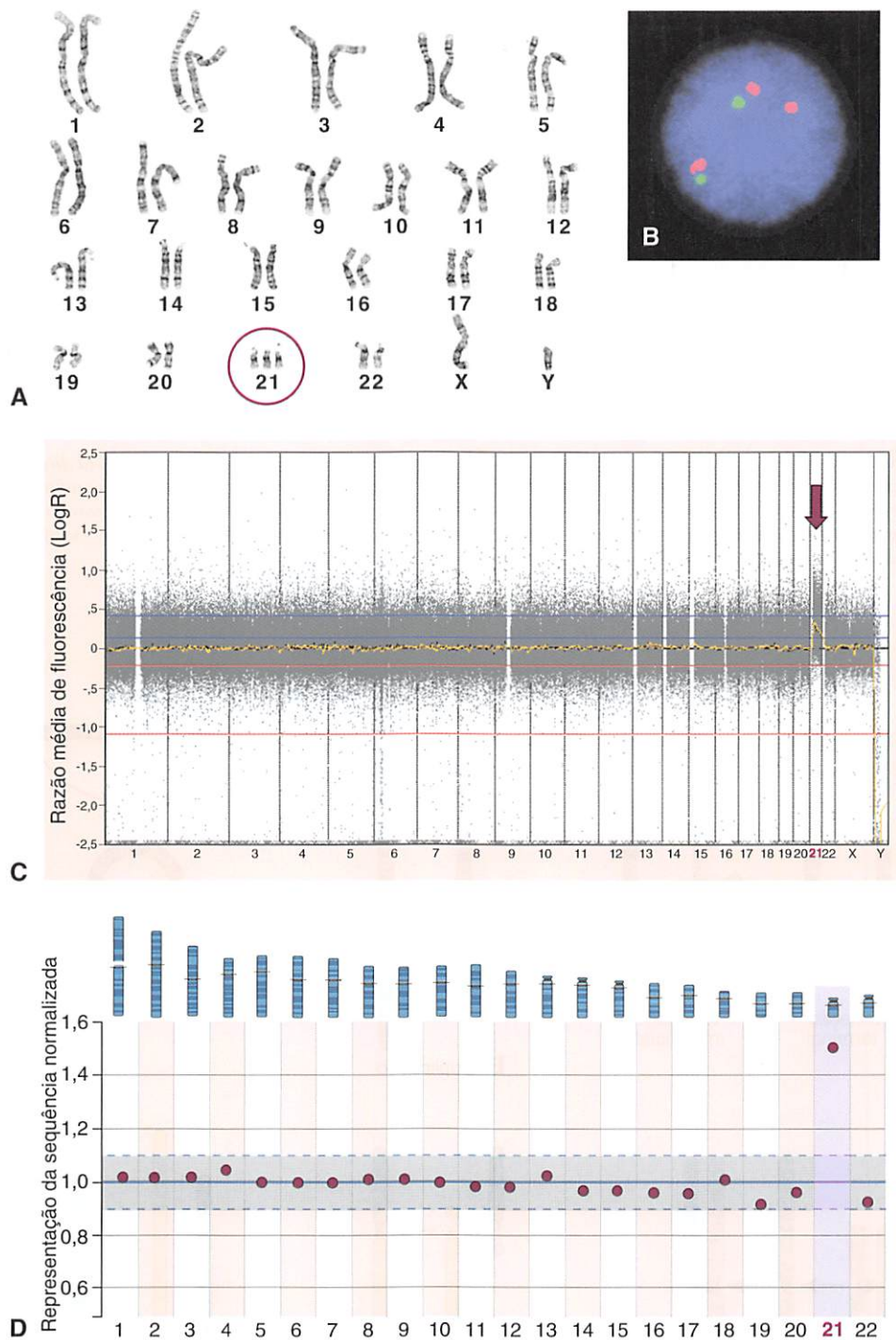


Figura 5-9 Abordagens cromossômica e genômica no diagnóstico da trissomia do 21. **A**, Cariótipo de um paciente do sexo masculino com síndrome de Down, mostrando três cópias do cromossomo 21. **B**, Análise de hibridização *in situ* por fluorescência em interfase usando sonda *locus*-específica para o cromossomo 21 (em vermelho, três pontos) e para um autossomo-controle (em verde, dois pontos). **C**, Detecção da trissomia do 21 em uma paciente do sexo feminino por microarranjo cromossômico de genoma completo. O aumento da razão de fluorescência para seqüências do cromossomo 21 está indicado pela seta vermelha. **D**, Detecção da trissomia do 21 pelo sequenciamento de genoma completo e super-representação das seqüências do cromossomo 21. A representação da seqüência normalizada para cromossomos individuais (\pm DP) em amostras cromossomicamente normais está indicada pela região sombreada verde. Uma razão normalizada de aproximadamente 1,5 indica três cópias de seqüências do cromossomo 21 em vez de duas, consistente com a trissomia do 21. *Veja Fontes & Agradecimentos.*

