



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Catarina Matos de Sousa

**O IMPACTO DO DIAGNÓSTICO
CITOGENÉTICO NUM HOSPITAL TERCIÁRIO**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Genética Clínica
Laboratorial orientada pela Professora Doutora Eunice Maria
Ruas de Campos Matoso e pela Professora Doutora Isabel
Marques Carreira e apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra**

Setembro de 2022

Ana Catarina Matos de Sousa

O IMPACTO DO DIAGNÓSTICO CITOGÉNÉTICO NUM HOSPITAL TERCIÁRIO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial orientada pela Professora Doutora Eunice Maria Ruas de Campos Matoso e pela Professora Doutora Isabel Marques Carreira e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



2022

Agradecimentos

A todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes na realização deste trabalho e o tornaram possível, o meu agradecimento pessoal.

À minha orientadora, Professora Doutora Eunice Maria Ruas de Campos Matoso, pelo incentivo, disponibilidade e apoio incansável durante toda a realização deste trabalho. As suas orientações a nível científico e profissional, foram fundamentais, contribuindo para o enriquecimento desta dissertação e acima de tudo para a minha formação académica, profissional e evolução pessoal. Pela inspiração e empenho ao longo deste ano, a minha eterna gratidão.

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, o meu sincero agradecimento pela orientação e revisão científica no desenvolvimento deste trabalho. Pelo exemplo, inspiração e ensinamentos ao longo de todo este percurso.

À Doutora Alexandra Estevinho do Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra, onde desenvolvi o meu projeto, a minha eterna gratidão pela seu apoio, auxílio, disponibilidade e consideração durante o desenvolvimento deste projeto.

Um agradecimento especial à minha mãe e ao meu irmão, por serem os meus pilares e estarem presentes em todos os momentos. À minha família, pelo incentivo e dedicação, para que mais um objetivo fosse realizado. Por acreditarem em mim, o meu profundo e eterno agradecimento.

Índice

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	10
RESUMO	13
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	17
1.1 A CITOGÉNÉTICA NO DIAGNÓSTICO CLÍNICO	17
1.1.1 O nascimento da citogenética – perspetiva histórica	17
1.1.2 A Citogenética Convencional	20
1.1.3 A Citogenética Molecular e a Genómica	21
1.2 ORIGEM E CONSEQUÊNCIAS DAS CROMOSSOMOPATIAS	29
1.2.1 Alterações numéricas	30
1.2.1.1 Alterações numéricas nos autossomas	31
1.2.1.2 Alterações numéricas dos cromossomas sexuais	32
1.2.2 Alterações estruturais	34
1.2.2.1 Alterações cromossómicas estruturais equilibradas	35
1.2.2.2 Alterações cromossómicas estruturais desequilibradas	41
1.3 PATOLOGIAS CROMOSSÓMICAS NA REPRODUÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO	44
1.3.1 Os problemas reprodutivos e o portador de um rearranjo	44
1.3.1.1 Na infertilidade primária	45
1.3.1.2 Na infertilidade secundária	47

1.3.2 A criança com problemas do desenvolvimento	47
1.3.2.1 Perturbações do desenvolvimento e distúrbios endócrino	48
1.3.2.2 Défice intelectual e malformações congénitas	49
1.4 DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO NA ATIVIDADE ASSISTENCIAL DO HOSPITAL TERCIÁRIO	50
1.5 OBJETIVOS DESTE ESTUDO	51
CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 GRUPO DE ESTUDO – DISTRIBUIÇÃO PELA INDICAÇÃO CLÍNICA	52
2.2 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	52
2.2.1 Cultura sincronizada de linfócitos para obtenção de prometafases	53
2.2.2 Bandagem dos cromossomas	55
2.2.3 Análise ao microscópio	57
CAPÍTULO III - RESULTADOS	59
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO	71
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	78
APÊNDICE 1	81
BIBLIOGRAFIA	95

Lista de Figuras, tabelas e gráficos

Figura 1 - Cariograma humano com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo feminino com cariótipo 46,XX [ISCN, 2020]	18
Figura 2 - Imagens representativas das diversas aplicações da FISH na deteção de alterações	23
Figura 3 – Esquema representativo da técnica de MLPA	26
Figura 4 – Procedimento da técnica de array-CGH	27
Figura 5 - Resultado de ArrayCGH de um doente com síndrome de Prader Willi por deleção no cromossoma 15	28
Figura 6 - Alças de inversão formadas na meiose I por crossing-over	37
Figura 7 - Mecanismos de segregação 2:2 e 3:1 na gametogénese de um indivíduo portador de translocação	39
Figura 8 - Possíveis mecanismos de formação das Translocações Robertsonianas	40
Figura 9 - Cariograma humano de um indivíduo com Síndrome de Klinefelter com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 47,XXY [ISCN, 2020]	64
Figura 10 - Cariograma humano de um indivíduo com Síndrome de Turner com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo feminino com cariótipo 45,X [ISCN, 2020]	65
Figura 11 - Cariograma humano de um indivíduo com Síndrome de triplo X com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo feminino com cariótipo 47,XXX [ISCN, 2020]	66
Figura 12 - Cariograma humano de um indivíduo com Síndrome de Down com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 47,XY,+21 [ISCN, 2020]	68
Figura 13 - Cariograma humano com uma translocação Robertsoniana com um padrão de bandas GTL. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 45,XY,der(13;14)(q10q10) [ISCN, 2020]	70

Lista de Figuras, tabelas e gráficos

Tabela 1 - Distribuição do total dos 301 casos pelos diferentes tipos de cromossomopatias no total dos 3357 cariótipos realizados	60
Tabela 2 - Frequência dos diferentes tipos de cromossomopatias detetadas nos 3 grupos etiológicos estudados, com divisão do grupo dos indivíduos com problemas reprodutivos em infertilidade primária e infertilidade secundária	61
Tabela 3 - Incidência de cada tipo de cromossomopatia em casais/utentes do sexo masculino e feminino com infertilidade primária	64
Tabela 4 - Incidência de cada tipo de alteração encontrada nos casais com abortos, casais com nado/feto anterior com malformado e infertilidade secundária em mulheres (POF)	65
Tabela 5 - Incidência de cada tipo de alteração nos indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino	67
Tabela 6 - Incidência de cada tipo de alteração encontrada nos indivíduos para estudo familiar por portador de cromossomopatia	70
Tabela 7 - Incidência das alterações encontradas separadamente em indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino	82
Tabela 8 - Incidência das alterações encontradas em indivíduos por suspeita de síndrome	83
Tabela 9 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade primária - casal	84
Tabela 10 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade primária de causa masculina	85
Tabela 11 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade primária de causa feminina	86
Tabela 12 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade secundária - abortos e fetos malformados	87
Tabela 13 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade secundária – mulher POF	88

Tabela 14 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com problemas do desenvolvimento e malformações	89
Tabela 15 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com distúrbios do crescimento	90
Tabela 16 – Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com distúrbios endócrinos	91
Tabela 17 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos por suspeita de síndrome	92
Tabela 18 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com distúrbios neurológicos e epilepsia	93
Tabela 19 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos para estudo familiar por portador de cromossomopatia	94

Lista de Figuras, tabelas e gráficos

Gráfico 1 - Distribuição dos casos analisados por grupos, de acordo com a informação clínica de cada utente. Grupo 1: Indivíduos com problemas reprodutivos; Grupo 2: Indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino e Grupo 3: Indivíduos em contexto de estudos familiares 59

Gráfico 2 - Incidência das alterações encontradas em indivíduos com problemas reprodutivos dentro do grupo e dentro do grupo destes indivíduos com cromossomopatias 62

Gráfico 3 - Frequência das causas de infertilidade em indivíduos com problemas reprodutivos 63

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

Add Material adicional

ADPM Atraso de desenvolvimento psicomotor

AE Abortos espontâneos

array-CGH *array-based Comparative Genomic Hybridization*

BAC Bacterial Artificial Chromosome

bp par de bases

CBG Centromeric heterochromatin staining

CGH *Comparative Genomic Hybridization*

del deleção

DI Défice intelectual

DNA Ácido desoxirribonucleico

der cromossoma derivativo

dup duplicação

FBS Fetal Bovine Serum

FISH *Fluorescence in situ Hybridization*

Fra Regiões frágeis

GTG G-bands by trypsin using Giemsa

GTL G-bands by trypsin using Leishman

ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature

M-FISH Multicolor Fluorescence in situ Hybridization

mar cromossoma marcador

Mb Megabase

MCB Multicolor Chromosome Banding

MLPA Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MTX Metotrexato

NGS Next Generation Sequencing

NOR Nucleolus Organizing Region

OAT Oligoastenoteratospermia

OMS Organização Mundial de Saúde

Opas Organização Pan-Americana da Saúde

PAC P1 Artificial Chromosome

PCR Polymerase Chain Reaction

PMA Procriação medicamente assistida

POF Falência ovárica prematura

rpm rotações por minuto

SNP Single Nucleotide Polymorphism

SKY Spectral Karyotyping

Resumo

A citogenética humana surgiu no século XIX, no entanto foi na segunda metade do século XX que se deu pela primeira vez a sua associação à clínica. A descoberta da alteração cromossómica numérica como causa de patologia na Síndrome de Down, juntamente com a necessidade de descobrir a origem de outras patologias que ocorrem durante a gestação e/ou ao longo da vida do indivíduo, motivou o desenvolvimento da citogenética clínica laboratorial, permitindo que várias outras síndromes de origem cromossómica fossem identificadas. Estas alterações podem ocorrer *de novo* no indivíduo ou serem herdadas. As alterações cromossómicas podem ser numéricas, se a anomalia envolver a perda ou ganho de cromossomas, ou estruturais se alterarem a organização de um cromossoma em resultado de rearranjos na sua estrutura.

O desenvolvimento de novas tecnologias, juntamente com a necessidade de melhorar os padrões de resolução da citogenética convencional (3-10 Mb), levou ao nascimento de novas técnicas moleculares. As metodologias de citogenética molecular e biologia molecular com grande capacidade de resolução como a técnica de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), o *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e o *array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH), permitem uma maior resolução na deteção das alterações cromossómicas. Embora muito vantajosas, as técnicas moleculares também apresentam limitações que foram parcialmente ultrapassadas com o nascimento da genómica. O desenvolvimento das técnicas de sequenciação massiva, designada Next Generation Sequencing (NGS), permite hoje detetar alterações a larga escala com várias aplicações, não só ao nível do diagnóstico de patologias, mas também na oncologia e na medicina de precisão.

O principal objetivo deste trabalho é a avaliação retrospectiva dos resultados das análises realizadas em 3357 casos clínicos, no Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra, obtida através do levantamento de bases de dados internas. Os dados anonimizados foram organizados de acordo com os achados clínicos em: Indivíduos com problemas reprodutivos, Indivíduos com malformações e problemas do crescimento/desenvolvimento e/ou endócrino e

Indivíduos para estudos familiares por portador de cromossomopatia. Posteriormente fez-se a correlação entre o quadro clínico (fenótipo) com os resultados patológicos (genótipo) tendo por base a literatura. No número total de casos analisados, foram encontradas 301 amostras com alterações, sendo que 161 doentes apresentaram alterações numéricas (53,7%), 67 associadas a mosaicismo, 135 revelaram alterações estruturais (45,3%) e apenas 5 indivíduos apresentaram alterações dos gonossomas discordantes de fenótipo (<1%).