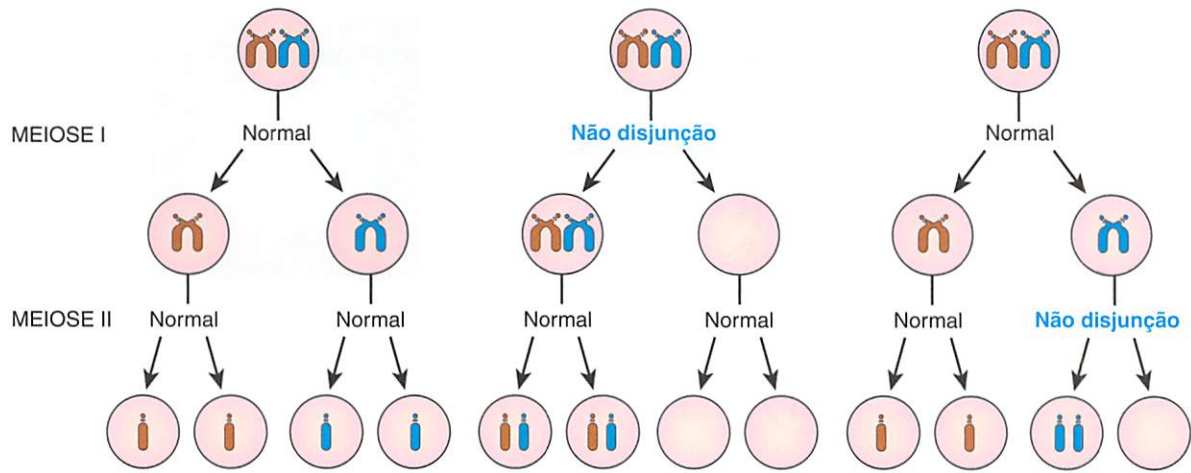


Figura 5-10 As diferentes consequências da não disjunção na meiose I (*centro*) e na meiose II (*à direita*), comparadas à disjunção normal (*à esquerda*). Se o erro ocorre em meiose I, os gametas ou contêm um representante de ambos os membros do par cromossômico 21 ou carecem de ambos os cromossomos 21. Se a não disjunção ocorre na meiose II, os gametas anormais contêm duas cópias de um cromossomo 21 parental (e nenhuma cópia do outro) ou carecem do cromossomo 21.

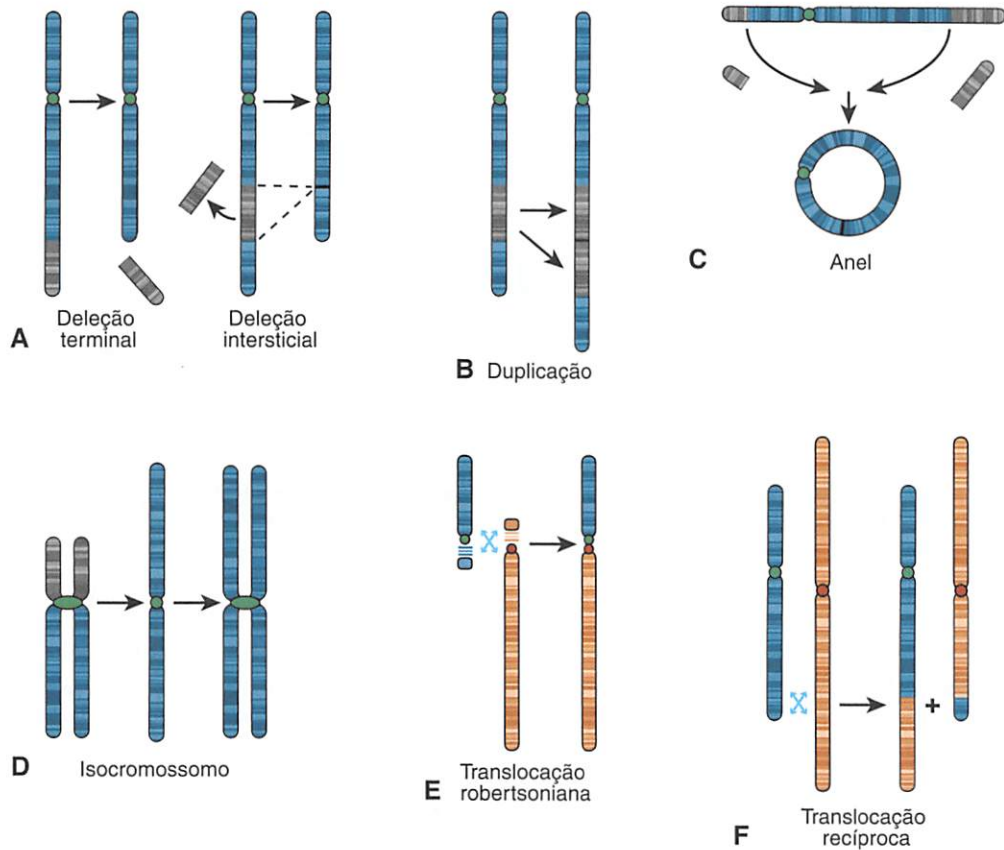


Figura 5-11 Rearranjos estruturais dos cromossomos, descritos no texto. A, Deleções terminal e intersticial, cada uma gerando um fragmento cromossômico acêntrico que é tipicamente perdido. B, Duplicação de um segmento cromossômico, levando à trissomia parcial. C, Cromossomo em anel com dois fragmentos acêntricos. D, Geração de um isocromossomo para o braço longo de um cromossomo. E, Translocação robertsoniana entre dois cromossomos acêntricos, frequentemente levando a um cromossomo pseudocêntrico. Translocações robertsonianas são não recíprocas, e os braços curtos dos acrocêntricos são perdidos. F, Translocação entre dois cromossomos, com troca recíproca de segmentos translocados.

Deleções e Duplicações. As deleções envolvem a perda de um segmento cromossômico, resultando em um desbalanço cromossômico (Fig. 5-11). Um portador de deleção cromossômica (com um homólogo normal e um homólogo com deleção) é monossômico para a informação genética no segmento correspondente do homólogo normal. As consequências clínicas geralmente refletem haploinsuficiência (literalmente, a incapacidade de uma única cópia do material genético realizar a função normal desempenhada pelas duas cópias), e, quando examinado, sua severidade reflete o tamanho do segmento ausente e o número e a função dos genes específicos que foram excluídos. Deleções autossômicas citogeneticamente visíveis têm uma incidência de cerca de um em 7.000 nativos. Deleções menores, submicroscópicas, detectadas pela análise de microarranjos, são muito mais comuns, porém, como mencionado anteriormente, o completo significado clínico de muitas dessas variações ainda está por ser determinado.