A citogenética convencional continua a ser essencial na resposta à procura etiológica das diversas patologias, desde o período Pré ao Pós-natal, embora as técnicas moleculares sejam cada vez mais requisitadas. É solicitada sobretudo em casos de portadores de alterações equilibradas (associados ou não a distúrbios reprodutivos), assim como nas perturbações do desenvolvimento ligadas aos cromossomas sexuais. Permanece também como teste de segunda linha para a caracterização de rearranjos cromossómicos e é fundamental nas situações de mosaicismo. Continua a ser uma área fundamental na interpretação dos mecanismos biológicos associados aos rearranjos cromossómicos e ao risco de recorrência familiar.

Palavras-chave: Citogenética convencional, anomalias cromossómicas numéricas, anomalias cromossómicas estruturais, cariótipo, pós-natal

Abstract

Human cytogenetics appeared in the 19th century, however it was in the second half of the 20th century that was associated with the clinic. The discovery of numerical chromosome alteration as a cause of pathology in Down Syndrome, together with the need to discover the origin of other pathologies that occur during pregnancy and/or through the individual's life, motivated the development of clinical laboratory cytogenetics, allowing several other syndromes of chromosome origin to be identified. Chromosomal abnormalities can be numerical, if the abnormality involves the loss or gain of chromosomes, or structural if they modify the organization of a chromosome as a result of rearrangements in its structure.

The development of new technologies, together with the need to improve the resolution standards of conventional cytogenetics (3-10 Mb), has led to the birth of new molecular techniques. High resolution molecular cytogenetic and molecular biology methodologies such as Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) allow for higher resolution in the detection of chromosomal abnormalities. Although very advantageous, molecular techniques also have limitations that have been overcome with the birth of genomics. The development of massive sequencing techniques, known as Next Generation Sequencing (NGS), now allows the detection of large-scale changes with various applications, not only in the diagnosis of pathologies, but also in oncology and precision medicine.

The main objective of this work is the retrospective evaluation of the results of the analyses performed in 3357 clinical cases in the Cytogenetics Laboratory of the Genetics Department of Coimbra Children's Hospital, obtained from internal databases. The anonymized data were organized according to clinical findings into: Individuals with reproductive problems, Individuals with malformations and growth/developmental and/or endocrine problems, and Individuals for family studies by chromosomal carrier. After that, the correlation between the clinical profile (phenotype) and the pathological results (genotype) was made based on the literature. In the total number of cases analyzed, 301 samples with alterations were found, 161 patients presented numerical

alterations (53.7%), 67 associated with mosaicism, 135 revealed structural alterations (45.3%) and only 5 individuals presented gonosome alterations discordant with the phenotype (<1%).

Conventional cytogenetics continues to be essential in the answer to the etiological search for various pathologies, from the prenatal to the postnatal period, although molecular techniques are increasingly in demand. It is mainly requested in cases of carriers of balanced alterations (associated or not with reproductive disorders), as well as in developmental disorders linked to sex chromosomes. It also remains a second-line test for the characterization of chromosomal rearrangements and is essential in situations of mosaicism. It remains a fundamental area in the interpretation of the biological mechanisms associated with chromosomal rearrangements and the risk of familiar recurrence.

Keywords: conventional cytogenetics, numerical chromosomal abnormalities, structural chromosomal abnormalities, karyotype, postnatal

Capítulo I – Introdução

1.1 A citogenética no diagnóstico clínico

No início dos anos 60, apesar da sua importância na biologia, a genética tinha ainda pouca relevância para a comunidade médica e portanto a relação entre estas duas disciplinas não estava ainda estabelecida. Com o nascimento da citogenética humana e o diagnóstico da primeira síndrome associada a uma aneuploidia, a Síndrome de Down, esta área da genética ganha particular relevo no diagnóstico clínico.

As alterações cromossómicas são hoje a causa etiológica conhecida de várias síndromes, estão na origem de cerca de 50% dos abortos espontâneos e em 20% dos nascimentos de nados vivos com cariótipos anormais (Gardner, R. J. M. et al., 2004). A citogenética convencional diz respeito ao estudo do genoma de um organismo, sendo que as metafases evidenciam um padrão de bandas diferencial e característico que permite o estudo das alterações presentes no genoma com uma resolução que pode atingir as 3-5Mb. A análise do número e estrutura cromossómica e a correlação das características fenotípicas com o genótipo do indivíduo, levou a que a área da citogenética ganhasse particular relevo no diagnóstico pré e pós-natal de alterações genéticas. O estudo do cariótipo constitucional continua a ser essencial no diagnóstico citogenético de indivíduos com problemas reprodutivos, indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino e indivíduos em contexto de estudos familiares.

1.1.1 O nascimento da citogenética – perspectiva histórica

A Citogenética Humana iniciou-se em 1882, com Walther Flemming a publicar pela primeira vez estudos de uma porção do núcleo corado e visível ao microscópio, a que deu o nome de cromatina (Flemming, 1882). Apenas em 1888, Heinrich Von Waldeyer designou estas estruturas como “cromossomas”. A palavra cromossoma, deriva do grego *chroma* que significa cor, e *soma* que significa corpo, assim nasceu a denominação de corpo corado/colorido (Waldeyer, 1888). O conceito de gene surgiu anos mais tarde, quando Theodor Boveri e Walter Sutton, os descreveram como sendo

os fatores responsáveis pela hereditariedade (Boveri, 1902; Sutton, 1903). Deram-se assim os primeiros passos para que Sutton pudesse combinar as disciplinas de citologia e genética, nascendo assim a citogenética humana, definida como o estudo da estrutura, função e evolução dos cromossomas.

A impossibilidade de estabelecer culturas celulares de mamíferos e a baixa qualidade do espalhamento das culturas estudadas, constituiu um entrave à evolução da citogenética (Trask B.J., 2002). A partir dos estudos citogenéticos publicados em 1923 por Thomas Painter, o complemento cromossómico de células humanas compreendia equivocadamente um total de 48 cromossomas por célula. O ano de 1956 foi crucial no desenvolvimento da citogenética. A descoberta accidental do choque hipotónico, promovendo a turgescência das células e consequentemente a dispersão dos cromossomas, permitiu assim a Joe Hin Tjio e Albert Levan provar que o número exato do complemento cromossómico humano é de 46 cromossomas por célula (Ford e Hamerton, 1956).



Figura 1 - Cariograma humano com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo feminino com cariótipo 46,XX [ISCN, 2020] (Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra).

A partir do momento em que o número correto de cromossomas foi estabelecido, os estudos citogenéticos permitiram as primeiras associações entre

patologias e anomalias cromossómicas. Jérôme Lejeune e os seus colaboradores, em 1959, observaram pela primeira vez um cromossoma extra em metafases obtidas na cultura de fibroblastos de indivíduos com Síndrome de Down (Lejeune et al., 1959). Após esta descoberta, outras patologias cromossómicas envolvendo os cromossomas sexuais, como a Síndrome de Turner (45,X) (Ford et al., 1959) e a Síndrome de Klinefelter (47,XXY) (Jacobs e Strong, 1959) foram identificadas. Mais tarde, Patau e Edwards descobriram a associação de outras síndromes a aneuploidias como a trissomia 13 e a trissomia 18, respetivamente, passando a integrar o núcleo das patologias cromossómicas (Patau et al., 1960; Edwards et al., 1960).

A necessidade de desenvolver novas técnicas de bandagem era essencial para uma melhor classificação e identificação dos cromossomas. Casperson foi o primeiro a utilizar um corante fluorescente (quinacrine mustard), que conferia aos cromossomas um padrão diferencial e específico com alternância de bandas claras e escuras (bandagem-Q) permitindo a sua identificação (Casperson et al., 1968). Inicialmente a deteção de alterações estruturais, era realizada apenas em cromossomas de plantas, mais tarde em 1970, o estudo foi alargado pela primeira vez, aos cromossomas humanos (Casperson et al., 1970). A necessidade de um microscópio de fluorescência e o facto de a fluorescência decair com o passar do tempo, levou a que este tipo de bandagem fosse substituído pela bandagem-G (Figura 1), a mais aplicada na rotina dos laboratórios de citogenética. A bandagem GTG consiste na incubação das metafases com uma enzima proteolítica (tripsina) seguida de coloração com o corante Giemsa, conferindo aos cromossomas uma coloração permanente (Seabright, 1971). O corante Leishman permite também obter o mesmo tipo de bandagem para a deteção de alterações numéricas e estruturais (Casperson et al., 1970).

Outras metodologias de bandagem foram desenvolvidas como a bandagem R, C e Nor com diferentes propriedades e aplicações. Contudo, a resolução das técnicas de citogenética pode ir até um nível limite de 400-550 bandas (por genoma haplóide), o que se reflete na identificação de rearranjos estruturais até 5-10 Mb (Smeets, D. F., 2004). A cultura de linfócitos sincronizada, veio permitir ultrapassar parcialmente estas limitações impostas pelo cariótipo de baixa resolução e conseqüentemente, a análise dos cromossomas em prometáfase possibilitou a identificação de rearranjos mais subtis

(Yunis J. J., 1976). A evolução permitiu que várias síndromes clínicas, como a Síndrome de Angelman e Síndrome de Prader Willi, originadas por pequenas alterações cromossómicas (microdeleções ou microduplicações), fossem identificadas (Dutta UR., 2016).. No entanto, a similaridade e ambiguidade da interpretação das bandas cromossómicas, constitui por vezes um fator limitante ao nível da resolução, sendo que esta barreira foi ultrapassada com o aparecimento da Citogenética Molecular (Yunis J. J., 1976).

Todos estes progressos permitiram aumentar a capacidade de diagnóstico da citogenética clínica e tornou-se fundamental o desenvolvimento de uma nomenclatura universal para a identificação dos cromossomas (Paris Conference, 1971). Em 1960 na Conferência de Denver foi estabelecido o primeiro sistema de nomenclatura citogenética que permitiu organizar os cromossomas em 7 grupos (de A a G) de acordo com a posição do centrómero e o tamanho (Balajee A. S., 2018). Mais tarde, na Conferência de Paris, em 1971, foi introduzido um novo sistema para classificação e identificação dos cromossomas e das suas regiões, desta vez com base nos padrões de bandas obtidos pelos diferentes tipos de bandagem (Q, G e R) (Paris Conference, 1971). Mais tarde, em Estocolmo (1977), vários dos relatórios principais das conferências de Denver, Londres, Chicago e Paris, foram agrupados constituindo um só, dando origem à nomenclatura universal de citogenética humana “An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978)” (ISCN), que permanece até aos dias de hoje (Dutta UR., 2016). Periodicamente o sistema de nomenclatura utilizado na rotina dos laboratórios de citogenética é atualizado, providenciando uma descrição detalhada de toda a nomenclatura que deve ser seguida para reportar anomalias cromossómicas detetadas por citogenética clássica ou molecular (FISH, MLPA e aCGH), sendo a atualização mais recente a de 2020 (ISCN 2020; Matoso, E. M. R. D. C., 2015).

1.1.2 A Citogenética Convencional

A análise citogenética pode ser realizada com recurso a diferentes materiais biológicos, proveniente de diversos tecidos, dependendo do contexto clínico e tipo de diagnóstico a realizar (pré ou pós-natal). Em pré-natal, o estudo é efetuado a partir de

células fetais que consoante a indicação e a idade gestacional, pode ser feito em células do líquido amniótico, das vilosidades coriônicas ou sangue fetal por cordocentese. Em pós-natal o tecido mais utilizado são os linfócitos do sangue periférico. Os leucócitos são as células alvo obtidas a partir do sangue periférico para o estudo citogenético, por se tratarem de células nucleadas e dentro deste grupo, os linfócitos T são os que mais facilmente se dividem após estimulação (Freshney, 1987; Rooney, 2001). Além disso são de fácil obtenção e um pequeno número de linfócitos é representativo da constituição cromossómica do indivíduo, na grande maioria das situações clínicas.

O ser humano apresenta um complemento cromossómico de quarenta e seis cromossomas por célula somática. Esse complemento é geralmente constituído por vinte e dois pares de autossomas e um par de cromossomas sexuais, que no sexo feminino é constituído por um par de cromossomas X, e no sexo masculino um cromossoma X e um cromossoma Y (Gardner, R. J. M. et al., 2004). É durante a divisão celular que os cromossomas são distribuídos pelas células filhas, no entanto, este processo não está isento de erros, originando por vezes, células com uma constituição cromossómica alterada. Embora a citogenética convencional permita detetar uma grande quantidade de alterações, devido às limitações impostas pela sua resolução, por vezes é necessário recorrer ao uso de técnicas de biologia molecular e de genómica. A combinação da citogenética com a biologia molecular, revelou-se uma mais-valia para os doentes e familiares no diagnóstico pré e pós-natal com o nascimento da citogenética molecular e da genómica (Smeets, D. F., 2004).

1.1.3 A Citogenética Molecular e a Genómica

A citogenética molecular é definida como a área que combina a citogenética e as técnicas moleculares de modo a permitir a deteção de alterações ao nível do DNA genómico ou das sequências específicas, promovendo a melhoria dos métodos de diagnóstico e prognóstico (Dave BJ, 2007).

O nascimento da área molecular possibilitou a observação de sequências de nucleótidos complementares que hibridizam entre si, formando complexos mais estáveis do que as sequências não complementares (Speicher e Carter, 2005). Entre as

técnicas moleculares mais importantes e auxiliares da citogenética convencional, destacam-se a *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), o *Array Comparative Genomic Hybridization* (aCGH) e a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Na área de sequenciação massiva surge a inovadora técnica de *Next Generation Sequencing* (NGS).

Fluorescence In Situ Hybridization

Em 1980 surgiu a técnica *fluorescence in situ hybridization* que consiste na associação química (hibridização) de um fluorocromo a uma sonda de RNA para identificação rápida e direta de *loci* específicos dos cromossomas (Bauman et al., 1980). Os elementos essenciais da FISH são a sonda de DNA, que pode ser de marcação direta no caso de já conter o fluoróforo, ou de marcação indireta se necessitar da ligação a um hapteno com afinidade para o anticorpo que faz a deteção, e a sequência alvo. As sondas utilizadas podem ter diferentes origens: Bacterial Artificial Chromosome (BAC), P1 Artificial Chromosome (PAC), clones do tipo cosmídeo ou fosmídeo, ou a partir de produtos de Polymerase Chain Reaction (PCR). Dependendo da região alvo, os tipos de sondas utilizadas são: sondas centroméricas ou de sequências repetitivas (Figura 2C), utilizadas na deteção de aneuploidias, identificação da origem de cromossomas marcadores e derivativos de estrutura ambígua; sondas locus-específicas ou de sequência única utilizada na suspeita de síndromes de microdeleção (Figura 2A e 2B) e sondas da totalidade de um cromossoma/pintura cromossómica, utilizadas na identificação de cromossomas ou segmentos cromossómicos de origem desconhecida (Figura 2D).

Com os avanços técnicos dos métodos de deteção de alterações cromossómicas, foram desenvolvidas aplicações mais avançadas como o multicolor FISH (M-FISH) (Figura 2E) e o Spectral Karyotyping (SKY) em que numa só experiência é possível marcar cada par cromossómico com um espectro de cor diferente, utilizando várias combinações e porções dos diferentes fluorocromos (Speicher et al., 1996). Estas técnicas são úteis na caracterização de rearranjos complexos de células tumorais, que envolvam translocações ou inserções e na pesquisa da origem de cromossomas

marcadores. A grande desvantagem é que não detetam inversões, deleções e duplicações intracromossómicas, no entanto, esta barreira foi ultrapassada com o desenvolvimento das “pinturas” parciais para cada braço cromossómico e para regiões específicas de cada cromossoma, surgindo o Multicolor Chromosome Banding (MCB) (Figura 2E) (Liehr et al., 2004).

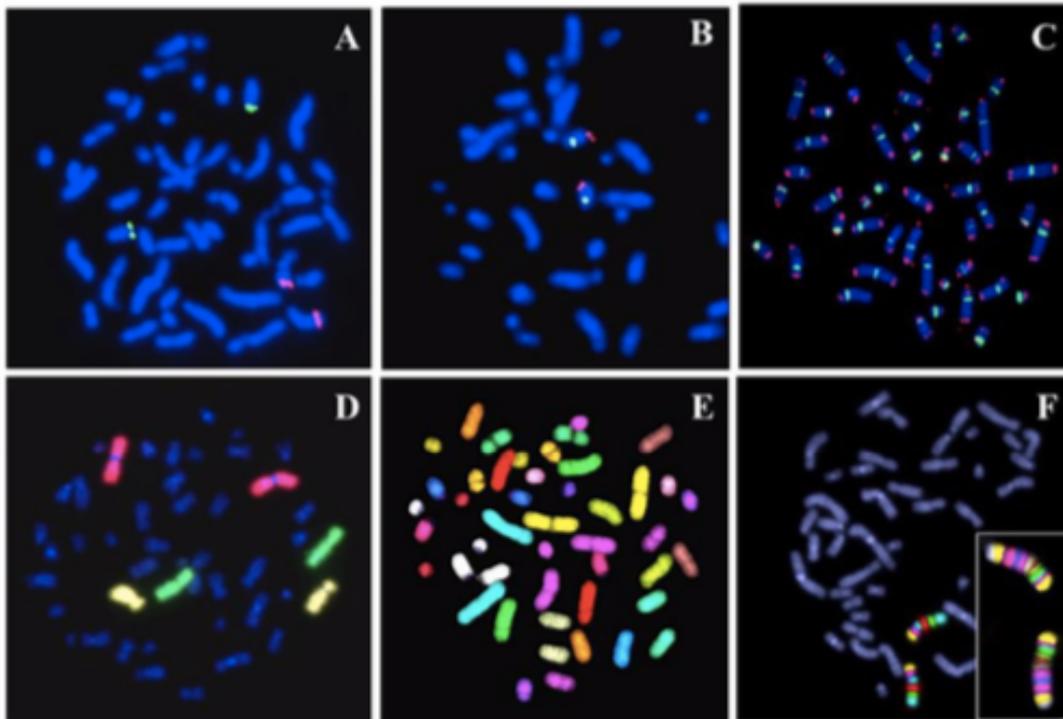


Figura 2 - Imagens representativas das diversas aplicações da FISH na deteção de alterações: (A) de genes únicos (C-Myc-vermelho; IgH-verde); (B) da região de locus específica (cromossoma 8-verde; cromossoma 8q24.3 locus-vermelho); (C) de telómeros e centrómeros (Centrómeros-verde; Telómeros-vermelha); (D) de cromossomas através de pinturas cromossómicas específicas (Cromossoma 1-vermelho, Cromossoma 2-verde e cromossoma 4-amarelo); (E) de todos os cromossomas humanos usando sondas multicolor FISH e (F) de alterações intra-cromossómicas usando sondas multicolor BAND específicas dos cromossomas. (Adaptado de: Balajee A. S., 2018)

A FISH tornou-se rapidamente fundamental na deteção rápida e com elevada sensibilidade, tanto de anomalias numéricas como estruturais, na identificação de translocações, microdeleções e na oncologia (Montazerinezhad S., 2020). Apesar de todas as vantagens, não é isenta de limitações, quer ao nível das sondas disponíveis, da resolução, do número de loci que é possível estudar em simultâneo ou das sucessivas

hibridizações necessárias para chegar a um diagnóstico (Smeets, D. F., 2004 ; Matoso, E. M. R. D. C., 2015)

Comparative Genomic Hybridization

Na década de 90, Kallioniemi e colaboradores, desenvolveram uma técnica molecular com base na hibridização genómica da técnica de FISH, a *Comparative Genomic Hybridization* (CGH) que permite analisar em simultâneo todo o genoma. Ao invés da utilização de sondas, são usados o DNA do doente e um DNA de referência, marcados com fluoróforos diferentes, que hibridizam em metafases de um controlo normal. Com um software adequado, é calculado o número de cópias para cada região cromossómica do DNA do doente em comparação com o DNA de referência tendo por base a proporção de fluorescência refletida ao longo da sequência de cada cromossoma (Kallioniemi et al., 1992). Esta técnica tornou possível a deteção de desequilíbrios cromossómicos em amostras tumorais, onde a citogenética convencional por insucesso da cultura ou falta de qualidade das metafases, não permitia.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

A biologia molecular continuou a desenvolver-se a larga escala e em 2002, Shouten e colaboradores desenvolveram um novo método para a quantificação rápida e precisa de 40 ou mais sequências de DNA numa só experiência, a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) (Dutta UR., 2016). Trata-se de uma técnica de PCR multiplex baseada na hibridização (Figura 3) e ligação de duas sondas adjacentes complementares à sequência alvo. A hibridização das duas sondas (por uma ligase termoestável), ocorre apenas na presença da sequência alvo na amostra e por PCR, é obtida a sequência amplificada. Utilizando apenas um par de primers universal, devido às sequências terminais de cada sonda serem comuns, a MLPA permite a amplificação de até 96 amostras em simultâneo.

Os produtos de PCR obtidos, são separados por eletroforese capilar de acordo com o seu tamanho e quantificados para cada sequência, de forma proporcional à quantidade de DNA alvo presente na amostra (Schouten et al., 2002). A técnica de MLPA tem como principais vantagens: utilizar uma pequena quantidade de DNA (20 – 80 ng); dispensa cultura celular; permite o processamento de um maior número de amostras em simultâneo e maior rapidez da sua análise, assim como a pesquisa de um maior número de loci para uma mesma região ou mesmo várias regiões/genes em simultâneo. Por outro lado, não é adequada no caso da pesquisa e caracterização de rearranjos cromossômicos estruturais, uma vez que não deteta os rearranjos equilibrados, ploidias e mosaicismos (Matoso, E. M. R. D. C., 2015).