Uma deleção pode ocorrer na extremidade do cromossomo (**terminal**) ou ao longo do braço de um cromossomo (**intersticial**). As deleções podem se originar pela simples quebra cromossômica e perda do segmento acêntrico. Numerosas deleções têm sido identificadas durante o diagnóstico pré-natal ou na investigação de pacientes dismórficos ou de pacientes com deficiência intelectual, e exemplos específicos de tais casos serão discutidos no Capítulo 6.

Em geral, a duplicação parece ser menos prejudicial do que a deleção. Entretanto, uma vez que a duplicação em um gameta resulta em um desbalanço cromossômico (i.e., trissomia parcial), e uma vez que a quebra cromossômica que o gerou pode interromper genes, a duplicação frequentemente leva a alguma anomalia fenotípica.

Cromossomos Marcadores e em Anel. Cromossomos muito pequenos, não identificáveis, chamados de **cromossomos marcadores**, são ocasionalmente observados em preparações de cromossomos, com frequência em um estado de mosaico. Eles estão geralmente adicionados ao complemento cromossômico normal e são, portanto, referidos como **cromossomos supranumerários** ou **cromossomos extras estruturalmente anormais**. A frequência pré-natal de novos cromossomos marcadores supranumerários foi estimada em cerca de um em 2.500. Devido ao seu tamanho pequeno e indistinguível, a análise genômica de maior resolução é geralmente requerida para a identificação precisa.

Cromossomos marcadores maiores contêm material genômico de um ou ambos os braços cromossômicos, criando um desequilíbrio para quaisquer genes presentes. Dependendo da origem do cromossomo marcador, o risco de uma anomalia fetal pode variar de muito baixo a até 100%. Por razões não totalmente compreendidas, uma proporção relativamente alta de tais marcadores deriva do cromossomo 15 e dos cromossomos sexuais.

Muitos marcadores cromossômicos perdem o telômero e constituem **cromossomos em anel**, que são formados quando o cromossomo sofre duas quebras e as extremidades cromossômicas quebradas reúnem-se numa estrutura em anel (Fig. 5-11). Alguns desses anéis experimentam dificuldades durante a mitose, quando as duas cromátides-irmãs

tornam-se entrelaçadas durante sua tentativa de disjunção na anáfase. Nesses casos, podem acontecer quebras do anel seguidas de fusão, e anéis maiores e menores podem ser gerados. Devido a essa instabilidade mitótica, não é incomum encontrar cromossomos em anel em apenas uma proporção das células.

Isocromossomos. Um isocromossomo é um cromossomo no qual um dos braços está ausente e o outro é duplicado em forma de imagem espelhada (Fig. 5-11). Uma pessoa com 46 cromossomos carregando um isocromossomo, portanto, tem uma cópia única do material genético de um braço (monossomia parcial) e três cópias do material genético do outro braço (trissomia parcial). Embora já tenham sido descritos isocromossomos para vários autossomos, o isocromossomo mais comum envolve o braço longo do cromossomo X — designado i(X)(q10) — em uma proporção de indivíduos com síndrome de Turner (Cap. 6). Os isocromossomos são também encontrados frequentemente em cariótipos de tumores sólidos e neoplasias hematológicas malignas (Cap. 15).

Cromossomos Dicêntricos. Um cromossomo dicêntrico é um tipo raro de cromossomo anormal no qual dois segmentos cromossômicos, cada um com um centrômero, fundem-se pelas extremidades. Os cromossomos dicêntricos, apesar dos dois centrômeros, podem ser mitoticamente estáveis se um dos dois centrômeros for inativado epigeneticamente ou se os dois centrômeros sempre coordenarem seus movimentos para o mesmo polo durante a anáfase. Tais cromossomos são tipicamente chamados de **pseudodicêntricos**. Os cromossomos pseudodicêntricos mais comuns envolvem os cromossomos sexuais ou os cromossomos acrocêntricos (as chamadas translocações robertsonianas; veja adiante).

Rearranjos Balanceados

Os rearranjos cromossômicos balanceados são encontrados em um de cada 500 indivíduos (Fig. 5-8) e não costumam levar a um efeito fenotípico, pois todo o material genômico está presente, mesmo que organizado de forma diferente (Fig. 5-11). Como observado anteriormente, é importante distinguir entre o rearranjo *verdadeiramente* balanceado e aqueles que *parecem* citogeneticamente balanceados, mas que são, na realidade, desbalanceados em nível molecular. Devido à alta frequência de polimorfismo no número de cópias ao longo do genoma (Cap. 4), acrescentando coletivamente diferenças de muitas megabases entre os genomas de indivíduos não aparentados, o conceito do que é balanceado ou desbalanceado está sujeito a uma investigação permanente e a um aperfeiçoamento contínuo.

Mesmo quando os rearranjos estruturais são verdadeiramente balanceados, eles podem representar uma ameaça às gerações subsequentes, porque os portadores são mais suscetíveis a produzir uma frequência significativa de gametas desbalanceados e, portanto, têm um risco aumentado de ter uma prole anormal com cariótipos desbalanceados; dependendo do rearranjo específico, esse risco pode variar de 1% a 20%. Também existe a possibilidade de que uma das quebras cromossômicas interrompa um gene, levando a uma

mutação. Especialmente com o uso do sequenciamento de genoma completo para examinar a natureza aparentemente balanceada dos rearranjos em pacientes que apresentam fenótipos significativos, esta é uma causa de distúrbios cada vez mais bem documentada em portadores de translocações balanceadas (Cap. 6); tais translocações podem fornecer pistas úteis na identificação do gene responsável por um determinado distúrbio genético.