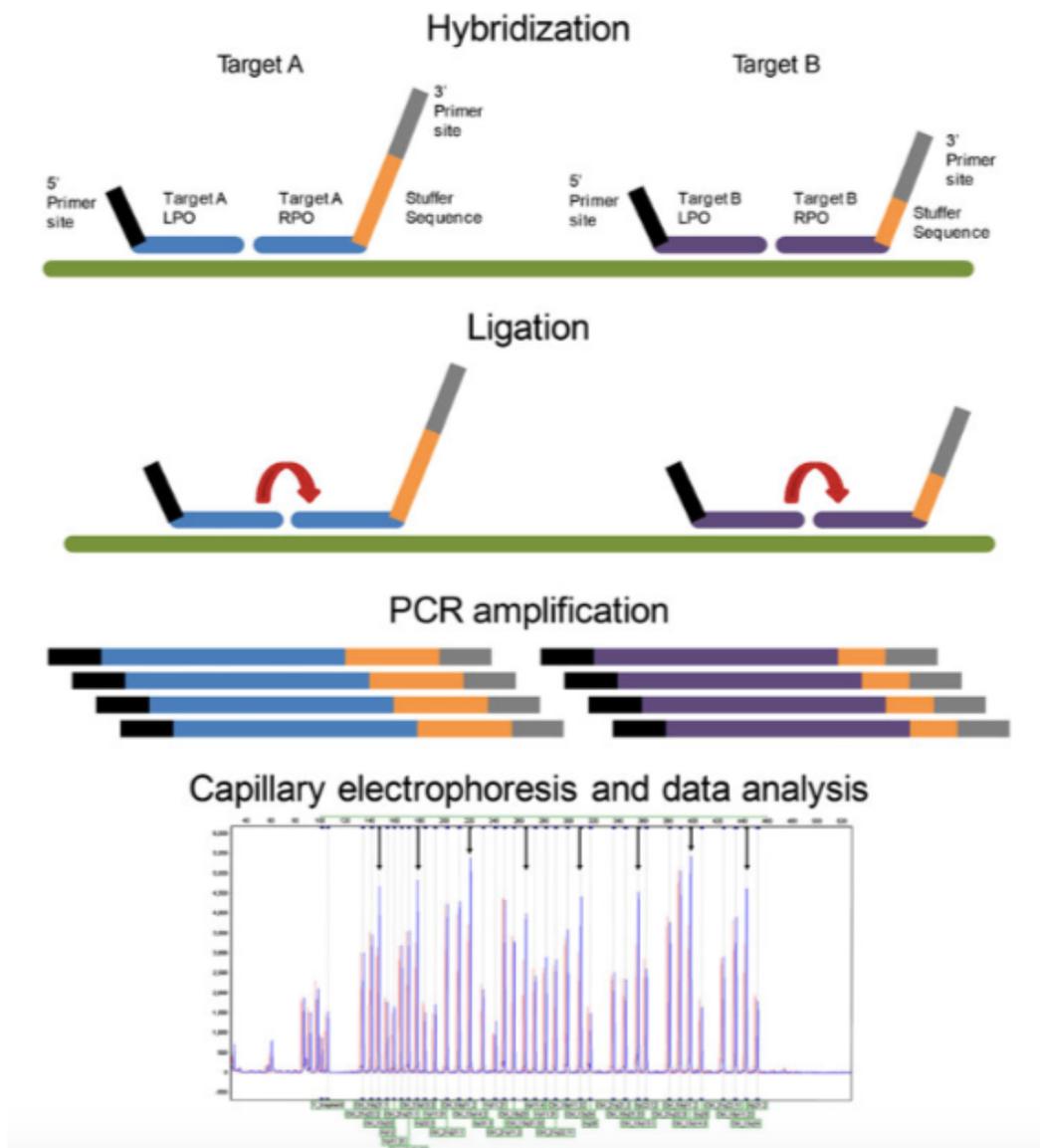


Figura 3 – Esquema representativo da técnica de MLPA. 1 - Hibridização das sondas para a sequência de DNA alvo; 2 - Ligação das sondas adjacentes; 3 - Amplificação por PCR das sequências de sondas ligadas utilizando o conjunto de primers universais; 4 - Eletroforese capilar e análise de dados. A amostra do doente (azul) e o controlo (vermelho) são comparados através do tamanho do pico, um aumento indica um ganho no número de cópias para esses locais, e uma diminuição do tamanho do pico representa uma diminuição do número de cópias. As setas marcam os picos onde o sinal da amostra é maior face ao controlo, indicando um ganho no número de cópias na região. (Adaptado de: Alecia S. Willis. Et al., 2012)

Genómica e a sequenciação massiva de nova geração

A combinação das técnicas de citogenética convencional e molecular, tornou possível analisar um amplo espectro de anomalias, desde alterações cromossómicas numéricas e estruturais, polimorfismos de nucleótido único (SNP), alterações no número de cópias do gene, em prol de um melhor diagnóstico e prognóstico de diversas patologias (Balajee AS, 2018; Trask BJ., 2002). A citogenómica com a técnica de array-Comparative Genomic Hybridization (aCGH), foi inicialmente desenvolvida para aplicar no âmbito da oncologia, no entanto, atualmente é utilizada frequentemente no diagnóstico genético. Embora não permita detetar rearranjos equilibrados, o seu desenvolvimento e aplicações clínicas, têm sido fundamentais no diagnóstico e identificação das bases moleculares de várias doenças. As metodologias usadas na citogenómica são o aCGH e o Single Nucleotide Polymorphism (SNP) array (da Silva Ribeiro, I. P. T. et al., 2018). Os avanços contínuos da tecnologia de sequenciação do material genético, juntamente com o desenvolvimento do Projeto do Genoma Humano, levaram ao nascimento da genómica.

array Comparative Genomic Hybridization

Em 1997 foi desenvolvida uma variante da CGH, a array Comparative Genomic Hybridization (array-CGH), na qual o DNA do paciente e o DNA de referência hibridizam num (micro)array de sondas de DNA fixadas numa lâmina de vidro (Solinas-Toldo et al., 1997). A marcação é feita com recurso a fluoróforos de cores diferentes para o DNA do doente e o DNA controlo, que após desnaturação e à luz de microscopia de

fluorescência, revela a porção de fluorescência para o locus de cada sonda (Figura 4) (Montazerinezhad S, 2020).

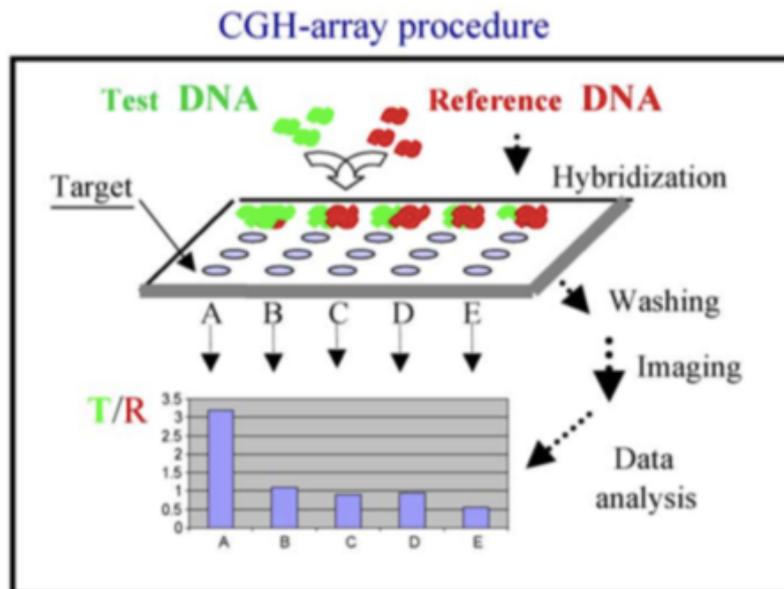


Figura 4 – Procedimento da técnica de array-CGH. O DNA teste (do doente) e o DNA de referência são marcados com cores diferentes e hibridizados com o DNA da sonda (alvo) presente na lâmina; após hibridização, uma maior quantidade de DNA do doente (verde) em relação ao DNA controlo (vermelho), pode ser sinónimo de uma trissomia. No caso de os doentes serem portadores de deleções, a hibridização vai permitir evidenciar mais DNA controlo em relação ao DNA do doente. (Adaptado de: Smeets D. F., 2004)

O aCGH permite diagnosticar alterações submicroscópicas (sem necessidade de estabelecer culturas) que não são detetáveis através da análise do cariótipo convencional ou pela técnica de FISH (Gersen, S., & Keagle, M., 2013; Chaudhary 2011). Devido à sua elevada resolução, podem ser analisados milhares de *loci* do genoma numa única lâmina/array. Apesar das vantagens, não é possível detetar alterações equilibradas, mosaicismo de baixa expressão e alterações de ploidia (Figura 5) (Montazerinezhad S, 2020; Matoso, E. M. R. D. C., 2015)

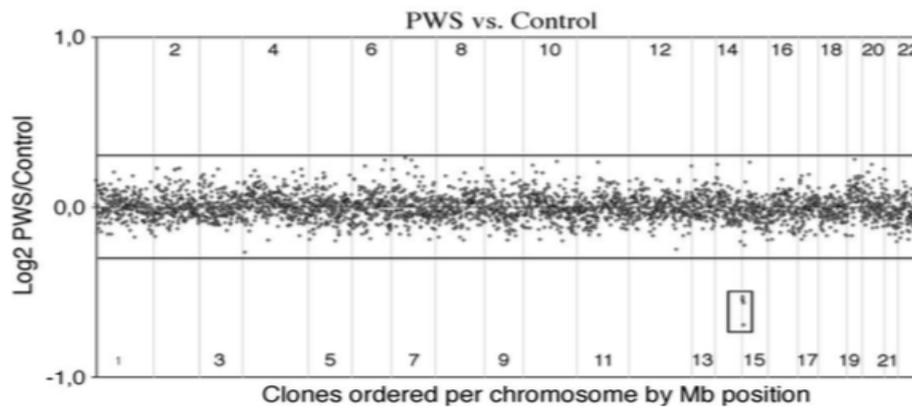


Figura 5 - Resultado de ArrayCGH de um doente com síndrome de Prader Willi por deleção no cromossoma 15. A matriz utilizada contém 3500 clones autossómicos humanos diferentes, verificados por FISH; cada faixa vertical corresponde a um dos 22 autossomas (da esquerda para a direita) e as duas linhas horizontais delimitam a variação normal do sinal do locus. Na faixa 15 (cromossoma 15), quatro clones situam-se visivelmente fora destes limites, identificando assim a eliminação presente no cromossoma 15. (Adaptado de: Smeets D. F., 2004)

Single Nucleotide Polymorphism

A plataforma de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) array é semelhante à de aCGH, no entanto, neste caso não é feita hibridização comparativa e são utilizados oligonucleotídeos de um tipo específico. Esta tecnologia permite a análise simultânea do número de cópias com a análise da perda de heterozigotia, a realização de estudos de genotipagem e a avaliação de dissomia uniparental e de consanguinidade (da Silva Ribeiro, I. P. T. et al., 2018).