Translocações. A translocação envolve a troca de segmentos cromossômicos entre dois cromossomos. Existem dois tipos principais: a recíproca e a não recíproca.

Translocações Recíprocas. Este tipo de rearranjo resulta de quebra ou de recombinação envolvendo cromossomos não homólogos, com troca recíproca dos segmentos quebrados ou recombinados (Fig. 5-11). Normalmente, apenas dois cromossomos estão envolvidos, e uma vez que a troca é recíproca, o número total de cromossomos não é alterado. Tais translocações geralmente não possuem efeito fenotípico; no entanto, como ocorre em outros rearranjos estruturais balanceados, elas estão associadas a um maior risco de gametas desbalanceados e progênie anormal. Elas ficam aparentes durante o diagnóstico pré-natal ou quando os pais de uma criança clinicamente anormal com translocação desbalanceada são “cariotipados”. As translocações

balanceadas são mais comumente encontradas em casais que tiveram dois ou mais abortos espontâneos e em homens inférteis do que na população em geral.

A existência de translocações apresenta desafios para o processo de pareamento e recombinação dos cromossomos homólogos durante a meiose (Cap. 2). Quando os cromossomos de um portador de uma translocação recíproca balanceada pareiam-se na meiose, como mostrado na Figura 5-12, eles devem apresentar uma formação **quadrivalente** para assegurar o alinhamento apropriado das sequências homólogas (em vez das formações bivalentes típicas vistas nos cromossomos normais). Na segregação típica, dois dos quatro cromossomos na formação quadrivalente migram para cada polo da anáfase; no entanto, os cromossomos podem segregar-se de diferentes maneiras a partir dessa configuração, dependendo de qual dos cromossomos vai para cada polo. A **segregação alternada**, o tipo usual de segregação meiótica, produz gametas balanceados que têm tanto o complemento cromossômico normal como dois cromossomos recíprocos. Outros padrões de segregação, no entanto, sempre produzem gametas desbalanceados (Fig. 5-12).

Translocações Robertsonianas. As translocações robertsonianas são o tipo mais comum de rearranjo cromossômico observado na espécie humana e envolvem dois cromossomos

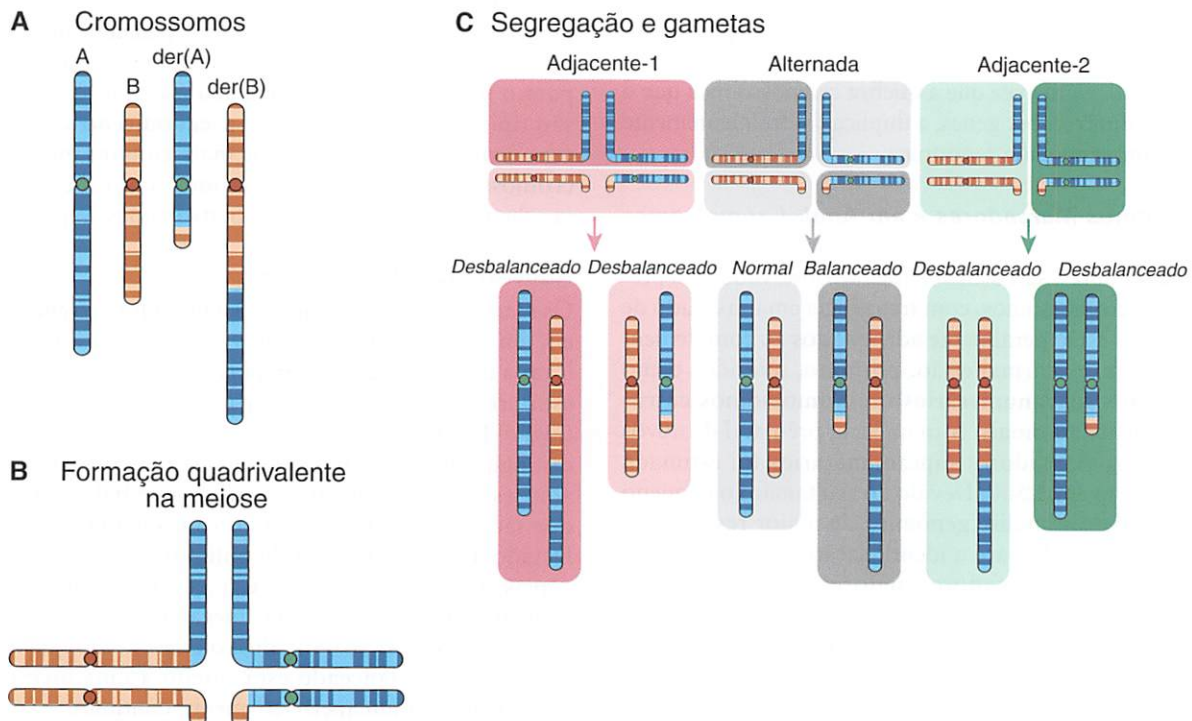


Figura 5-12 A, Diagrama ilustrando uma translocação balanceada entre dois cromossomos, envolvendo uma troca recíproca entre a parte distal dos braços longos dos cromossomos A e B. B, A formação quadrivalente na meiose é necessária para o alinhamento dos segmentos homólogos dos dois cromossomos derivados e de seus homólogos normais. C, Padrões de segregação em um portador de translocação, levando tanto a gametas balanceados quanto desbalanceados, mostrados embaixo. A segregação adjacente 1 (*em vermelho*, cromossomos de cima para um gameta, cromossomos de baixo para outro) leva apenas a gametas desbalanceados. A segregação adjacente 2 (*em verde*, cromossomos da esquerda para um gameta, cromossomos da direita para outro) também leva a gametas desbalanceados. Apenas a segregação alternada (*em cinza*, para um gameta, cromossomos em cima à esquerda, para outro, embaixo à direita) pode levar a gametas balanceados.