Next Generation Sequencing

Nos últimos anos, a NGS - *Next Generation Sequencing* - surgiu como uma técnica inovadora na identificação de rearranjos cromossómicos, equilibrados e desequilibrados, o que a torna uma metodologia única em relação às demais (Dutta UR., 2016). Trata-se de uma sequenciação massiva em paralelo de milhões de pequenos fragmentos de DNA em simultâneo, e devido à sua enorme extensão, tem vindo a ser implementada também em áreas como a oncologia e medicina de precisão (Behjati & Tarpey, 2013). Esta técnica permite a deteção de alterações da sequência de DNA em

estudo relativamente ao DNA de referência, sendo possível sequenciar todo o genoma (*whole genome sequencing*), apenas as regiões codificantes dos genes (*exome sequencing*) ou um número limitado de genes (*targeted sequencing*). A genómica permite sequenciar todo ou apenas regiões específicas do DNA, de forma rápida, e em larga escala.

A enorme quantidade de informação obtida e a avaliação do seu significado clínico após a execução da técnica, constitui a maior limitação na interpretação dos resultados. O custo elevado e a necessidade de equipamentos específicos para a análise e tratamento bioinformático dos dados, são também grandes obstáculos à utilização alargada da NGS. No entanto, as metodologias da NGS estão em franco desenvolvimento e a sua aplicação nos laboratórios de genética clínica é cada vez maior e mais abrangente. Estes feitos têm permitido a redução dos custos assim como ao aumento da precisão e sensibilidade da técnica, permitindo a identificação de variantes mesmo em casos de mosaicismo de baixa expressão (Behjati & Tarpey, 2013).

1.2 Origem e consequências das cromossomopatias

A patogénese define-se como o processo pelo qual o defeito genético, muitas vezes não expressando características particulares da doença, leva à anomalia fenotípica (Gardner, R. J. M. et al., 2004). Através da citogenética convencional, é possível esclarecer a etiologia de determinadas patologias/síndromes cromossómicas.

“O que aconteceu de errado? Vai acontecer novamente?” Estas são algumas das perguntas mais frequentes entre indivíduos portadores de alterações cromossómicas e os seus familiares. As anomalias cromossómicas podem surgir no período pós-zigótico, após segregação anormal dos cromossomas durante a fase mitótica levando à formação de mosaicismo nas células do embrião (Gardner, R. J. M. et al., 2004). No entanto os erros surgem mais frequentemente durante a formação das células germinativas resultando na segregação anormal dos cromossomas durante a meiose na divisão celular (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

As anomalias podem ser classificadas como constitucionais, se estiverem presentes no indivíduo desde o seu nascimento, ou adquiridas se surgirem no decorrer

da vida do indivíduo. Independentemente de serem adquiridas ou constitucionais, são divididas em dois grupos: alterações numéricas e alterações estruturais.

1.2.1 Alterações numéricas

As alterações cromossómicas numéricas, caracterizam-se pela alteração do número normal de cromossomas ($2n = 46$). A perda ou ganho de cromossomas resulta da não-disjunção, ou seja, da incapacidade de cromossomas homólogos se separarem simetricamente durante a divisão celular. Este erro pode ocorrer nas diferentes etapas da divisão celular: durante a mitose, sendo a principal causa de mosaicos – indivíduos constituídos por duas ou mais linhas celulares geneticamente diferentes provenientes do mesmo zigoto – ou na meiose (I e II) (Thomas, NS. et al., 2001). Quando a não-disjunção ocorre na meiose I, a não separação dos homólogos leva à formação de gâmetas aneuploides, podendo ser trissómicos ou monossómicos. Se a divisão meiótica I ocorrer normalmente, a não-disjunção pode ocorrer na meiose II, promovendo a não separação dos cromatídeos irmãos. Novamente, alguns gâmetas irão conter um número incorreto de cromossomas, ao contrário da não disjunção na meiose I em que todos os gâmetas são afetados (Thomas, NS. et al., 2001). A degradação progressiva de fatores que promovem a adesão entre os cromossomas homólogos, contribui para uma maior instabilidade nos cromossomas e ocorre sobretudo durante a oogénese, aumentando à medida que a idade materna avança.

As anomalias numéricas são cerca de metade das principais causas de aborto e malformações congénitas em humanos (Hassold et al., 1996), e podem ser divididas em dois grupos: euploidias e aneuploidias. Quando o erro envolve todo o genoma, o indivíduo apresenta células com três ou mais genomas - euploidia. Estes casos são raramente encontrados em nados-vivos, mas frequentemente detetados em amostras de produtos de abortamento (Benn and Hsu, 2004). As aneuploidias humanas resultam da variação do número de cromossomas envolvendo o ganho (trissomia) ou perda (monossomia) de cromossomas (Gersen, S., & Keagle, M., 2013).

1.2.1.1 Alterações numéricas nos autossomas

A aneuploidia autossômica com maior prevalência em nados vivos, é a trissomia 21 (Síndrome de Down), muito menos frequentes são a trissomia 18 (Síndrome de Edwards) e a trissomia 13 (Síndrome de Patau) com uma prevalência de cerca de 1 em 12000 e 1 em 6000 nascidos vivos, respetivamente (Gardner, R. J. M. et al., 2004). No que diz respeito às aneuploidias dos cromossomas sexuais as mais comuns são a monossomia do X (Síndrome de Turner), a trissomia XXY (Síndrome de Klinefelter), a trissomia XXX e a trissomia XYY.

Síndrome de Down (47, +21)

A síndrome de Down é a aneuploidia autossômica mais frequente em diagnóstico pré e pós-natal. É a causa mais comum para o défice intelectual e tem maior incidência ao nascimento em comparação com qualquer outra alteração cromossômica (Gardner, R. J. M. et al., 2004). Em cerca de 95% dos casos o cromossoma extra é de origem materna, e destes, 80% ocorrem devido a erros durante a meiose I (Luthardt and Keitges, 2001). A prevalência desta doença é de 1-5/10000, tornando-a a anomalia cromossômica mais comum ao nascimento (1 a cada 750) (ORPHA:870).

Cerca de 4% dos indivíduos com Síndrome de Down têm como causa uma translocação robertsoniana desequilibrada, entre o cromossoma 21 e um cromossoma acrocêntrico (13 ou 14 ou 15). Cerca de metade das translocações têm origem *de novo*, enquanto a outra metade é herdada de um progenitor portador de um rearranjo equilibrado. A síndrome de Down por translocação rob(14q21q), é geralmente a causa mais comum de trissomia em famílias com vários casos desta síndrome. Cerca de 2-3% dos casos de trissomia 21 estão presentes no indivíduo sob a forma de mosaico (Luthardt and Keitges, 2001). Clinicamente os doentes apresentam um fenótipo característico com dismorfismos faciais, prega palmar única, hipotonia, malformações cardíacas e défice intelectual (Asim et al., 2015).

Síndrome de Patau (47, +13) e Síndrome de Edwards (47, +18)

Ao contrário da trissomia 21 com uma taxa de sobrevivência elevada, as trissomias 13 e 18 são pouco frequentes em pós-natal, com 95% de probabilidade de morte in útero. A prevalência da trissomia 13 é de 1-9/1000000 e a incidência é estimada entre 1/8000-15000 nascimentos (ORPHA:3378). Apesar da reduzida possibilidade de sobrevivência, quando acontece, a trissomia 13 apresenta manifestações fenotípicas severas sobretudo a nível neurológico, com hipotonia, holoprosencefalia e dismorfismos faciais. Em 20% dos casos, a causa está associada a uma translocação (ORPHA:3378).

A trissomia 18, com uma prevalência de 1-9/1000000 e uma incidência europeia de 1 por cada 2700 nascimentos, está também associada a um quadro polimalformativo grave, com hipotonia, hipotrofia, microcefalia, microretrognatia, hipertelorismo, diversos dismorfismos faciais, atraso no desenvolvimento, problemas cardíacos e renais (ORPHA:3380). O prognóstico é muito reservado e a maioria das crianças não sobrevive até completar o primeiro ano de vida. Geralmente a suspeita de fetos com trissomia 18 surge durante a gravidez a partir de achados ultrassonográficos (restrição do crescimento e malformações), que pode ser confirmada pela análise do cariótipo fetal (Luthardt and Keitges, 2001).

1.2.1.2 Alterações numéricas dos cromossomas sexuais

As aneuploidias dos cromossomas sexuais têm um efeito muito menos deletério sobre o fenótipo do que a aneuploidia autossómica. O cromossoma X é um dos maiores cromossomas do genoma humano, enquanto o cromossoma Y tem um tamanho reduzido, é composto sobretudo por heterocromatina e contém poucos genes. Quer no homem quer na mulher, é necessário apenas um cromossoma X completamente funcional. Para a inativação do cromossoma X, existe nas células um mecanismo através do qual o desequilíbrio é neutralizado, numa tentativa de alcançar o mesmo efeito que ter apenas um único X ativo. Geralmente nestes indivíduos, o aparelho reprodutor e o cérebro são os órgãos predominantemente afetados, no

entanto o efeito pode ser mínimo. Quanto ao cromossoma Y supranumerário, como em casos de 47,XY, as consequências fenotípicas são geralmente reduzidas (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

As aneuploidias dos gonossomas, como a Síndrome de Klinefelter (47,XXY), a Síndrome do triplo X (47,XXX) e a Síndrome de Turner (45,X), são comuns em pós-natal, embora muitas vezes diagnosticadas apenas na idade adulta.

Síndrome de Klinefelter (47,XXY)

A síndrome de Klinefelter é a anomalia cromossômica sexual mais comum, ocorrendo em cerca de 1/500 indivíduos do sexo masculino (Aksglaede et al., 2013). É caracterizada pela presença de um cromossoma X supranumerário, geralmente de origem materna (Groth et al., 2013).

Geralmente o indivíduo é fenotipicamente normal, no entanto o quadro clínico é variável e este pode apresentar estatura elevada de forma desproporcional, hipogonadismo com testículos pequenos, azoospermia ou oligospermia e cerca de 30% dos indivíduos afetados desenvolvem ginecomastia (Bonomi et al., 2017). O diagnóstico pode ser tardio, uma vez que a maioria dos indivíduos apresenta um fenótipo ligeiro que se manifesta apenas na idade adulta, por baixa produção da quantidade de espermatozoides ou infertilidade. Salvo intervenção médica, a infertilidade é quase inevitável na Síndrome de Klinefelter, embora existam algumas exceções (Gardner, R. J. M. et al., 2004). O resultado 47,XXY é detetado em cerca de 11% dos homens azoospermicos e 3% dos homens inférteis estudados (Bonomi et al., 2017).