acrocêntricos que se fundem próximo à região do centrômero, com perda dos braços curtos (Fig. 5-11). Tais translocações são não recíprocas e resultam num cariótipo com apenas 45 cromossomos, incluindo o cromossomo translocado, o qual, na prática, é formado pelos braços longos dos dois cromossomos acrocêntricos. Como mencionado anteriormente, devido ao fato de os braços curtos de todos os cinco pares de cromossomos acrocêntricos consistirem basicamente em várias classes de DNA-satélite, bem como em centenas de cópias de genes de RNA ribossômico, a perda dos braços curtos de dois cromossomos acrocêntricos não é deletéria; dessa forma, o cariótipo é considerado como sendo balanceado, apesar de ter apenas 45 cromossomos. As translocações robertsonianas são tipicamente, embora nem sempre, pseudodicêntricas (Fig. 5-11), refletindo a localização do ponto de quebra em cada cromossomo acrocêntrico.

Embora as translocações robertsonianas possam envolver todas as combinações de cromossomos acrocêntricos, duas — designadas $rob(13;14)(q10;q10)$ e $rob(14;21)(q10;q10)$ — são relativamente comuns. As translocações envolvendo 13q e 14q são encontradas em uma a cada 1.300 pessoas e são, portanto, de longe, o rearranjo cromossômico mais comum em nossa espécie. Foram descritos indivíduos raros com duas cópias do mesmo tipo de translocação robertsoniana; esses indivíduos fenotipicamente normais possuem apenas 44 cromossomos e carecem de cópias normais dos acrocêntricos envolvidos, substituídos pelas duas cópias dos translocados.

Embora um portador de uma translocação robertsoniana seja fenotipicamente normal, existe um risco de gametas desbalanceados e, portanto, de prole desbalanceada. O risco para uma prole desbalanceada varia de acordo com a translocação robertsoniana em particular e o sexo do progenitor portador; mulheres portadoras em geral têm maior risco de transmitir a translocação para uma criança afetada. A principal importância clínica desse tipo de translocação é que portadores de translocações robertsonianas envolvendo o cromossomo 21 estão sob risco de terem uma criança com síndrome de Down por translocação, como será explorado adiante no Capítulo 6.

Inserções. Uma inserção é outro tipo de translocação não recíproca que ocorre quando um segmento é removido de um cromossomo e inserido em um cromossomo diferente, tanto em sua orientação usual com relação ao centrômero, quanto invertida. Uma vez que elas requerem três quebras cromossômicas, as inserções são relativamente raras. A segregação anormal em um portador de inserção pode produzir uma prole com duplicação ou deleção do segmento inserido, bem como uma prole normal e portadores balanceados. O risco médio de formar uma criança anormal pode ser superior a 50% e, portanto, o diagnóstico pré-natal é indicado.

Inversões. Uma inversão ocorre quando um único cromossomo sofre duas quebras e é reconstituído com o segmento invertido entre as quebras. As inversões são de dois tipos (Fig. 5-13): **paracêntrica**, na qual ambas as quebras ocorrem em um mesmo braço (do grego *para*, fora do centrômero); e **pericêntrica**, na qual ocorre uma quebra em cada um dos

braços (do grego *peri*, ao redor do centrômero). Pode ser mais fácil identificar as inversões pericêntricas citogeneticamente quando elas mudam a proporção dos braços cromossômicos, bem como o padrão de bandeamento.

Uma inversão normalmente não causa um fenótipo anormal no portador por ser um rearranjo balanceado. Seu significado clínico é importante para a progênie; um portador de um ou outro tipo de inversão tem risco de produzir gametas anormais que podem levar a uma prole desbalanceada, pois, quando uma inversão está presente, é necessária a formação de uma alça para permitir o alinhamento e o pareamento dos segmentos homólogos dos cromossomos normais e invertidos na meiose I (Fig. 5-13). Quando a recombinação ocorre dentro da alça, pode levar à produção de gametas desbalanceados: gametas com complemento cromossômico balanceado (normais ou que possuem a inversão) e gametas com complemento desbalanceado são formados, dependendo da localização dos eventos de recombinação. Quando uma inversão é paracêntrica, os cromossomos recombinados desbalanceados são acêntricos ou dicêntricos e tipicamente não levam à descendência viável (Fig. 5-13); portanto, o risco do portador de uma inversão paracêntrica ter um filho com cariótipo anormal é realmente muito baixo.

Uma inversão pericêntrica, por outro lado, pode levar à produção de gametas desbalanceados, tanto com **duplicação** quanto com **ausência** de segmentos cromossômicos (Fig. 5-13). Os segmentos duplicados e ausentes são os segmentos distais à inversão. Geralmente, o risco de um portador de uma inversão pericêntrica ter uma criança com cariótipo desbalanceado é estimado em 5% a 10%. Cada inversão pericêntrica, no entanto, está associada a um determinado risco, refletindo tipicamente o tamanho e o conteúdo do segmento duplicado ou ausente.

Mosaicismo para Anomalias Cromossômicas

Quando uma pessoa possui uma anomalia cromossômica, seja numérica ou estrutural, a anomalia está normalmente presente em todas as suas células. Algumas vezes, no entanto, dois ou mais complementos cromossômicos diferentes estão presentes no mesmo indivíduo; essa situação é denominada **mosaicismo**. O mosaicismo é usualmente detectado pela cariotipagem convencional, mas também pode ser suscitado com base na análise de FISH em interfases ou nos microarranjos cromossômicos.