Síndrome do triplo X (47,XXX)

A Síndrome do triplo X trata-se da anomalia cromossômica mais comum no sexo feminino, ocorrendo em aproximadamente 1/1000 nascimentos, no entanto, por apresentar na maioria das vezes um fenótipo ligeiro, é diagnosticada apenas em cerca de 10% das mulheres portadoras. As características fenotípicas mais comuns durante a infância são atraso do desenvolvimento psicomotor, estatura elevada, epicanto,

hipotonia, clinodactilia, anomalias genito-urinárias e mais tarde na adolescência, falência ovárica prematura. A causa mais comum da trissomia X é a não-disjunção meiótica, embora a não-disjunção pós-zigótica ocorra em aproximadamente 20% dos casos, assim como a idade materna avançada é responsável por aproximadamente 30% dos casos. A existência de linhas celulares em mosaico (46,XX/47,XXX ou 47,XXX/48,XXXX) nomeadamente a presença de linhas celulares com Síndrome de Turner (45,X), estão presentes em aproximadamente 10% dos casos (ORPHA:3375).

Síndrome de Turner (45,X)

A Síndrome de Turner é uma monossomia do cromossoma X com prevalência estimada em 1/5000 nados vivos (afetando 1 em cada 2500 nascimentos do sexo feminino) (ORPHA:881). Trata-se de uma patologia cromossómica associada à ausência completa ou parcial de um cromossoma X, tendo cerca de metade dos casos origem na monossomia do X, a maioria surge de facto, devido a alterações cromossómicas estruturais (deleção, isocromossoma X, cromossoma em anel ou cromossoma dicêntrico), pela presença de mosaicismo com linha 45,X e/ou um cromossoma X ou Y anormal (ORPHA881). As características fenotípicas clínicas associadas a esta síndrome são sobretudo baixa estatura, amenorreia primária e distúrbios dos caracteres sexuais secundários na mulher (Luthardt and Keitges, 2001).

O diagnóstico da Síndrome de Turner é realizado em pré-natal quando se verificam alterações ecográficas, durante a infância e a adolescência quando se verificam características como baixa estatura ou alterações ligadas à puberdade, nomeadamente amenorreia primária, ou menarca precoce. Na idade adulta, a suspeita desta síndrome pode surgir em mulheres saudáveis por desenvolverem distúrbios reprodutivos e/ou menopausa precoce.

1.2.2 Alterações estruturais

As alterações na estrutura dos cromossomas são caracterizadas pela perda, ganho e/ou troca de segmentos intra e intercromossómicos que provocam rearranjos

na organização do cromossoma, alterando a arquitetura genómica e consequentemente a expressão dos genes envolvidos (Nussbaum, R. L., 2016). Este tipo de alterações podem ser equilibradas ou desequilibradas. Quando equilibrados, se não alterarem a dose ou expressão de nenhum gene funcional, os rearranjos não têm qualquer consequência para o fenótipo dos portadores. No entanto, se a alteração ocorrer de forma desequilibrada, pode provocar fenótipos patológicos devido à presença de uma quantidade anómala de material genético (Nussbaum, R. L., 2016). O fenótipo do indivíduo depende do tamanho do segmento desequilibrado, da região do genoma e consequentemente do seu conteúdo génico em desequilíbrio. A perda de material genético é geralmente menos tolerada do que o ganho, provocando um quadro clínico mais severo (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

Estas anomalias podem ocorrer *de novo* ou de forma hereditária, estando a sua causa associada a quebras cromossómicas ou ao fenómeno de crossing-over (Moore and Best, 2001). Existem mecanismos de reparação, como o “mismatch repair”, que durante o ciclo celular evitam a ocorrência de erros e impedem que estes prossigam para a divisão mitótica/meiótica. A correção pode ser efetuada e não provocar qualquer efeito fenotípico, em casos de reunião dos mesmos pontos de quebra, ou pelo contrário, se pontos de quebra distintos forem reunidos e ao originarem novas combinações provocam alterações cromossómicas estruturais (Griffiths et al., 2015).

As alterações cromossómicas estruturais estão divididas em:

- Alterações equilibradas (sem perda de material genético): Inversões, Translocações e Inserções.
- Alterações desequilibradas (com alteração do número de cópias do gene): Duplicações, Deleções, Cromossomas em anel e Isocromossomas.

1.2.2.1 Alterações cromossómicas estruturais equilibradas

As anomalias estruturais equilibradas são alterações em que a dissomia dos autossomas é mantida e estes apresentam um complemento cromossómico equilibrado a nível génico, no entanto há reorganização da estrutura cromossómica. Tipos de

rearranjos cromossômicos que podem provocar alterações equilibradas: inversões, translocações e inserções.

Inversões

As inversões são rearranjos estruturais intracromossômicos, simples ou complexos, no caso de coexistirem com outro rearranjo no mesmo cromossoma. A inversão simples compreende duas quebras envolvendo apenas um cromossoma, na qual o segmento intercalar gira 180° e reinsere-se no mesmo cromossoma de forma invertida. A frequência deste tipo de alteração, varia de cerca de 0,12-0,7% (inversões pericêntricas) e cerca de 0,1-0,5% (inversões paracêntricas) dos indivíduos (Gardner, R. J. M. et al., 2004). Quando a inversão envolve a região que contém o centrómero, trata-se de uma inversão pericêntrica (Figura 6B), na qual os pontos de quebra encontram-se no braço curto e no braço longo. No caso de o centrómero não estar envolvido na alteração, ambas as quebras ocorrerem no braço longo dos cromossomas e a inversão designa-se paracêntrica (Figura 6A).

O risco para a descendência depende da localização do centrómero e do tamanho do segmento invertido, logo para inversões paracêntricas há um risco menor de gerar patologia na prole contrariamente ao risco associado às inversões pericêntricas (Nussbaum, R. L., 2016). Para os portadores de inversões paracêntricas, a descendência terá cariótipos normais ou a mesma alteração equilibrada que os pais e portanto fenotipicamente semelhantes. Neste tipo de inversões existe a possibilidade de gerar gâmetas recombinantes, no entanto os cromossomas acêntricos e dicêntricos obtidos geralmente não levam a descendência viável (Figura 6A) (Gardner, R. J. M. et al., 2004). No caso dos portadores de inversões pericêntricas, há a possibilidade de gerar gâmetas normais, gâmetas com a mesma inversão dos progenitores e gâmetas cromossomicamente desequilibrados que terminam em aborto. O desequilíbrio resulta do crossing-over que ocorre dentro da alça de inversão entre, um cromatídeo com inversão e um cromatídeo do cromossoma homólogo normal, levando à formação de dois gâmetas recombinantes. Os gâmetas recombinantes obtidos contêm, uma duplicação do segmento distal do braço curto e uma deleção do segmento distal do

braço longo, e vice-versa no outro recombinante (Figura 6B). Assim, os gâmetas resultantes teriam uma trissomia parcial para um segmento e uma monossomia parcial para o outro. Normalmente, apenas um deles – o menos monossômico – é viável (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

Aproximadamente 85-90% das inversões são herdadas a partir de progenitores fenotipicamente normais (Gersen, S., & Keagle, M., 2013), no entanto, durante a meiose I pelo fenómeno de crossing-over, a recombinação genética promove a criação de gâmetas desequilibrados recombinantes com aneusomias terminais. Geralmente, as inversões que ocorrem nos cromossomas 1, 9, 16 e Y, aparecem em zonas polimórficas e portanto não apresentam consequências patológicas graves, uma vez que alterações nestes cromossomas, estão frequentemente associadas a polimorfismos com uma frequência superior a 1% na população.

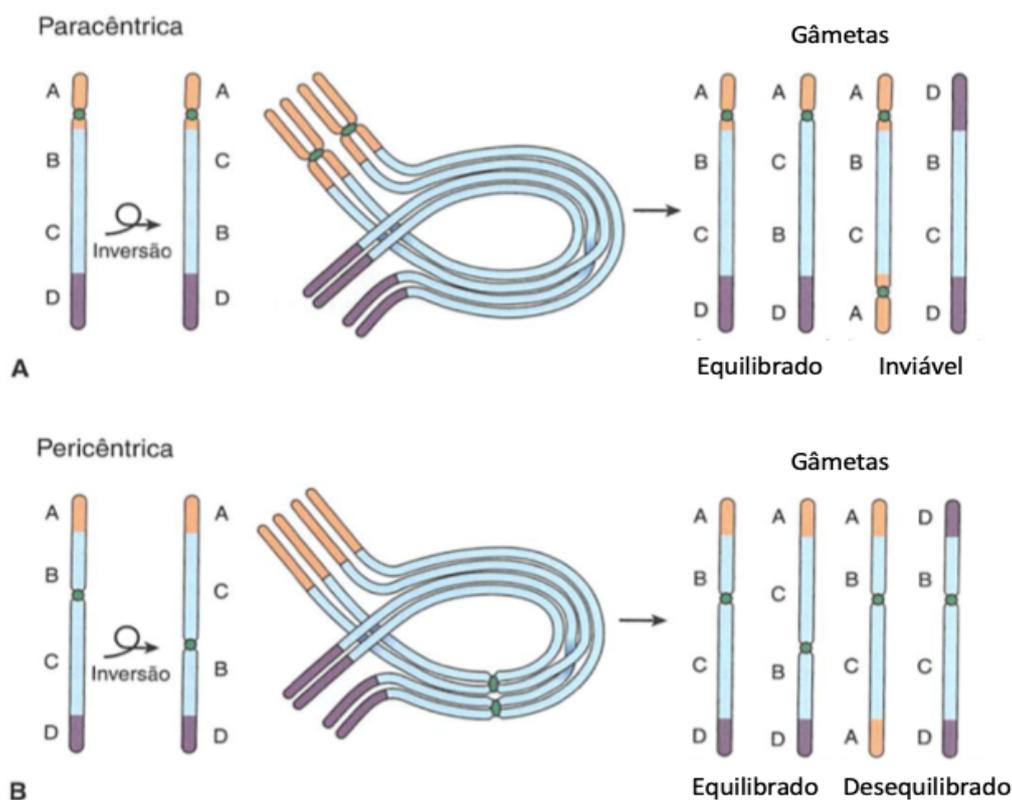


Figura 6 - Alças de inversão formadas na meiose I por crossing-over. A - Inversão paracêntrica: os gâmetas formados após a meiose II geralmente contêm uma cópia normal (A-B-C-D) e uma cópia equilibrada (A-C-B-D) do cromossoma, sendo os gâmetas acêntricos e dicêntricos inviáveis; B - Inversão pericêntrica: os gâmetas formados após a meiose II podem ser equilibrados (normais ou invertidos) ou desequilibrados, sendo que estes últimos contêm um cromatídeo com uma duplicação e uma deleção, simultaneamente (A-B-C-A ou D-B-C-D). (Adaptado de: Nussbaum, R. L., 2016).

Translocação Recíproca

Aproximadamente 1/500 indivíduos é portador translocação recíproca, representando a anomalia estrutural mais frequentemente observada em cariótipos humanos (Gardner, R. J. M. et al., 2004). Resulta da troca de segmentos entre dois cromossomas homólogos ou não homólogos e não provoca quaisquer alterações fenotípicas no indivíduo, podendo surgir *de novo* no indivíduo, ou ser herdada (Gersen, S., & Keagle, M., 2013). Existem diferentes padrões de segregação para os gâmetas formados por um portador de uma translocação recíproca (Figura 7): segregação alternada (2:2), concebe separadamente gâmetas normais e gâmetas equilibrados (derivativos); segregação adjacente-1, gera apenas gâmetas desequilibrados com uma pequena deleção num cromossoma e uma pequena duplicação noutra; segregação adjacente-2 origina gâmetas muito desequilibrados com trissomia para um segmento e monossomia para o outro e a segregação 3:1 em que se formam gâmetas com 24 e 22 cromossomas, e a descendência apresenta um cariótipo de 47 ou 45 cromossomas, sendo o cariótipo com trissomia o único viável. Se o mesmo cariótipo (equilibrado) encontrado no progenitor for detetado em diagnóstico pré-natal na descendência, não há risco acrescido de anomalia fenotípica para a criança (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

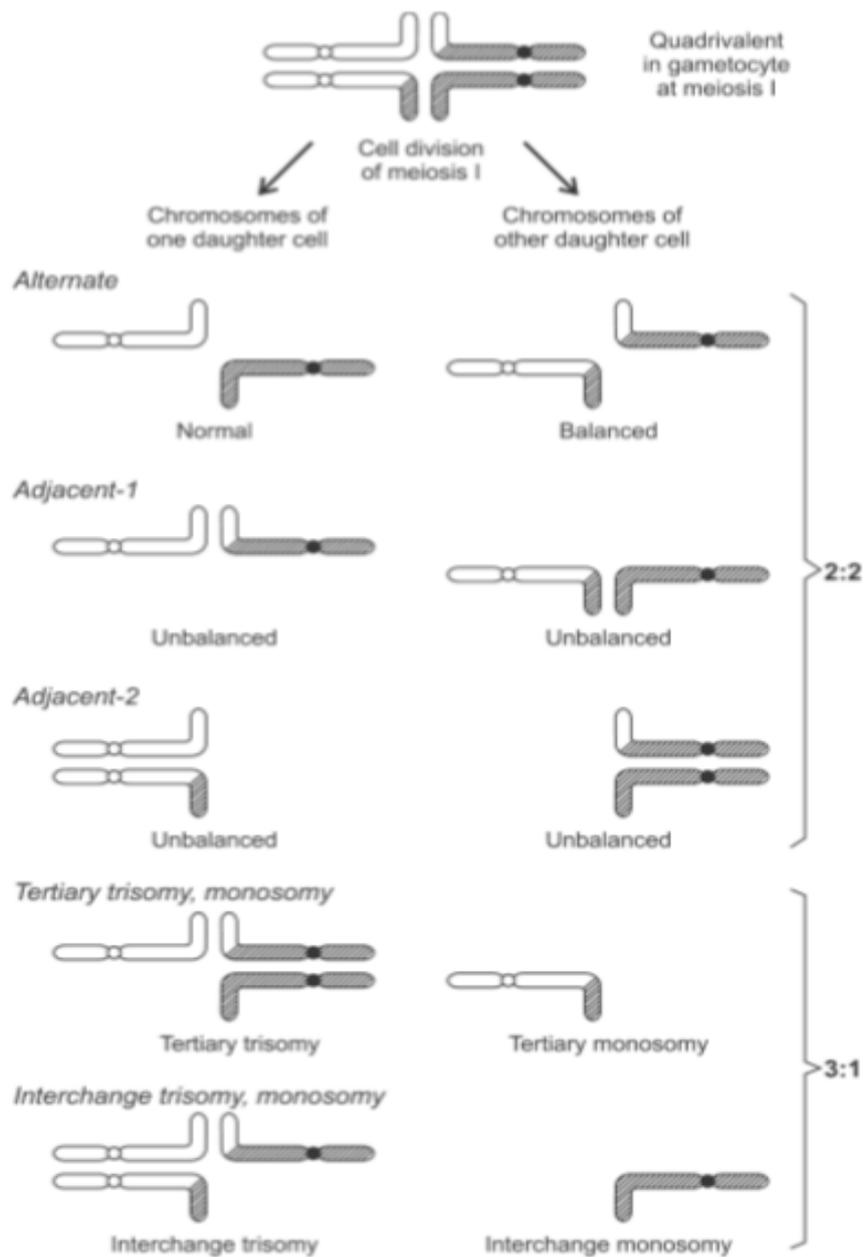


Figura 7 - Mecanismos de segregação 2:2 e 3:1 na gametogénese de um indivíduo portador de translocação. (Adaptado de: Gardner, R. J. M. et al., 2004)

Translocação Robertsoniana

As translocações Robertsonianas resultam da fusão dos dois braços longos de cada cromossoma acrocêntrico (13, 14, 15, 21 e 22) e o produto obtido é chamado de cromossoma derivativo (der). Este tipo de alterações está entre os rearranjos estruturais equilibrados mais comuns na população em geral, com uma frequência de 1 em cada

1000 recém-nascidos. A translocação Robertsoniana mais comum, ocorre entre os cromossomas 13 e 14 (Figura 13), representando cerca de 75% do total destas alterações, seguida da translocação entre os cromossomas 14 e 21 com 10% (Gardner and Amor, 2018).

Existem três mecanismos possíveis na origem da translocação Robertsoniana (Figura 12): fusão dos centrómeros originando um cromossoma monocêntrico (Figura 12a); união dos braços longos de dois acrocêntricos após quebra no braço curto de um cromossoma e no braço longo de outro, originando um cromossoma monocêntrico (Figura 12b) e união dos braços longos de dois cromossomas após quebras em ambos os braços curtos resultando num cromossoma dicêntrico ou, após a supressão de um centrómero, a um monocêntrico (Figura 12c) (Gardner, R. J. M. et al., 2004). O mecanismo que envolve a formação de um cromossoma dicêntrico é mais frequente em relação aos outros dois que produzem um cromossoma monocêntrico.

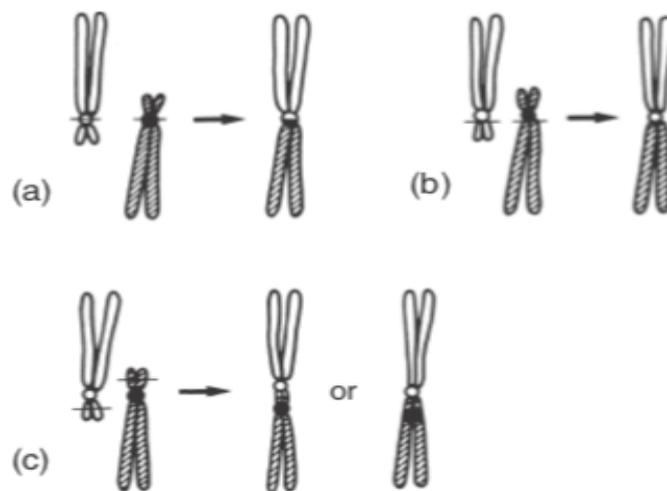


Figura 8 - Possíveis mecanismos de formação das Translocações Robertsonianas. (a) fusão cêntrica; (b) quebra num braço curto e num braço longo e (c) quebra em ambos os braços curtos, dando origem a um cromossoma dicêntrico ou, após a supressão de um centrómero, a um monocêntrico. (Adaptado de: (Gardner, R. J. M. et al., 2004)

Inserções

Um outro tipo de alteração equilibrada, no entanto semelhante às translocações, são as inserções, em que as duas primeiras quebras libertam um

segmento intersticial do cromossoma, que é então inserido no local criado pela terceira quebra. Na inserção intercromossómica, um segmento de um cromossoma é intercalado noutra não homólogo, não havendo troca recíproca. Na inserção intracromossómica, um segmento é intercalado noutra parte do mesmo cromossoma, podendo ser sob a mesma orientação ou invertida. As inserções estão entre os rearranjos que implicam o maior risco reprodutivo, em que o risco médio de ter um filho anormal é de 32% para o portador masculino e 36% para o feminino (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

1.2.2.2 Alterações cromossómicas estruturais desequilibradas

As alterações desequilibradas envolvem a perda ou ganho de determinado segmento cromossómico ou cromossoma, provocando um desequilíbrio genómico. O efeito destas alterações é mais deletério na perda do que na duplicação de material génico (Moore and Best, 2001, Griffiths et al., 2015). Cerca de 20-30% dos portadores de alterações desequilibradas, têm gestações que resultam em abortos espontâneos, sendo o risco da população em geral de 15% (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

Duplicação

A duplicação é um tipo de alteração desequilibrada que compreende a repetição de um determinado segmento cromossómico com origem: em erros durante a replicação; na troca desigual entre cromatídeos irmãos por recombinação direta se a orientação linear de um cromossoma for mantida, e invertida (Tandem) se os segmentos original e duplicado forem ordenados em tandem; ou em translocações entre cromossomas homólogos que após segregação adjacente I, originam gâmetas com segmentos duplicados (Behrend et al., 2017; Gardner, R. J. M. et al., 2004). Também quando o crossing-over ocorre no segmento que abrange a alça da inversão, pode resultar em gametas desequilibrados com duplicações.

Este tipo de alteração é, regra geral, fenotipicamente menos severo em comparação com a deleção e depende sobretudo da região do conteúdo génico envolvida.

Deleção

As deleções, ao contrário das duplicações, são anomalias caracterizadas pela perda de segmentos cromossómicos, podem ocorrer tanto no braço curto como no braço longo em todos os cromossomas humanos (Gersen, S., & Keagle, M., 2013). Quanto maior a deleção, maior é o número de genes envolvidos, no entanto o impacto fenotípico da deleção é dependente do conteúdo génico da região cromossómica envolvida (Gersen, S., & Keagle, M., 2013). As deleções resultam em monossomias parciais que geralmente são responsáveis por patologias graves, quando a expressão de apenas metade do produto génico de um ou mais genes envolvidos está associada a patologia (Gersen, S., & Keagle, M., 2013). Existem diversas síndromes associadas a deleções, nomeadamente a Síndrome de Cri-du-chat. Esta síndrome geralmente resulta de uma deleção terminal com um ponto de quebra em 5p15.2, sendo em 90% dos casos *de novo*, no entanto, pode ser resultante de uma translocação no progenitor (Luthardt and Keitges, 2001). Existem inúmeras deleções observadas na maioria dos cromossomas humanos, sendo que as mais comuns se verificam no braço curto dos cromossomas 4, 5, 9 e 18 e no braço longo do cromossoma 18 (Rooney, D. E., 2001). As deleções que se encontram no limite de resolução das técnicas de citogenética clássica, são denominadas microdeleções e são detetadas por técnicas moleculares como a FISH, MLPA ou aCGH (Rooney, D. E., 2001). A Síndrome de DiGeorge (del22q11.2) e as Síndromes de Angelman/Prader-Willi (del15q11.2), estando estas últimas também associadas a mecanismos de imprinting e dissomia uniparental, são exemplos de algumas das síndromes de microdeleção (Luthardt and Keitges, 2001).