Uma causa comum de mosaicismo é a não disjunção nas divisões mitóticas pós-zigóticas iniciais. Por exemplo, um zigoto com um cromossomo 21 adicional pode perder esse cromossomo extra em uma divisão mitótica e continuar se desenvolvendo como mosaico 46/47,+21. Os efeitos do mosaicismo no desenvolvimento variam em função do momento em que ocorre o evento de não disjunção, da natureza da anomalia cromossômica, da proporção dos diferentes complementos cromossômicos presentes e dos tecidos afetados. Acredita-se frequentemente que indivíduos que são mosaicos para uma determinada trissomia, como o mosaico da síndrome de Down ou da síndrome de Turner, são menos severamente afetados do que indivíduos não mosaicos.

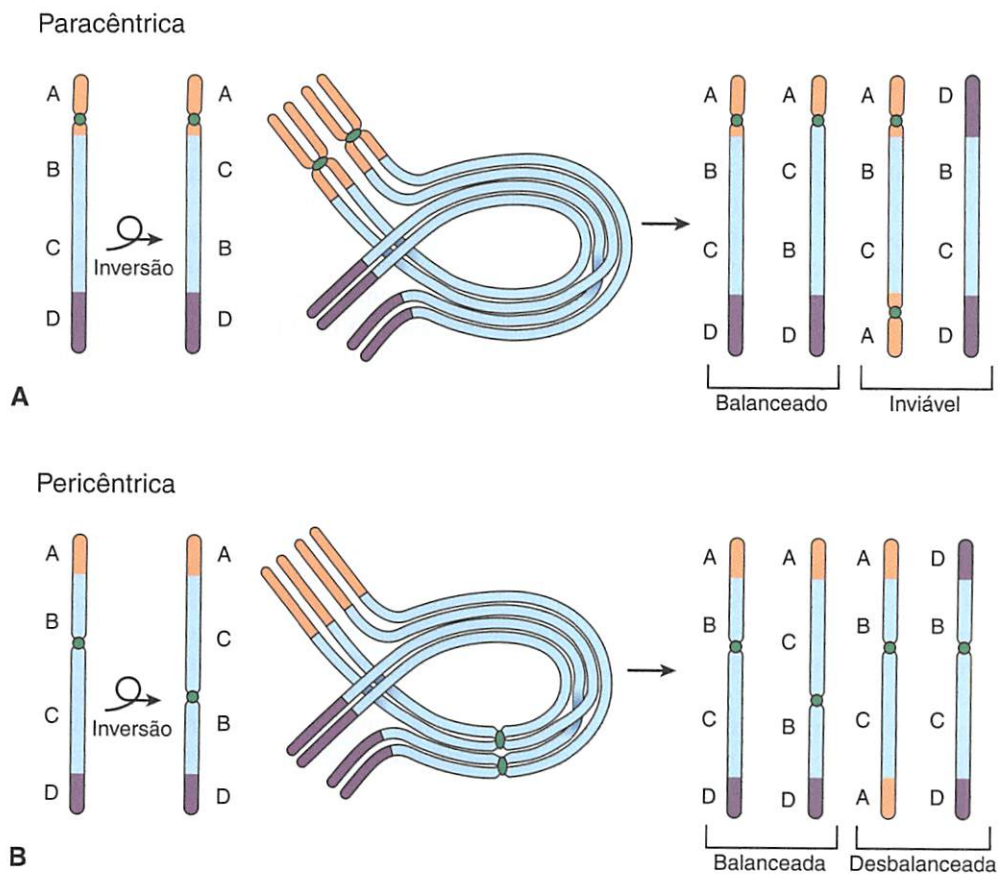


Figura 5-13 *Crossing over* com alças de inversão formadas na meiose I em portadores de um cromossomo com segmento B-C invertido (ordem A-C-B-D, em vez da ordem normal A-B-C-D). A, Inversão paracêntrica. Os gametas formados após a segunda meiose geralmente contêm tanto uma cópia normal (A-B-C-D) quanto uma cópia balanceada (A-C-B-D) do cromossomo porque os produtos acêntricos e dicêntricos do *crossover* são inviáveis. B, Inversão pericêntrica. Os gametas formados após a segunda meiose podem ser balanceados (normais ou invertidos) ou desbalanceados. Os gametas desbalanceados contêm uma cópia do cromossomo com uma duplicação ou com ausência de material que flanqueia o segmento invertido (A-B-C-A ou D-B-C-D).

Quando detectado em linfócitos, em linhagens de células em cultura ou em amostras pré-natais, pode ser difícil acessar a significância do mosaïcismo, especialmente se identificado no pré-natal. As proporções dos diferentes complementos cromossômicos observados no tecido em análise (p. ex., cultura de amniócitos ou linfócitos) pode não refletir necessariamente as proporções presentes em outros tecidos ou no embrião durante seus estágios de desenvolvimento iniciais. O mosaïcismo também pode surgir em células em cultura após elas terem sido retiradas do indivíduo; assim, os citogeneticistas tentam diferenciar entre o **verdadeiro mosaïcismo**, presente no indivíduo, do **pseudomosaïcismo**, que ocorreu no laboratório. A distinção entre esses tipos nem sempre é fácil ou correta, podendo levar a grandes dificuldades interpretativas no diagnóstico pré-natal (Quadro anterior e o Cap. 17).

Incidência das Anomalias Cromossômicas

A incidência dos diferentes tipos de alterações cromossômicas tem sido mensurada em várias pesquisas com populações

grandes e foi resumida anteriormente na Figura 5-8. Os principais distúrbios numéricos observados em nativos são três trissomias autossômicas (trissomia do 21, trissomia do 18 e trissomia do 13) e quatro tipos de aneuploidia dos cromossomos sexuais: a síndrome de Turner (geralmente 45,X), a síndrome de Klinefelter (47,XXY), 47,XYY e 47,XXX (Cap. 6). A triploidia e a tetraploidia são responsáveis por apenas uma pequena porcentagem dos casos, particularmente nos abortos espontâneos. A classificação e a incidência de defeitos cromossômicos mensuradas nessas pesquisas podem ser utilizadas para considerar o destino de 10.000 conceitos, como apresentado na Tabela 5-2.

Nativos

Como mencionado anteriormente, acredita-se que a incidência geral de anomalias cromossômicas em recém-nascidos seja de cerca de um a cada 154 nascimentos (0,65%) (Fig. 5-8). A maioria das anomalias dos autossomos pode ser diagnosticada ao nascimento, mas muitas anomalias cromossômicas sexuais, com exceção da síndrome de Turner, não são reconhecidas clinicamente até a puberdade (Cap. 6).

TABELA 5-2 Resultado de 10.000 Gestações*

Resultado	Gestações	Abortos Espontâneos (%)	Nativos
Total	10.000	1.500 (15)	8.500
Cromossomos normais	9.200	750 (8)	8.450
Cromossomos anormais	800	750 (94)	50
Anormalidades Específicas			
Triploidia ou tetraploidia	170	170 (100)	0
45,X	140	139 (99)	1
Trissomia do 16	112	112 (100)	0
Trissomia do 18	20	19 (95)	1
Trissomia do 21	45	35 (78)	10
Outras trissomias	209	208 (99,5)	1
47,XXY, 47,XXX, 47,XYY	19	4 (21)	15
Rearranjos desbalanceados	27	23 (85)	4
Rearranjos balanceados	19	3 (16)	16
Outros	39	37 (95)	2

*Essas estimativas são baseadas nas frequências observadas de anomalias cromossômicas em abortos espontâneos e crianças nativas. É provável que a frequência de anomalias cromossômicas em todos os conceitos seja bem mais alta do que isso, pois muitos são abortados de modo espontâneo antes que sejam identificados clinicamente.

Os rearranjos desbalanceados são mais prováveis de chamar atenção clínica por causa de sua aparência anormal e do atraso de desenvolvimento físico e mental em indivíduos com anomalias cromossômicas. Em contraste, os rearranjos balanceados raramente são identificados clinicamente, a menos que um portador de um rearranjo tenha uma criança com complemento cromossômico desbalanceado e sejam iniciados estudos familiares.

Abortos Espontâneos

A frequência total de anormalidades cromossômicas em abortos espontâneos é de, pelo menos, 40% a 50%, e os tipos de anomalias diferem de diversas maneiras daqueles observados em nativos. Surpreendentemente, a anomalia mais comum em abortos é o cariótipo 45,X (a mesma anomalia encontrada na síndrome de Turner), o qual responde por cerca de 20% dos abortos espontâneos cromossômicamente anormais, mas por menos de 1% dos nativos com anomalias cromossômicas (Tabela 5-2). Outra diferença está na distribuição dos tipos de trissomias; por exemplo, a trissomia do 16 nunca é vista em nativos, mas é responsável por aproximadamente um terço das trissomias em abortos.

ANÁLISE CROMOSSÔMICA E GENÔMICA NO CÂNCER

Este capítulo focou nas anomalias cromossômicas constitucionais que são encontradas na maior parte ou em todas as células do corpo e derivam de mutações cromossômicas ou regionais que tenham sido transmitidas pelos pais (herdadas ou ocorrendo *de novo* na linhagem germinativa de um dos pais) ou que tenham ocorrido nas divisões mitóticas iniciais do zigoto.

No entanto, essas mutações também podem acontecer em células somáticas ao longo da vida e são marcadores de câncer, tanto em neoplasias hematológicas (p. ex., leucemias e linfomas) quanto no contexto da progressão de tumores sólidos. Uma área importante nas pesquisas de câncer é o delineamento das mudanças cromossômicas e genômicas em tipos específicos de câncer e a relação dos pontos de quebra dos diferentes rearranjos estruturais para o processo da oncogênese. As mudanças cromossômicas e genômicas encontradas em células cancerígenas são numerosas e diversificadas. A associação das análises citogenética e genômica com o tipo de tumor e com a eficácia da terapia já é uma parte importante do manejo de pacientes com câncer; estes serão discutidos no Capítulo 15.

REFERÊNCIAS GERAIS

- Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG: *Chromosome abnormalities and genetic counseling*, ed 4, Oxford, England, 2012, Oxford University Press.
- Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, editors: *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature*, Basel, 2013, Karger.
- Trask B: Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting, *Nature Rev Genet* 3:769-778, 2002.

REFERÊNCIAS PARA TÓPICOS ESPECÍFICOS

- Baldwin EK, May LF, Justice AN, et al: Mechanisms and consequences of small supernumerary marker chromosomes, *Am J Hum Genet* 82:398-410, 2008.
- Coulter ME, Miller DT, Harris DJ, et al: Chromosomal microarray testing influences medical management, *Genet Med* 13:770-776, 2011.
- Dan S, Chen F, Choy KW, et al: Prenatal detection of aneuploidy and imbalanced chromosomal arrangements by massively parallel sequencing, *PLoS ONE* 7:e27835, 2012.
- Debatisse M, Le Tallec B, Letessier A, et al: Common fragile sites: mechanisms of instability revisited, *Trends Genet* 28:22-32, 2012.
- Fantes JA, Boland E, Ramsay J, et al: FISH mapping of *de novo* apparently balanced chromosome rearrangements identifies characteristics associated with phenotypic abnormality, *Am J Hum Genet* 82:916-926, 2008.
- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, et al: DECIPHER: database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using Ensembl resources, *Am J Hum Genet* 84:524-533, 2009.
- Green RC, Rehm HL, Kohane IS: Clinical genome sequencing. In Ginsburg GS, Willard HF, editors: *Genomic and personalized medicine*, ed 2, New York, 2013, Elsevier, pp 102-122.
- Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, et al: Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the Developmental Genome Anatomy Project, *Am J Hum Genet* 82:712-722, 2008.
- Kearney HM, South ST, Wolff DJ, et al: American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities, *Genet Med* 13:676-679, 2011.
- Ledbetter DH, Riggs ER, Martin CL: Clinical applications of whole-genome chromosomal microarray analysis. In Ginsburg GS, Willard HF, editors: *Genomic and personalized medicine*, ed 2, New York, 2013, Elsevier, pp 133-144.
- Lee C: Structural genomic variation in the human genome. In Ginsburg GS, Willard HF, editors: *Genomic and personalized medicine*, ed 2, New York, 2013, Elsevier, pp 123-132.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al: Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies, *Am J Hum Genet* 86:749-764, 2010.

Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA: Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem, *Nat Rev Genet* 13:493-504, 2012.

Reddy UM, Page GP, Saade GR, et al: Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth, *N Engl J Med* 367:2185-2193, 2012.

Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, et al: Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research, *Am J Hum Genet* 88:469-481, 2011.

PROBLEMAS

1. Você envia uma amostra de sangue de uma criança dismórfica para o laboratório de análise cromossômica. O relatório do laboratório afirma que o cariótipo da criança é 46,XY,del(18)(q12).
 - a. O que este cariótipo significa?
 - b. O laboratório solicita amostras de sangue dos pais clinicamente normais para análise. Por quê?
 - c. O laboratório informa o cariótipo da mãe como 46,XX e o do pai como 46,XY,t(7;18)(q35;q12). O que o segundo cariótipo significa? Recorrendo aos ideogramas normais dos cromossomos, na Figura 5-2, esquematize o(s) cromossomo(s) translocado(s) no pai e no seu filho. Esquematize esses cromossomos na meiose paterna. Quais tipos de gametas podem ser produzidos?
 - d. À luz dessa nova informação, o que o cariótipo da criança significa agora? Quais regiões são monossômicas? Trissômicas? Dada as informações dos Capítulos 2 e 3, estime o número de genes presentes nas regiões trissômica e monossômica.
 2. Um feto abortado espontaneamente apresenta trissomia do 18.
 - a. Qual a proporção de fetos com trissomia do 18 são perdidos por aborto espontâneo?
 - b. Qual é o risco de os pais terem um recém-nascido com trissomia do 18 em uma gestação futura?
 3. No cariótipo de um recém-nascido com síndrome de Down são encontradas duas linhagens celulares: 70% das suas células possuem o cariótipo típico 47,XX,+21, e 30% são 46,XX normais. Quando foi que o evento de não disjunção provavelmente ocorreu? Qual o prognóstico para essa criança?
 4. Qual das seguintes pessoas é ou se espera que seja uma pessoa fenotipicamente normal?
 - a. Uma mulher com 47 cromossomos, incluindo um pequeno cromossomo supranumerário derivado da região centromérica do cromossomo 15
 - b. Uma mulher com cariótipo 47,XX,+13
 - c. Um homem como deleção de uma banda no cromossomo 4
 - d. Uma pessoa com translocação recíproca balanceada
 - e. Uma pessoa com inversão pericêntrica do cromossomo 6
- Quais tipos de gametas cada um desses indivíduos pode produzir? Quais tipos de prole podem resultar, assumindo que o outro genitor é cromossomicamente normal?
5. Para cada situação que se segue, responda quando a análise genômica ou cromossômica é indicada. Para quais membros da família, se houver algum? Para que tipo de anomalia cromossômica a família, em cada caso, pode estar sob risco?
 - a. Uma mulher grávida com 29 anos e seu marido com 41 anos, sem história de defeitos genéticos
 - b. Uma mulher grávida com 41 anos e seu marido com 29 anos, sem história de defeitos genéticos
 - c. Um casal cujo único filho tem síndrome de Down
 - d. Um casal cujo único filho tem fibrose cística
 - e. Um casal que tem dois meninos com deficiência intelectual severa
 6. Explique a natureza da anomalia cromossômica e o método de detecção indicado para as nomenclaturas seguintes.
 - a. inv(X)(q21q26)
 - b. 46,XX,del(1)(qter → p36.2:)
 - c. 46,XX,ish del(15)(q11.2q11.2)(SNRPN-,D15S10-)
 - d. 46,XX,del(15)(q11q13).ishdel(15)(q11.2q11.2)(SNRPN-,D15S10-)
 - e. 46,XX,arr cgh 1p36.3(RP11-319A11,RP11-58A11,RP11-92O17) × 1
 - f. 47,XY,+mar.ish r(8)(D8Z1+)
 - g. 46,XX,rob(13;21)(q10;q10),+21
 - h. 45,XY,rob(13;21)(q10;q10)
 7. Utilizando o sistema de nomenclatura da Tabela 5-1, descreva os “cariótipos moleculares” que correspondem aos dados de microarranjo nas Figuras 5-6C e 5-9C.
 - a. Referindo-se à Figura 5-6C, o indivíduo de quem resulta o arranjo é homem ou mulher? Como você sabe?
 - b. Referindo-se à Figura 5-9C, o indivíduo de quem resulta o arranjo é homem ou mulher? Como você sabe?