Cromossoma em anel

Quando por quebra das extremidades, um cromossoma perde os telómeros, que são as estruturas responsáveis por conferir estabilidade aos cromossomas, as extremidades unem-se e formam um cromossoma em anel (Behrend et al., 2017). Os anéis são estruturas instáveis e frequentemente, os de menores dimensões, perdem-se durante as sucessivas divisões mitóticas, uma vez que o emparelhamento com o seu

homólogo é difícil, levando a um mosaicismo de baixa expressão (Gardner e Sutherland, 2012). Os cromossomas em anel são pouco comuns, embora existam e estejam por vezes relacionados com a infertilidade. O fenótipo característico na maioria dos casos, compreende dismorfogénese, atraso mental variável, baixa estatura e dismorfismos, no entanto pode não existir qualquer manifestação fenotípica.

O cromossoma 20 em anel está intrinsecamente ligado à epilepsia refratária, geralmente pessoas com suspeita desta patologia, são seguidas em consulta e o exame de cariótipo é solicitado. Cerca de 99% dos cromossomas em anel surgem esporadicamente, no entanto há uma pequena probabilidade de serem transmitidos de forma parental (Gardner, R. J. M. et al., 2004). Existem dois tipos de cromossomas em anel que podem estar associados a um fenótipo ligeiro: o cromossoma em anel de comprimento quase total que substitui um dos homólogos normais ou o cromossoma em anel de tamanho muito reduzido e portanto constitui um cromossoma supranumerário 47,+r (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

Isocromossoma

Os isocromossomas são alterações originadas por divisão centromérica anormal, da qual resulta uma duplicação do braço longo e ausência do braço curto do cromossoma, ou vice-versa. Posteriormente ocorre a união do centrómero dos dois braços duplicados (Rooney, D. E., 2001). Quanto mais pequeno for o isocromossoma, menor será o rearranjo e maior será a probabilidade do feto portador sobreviver. A grande maioria dos isocromossomas envolvendo autossomas, com exceção dos braços curtos dos cromossomas 5, 8, 9, 12 e 18, são letais. Os cromossomas sexuais são mais propensos à formação deste tipo de alteração estrutural, geralmente sob a forma de mosaico, no entanto ocorre frequentemente no braço longo do cromossoma X e é a anomalia estrutural mais comum em mulheres com Síndrome de Turner (Gersen, S., & Keagle, M., 2013).

O isocromossoma que contém duas cópias do braço duplicado, duas cópias do centrómero e uma pequena região proximal do braço deletado, define-se como isodicêntrico (Gersen, S., & Keagle, M., 2013).

Mosaicismo

Todas as alterações numéricas e estruturais podem estar presentes nas células de um indivíduo em mosaico. O mosaicismo caracteriza-se pela presença de dois ou mais tipos de linhas celulares diferentes, presentes no mesmo indivíduo em quantidades desiguais. As linhas provenientes do mesmo zigoto, resultam da não disjunção que ocorreu na mitose no início do desenvolvimento embrionário. O mosaicismo de uma alteração pode estar ao nível da linha germinativa, afetando os gâmetas e permitir a sua passagem à descendência, no entanto o portador geralmente não é afetado. Já o mosaicismo associado às células somáticas, pode ocorrer em qualquer célula do corpo, podendo ser fenotipicamente expresso ou não. O indivíduo pode conter a linha celular com o desequilíbrio em menor quantidade, em comparação com a linha celular normal, atenuando o fenótipo ou em determinados casos nem ser expresso (Nussbaum, R. L., 2016).

1.3 Patologias cromossómicas na reprodução e no desenvolvimento

As alterações cromossómicas provocam desequilíbrios devido ao facto de alguns genes serem sensíveis à dosagem, e portanto uma quantidade incorreta de material genético em cada célula do indivíduo acaba por alterar o seu desenvolvimento em maior ou menor grau (Gardner, R. J. M. et al., 2004). Grandes perdas ou ganhos complicam o normal desenvolvimento de uma gestação, resultando maioritariamente em aborto, no entanto, podem ser compatíveis com a sobrevivência (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

1.3.1 Os problemas reprodutivos e o portador de um rearranjo

A infertilidade afeta cerca de 1 em cada 7 casais em países industrializados, mais ainda em países não industrializados e a causa pode ser atribuída igualmente a qualquer um dos parceiros (More, R. et al., 2016). Um indivíduo deve ser considerado estéril se, depois de estudado, concluir que não tem possibilidade de produzir uma

gestação, no entanto se a história reprodutiva incluir um aborto ou feto malformado, trata-se de infertilidade secundária (De Braekeleer, M. et al., 1991).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade pode ser dividida em: infertilidade primária, se o casal nunca concebeu apesar da coabitação e exposição à gravidez (sem contraceção) por um período de dois anos (More, R. et al., 2016), ou secundária se o casal concebeu pelo menos uma gravidez anterior, embora não envolva necessariamente um nascimento vivo. Estima-se que 60-80 milhões de casais sofrem de infertilidade em todo o mundo (More, R. et al., 2016). Indivíduos saudáveis, portadores de rearranjos equilibrados (translocações), envolvendo cromossomas sexuais ou autossomas, têm um risco elevado de produzir gâmetas recombinantes, geneticamente desequilibrados. Consequentemente estes gâmetas podem resultar numa descendência desequilibrada ou em aborto, no entanto, também existe a possibilidade de o portador não ter dificuldades em ter gestações e filhos normais (Gardner, R. J. M. et al., 2004). Ocasionalmente, alguns indivíduos masculinos portadores de translocações, são inférteis por comprometimento da espermatogénese, já a incidência de infertilidade na mulher é menor, uma vez que a oogénese é um processo mais robusto (Gardner, R. J. M. et al., 2004).

1.3.1.1 Na infertilidade primária

Estima-se que metade dos casos de infertilidade sejam relacionados à causa feminina, a outra metade de origem masculina, no entanto em menor percentagem a causa também pode ser associada ao casal ou permanecer desconhecida (Joseph, A. et al., 1982). A infertilidade de causa feminina relaciona-se sobretudo com a idade materna avançada, uma vez que o envelhecimento do sistema reprodutor desempenha um papel essencial na gestação (More, R. et al., 2016). A principal causa da infertilidade feminina é a amenorreia, no entanto os problemas de ovulação são responsáveis por cerca de 30-40% de todos os casos (More, R. et al., 2016). Nas consultas de pré-concepcional ou de infertilidade, o estado de saúde da mulher vai ser avaliado com a finalidade de perceber qual a causa para não conseguir suportar uma gravidez, não obstante do estudo ser feito também ao homem. Vários problemas como: menopausa precoce, amenorreia

primária/secundária, distúrbios na ovulação, doenças do aparelho reprodutor e outros distúrbios hormonais, são atribuídos como causa da infertilidade na mulher, sobretudo se algum destes fatores coincidir com a idade materna avançada. Geralmente as mulheres diagnosticadas com esterilidade/infertilidade, portadoras de alteração estrutural no cromossoma X ou de um cariótipo 45,X, apresentam amenorreia primária e em alguns casos disgenesia uterina. Pensa-se que uma possível causa possa estar relacionada com o facto de uma determinada região do braço longo do cromossoma X permanecer intacta em ambos os cromossomas para permitir o normal desenvolvimento do sexo feminino (Joseph, A, et al., 1982).

Também no sexo masculino, as alterações cromossómicas causam vários problemas ao nível da espermatogénese e conduzem à infertilidade masculina permanente e irreversível (More, R. et al., 2016). A contribuição dos fatores masculinos para a infertilidade é de 30-50% e estão envolvidos fatores ambientais e genéticos, sobretudo alterações cromossómicas e microdeleções do cromossoma Y na região Yq11 (More, R. et al., 2016). Segundo a literatura, estudos mitóticos em homens inférteis mostrou que 12% dos homens azoospermicos e oligozoospermicos graves tinham uma alteração 47,XXY na sua constituição ou uma translocação Robertsoniana/recíproca (De Braekeleer, M. et al., 1991). O estudo do cromossoma Y revelou determinados loci responsáveis pela formação, maturação e espermatogénese em pontos específicos, sendo que qualquer alteração estrutural pode prejudicar a espermatogénese, a diferenciação gonadal e, em casos mais extremos, provocar ambiguidade sexual (Joseph, A. et al., 1982).

Ferguson-Smith e colaboradores, em 1957, suspeitaram da existência de alterações cromossómicas na esterilidade masculina quando encontraram um corpo de Barr em alguns homens com azoospermia ou oligozoospermia grave. Dois anos depois, Jacobs e Strong, mostraram que a constituição cromossómica desses homens era 47,XXY (De Braekeleer, M. et al., 1991). Algumas translocações recíprocas que não envolvam cromossomas sexuais, podem também estar associadas à falha ou deficiência na produção de espermatozoides devido ao comprometimento da espermatogénese. Inversões pericêntricas e paracêntricas, excluindo as inversões pericêntricas envolvendo

o cromossoma 9, raramente são encontradas em homens inférteis (De Braekeleer, M. et al., 1991).

1.3.1.2 Na infertilidade secundária

A infertilidade secundária inclui os casais que por alterações citogenéticas ou outras causas, não conseguem levar a gravidez a termo. Estima-se que metade das perdas gestacionais ocorram devido a alterações cromossómicas fetais, sendo a grande maioria numéricas, no entanto as alterações estruturais também existem ainda que em menor percentagem (Wu, X. et al., 2021). Os abortos ocorrem em cerca de 15% das gestações diagnosticadas, decorre geralmente entre as oito e as doze semanas de gestação e apesar de constituírem eventos comuns, a maioria das mulheres após sofrer um aborto, dá à luz uma criança saudável (Rolnik, D. L. et al., 2010).

As frequências e perfis de alterações cromossómicas em amostras de abortos precoces estão fortemente associados a fatores clínicos, incluindo idade materna avançada (Rolnik, D. L. et al., 2010), aborto na gestação anterior, história de nascidos vivos com cromossomopatias e o modo de conceção (com intervenção médica). A maioria das anomalias genéticas que resultam em aborto espontâneo, são esporádicas e não recorrentes, no entanto, algumas anomalias numéricas podem indicar um risco potencial de recorrência, especialmente para trissomias autossómicas viáveis - trissomias 13, 18 e 21 (Wu, X. et al., 2021).

1.3.2 A criança com problemas do desenvolvimento

O desenvolvimento é resultado do efeito conjunto de uma rede complexa de vários fatores com capacidade de regular o crescimento e interações variadas como a importância da herança genética no crescimento, até às alterações hormonais durante a infância e a puberdade. O comprimento alcançado antes do nascimento e a exposição a fatores ambientais desde a infância, afetam o crescimento da criança. A relação entre a altura do bebé e a dos pais não é aparente ao nascimento, torna-se mais evidente a partir dos 2 anos de idade, e com o passar dos anos, a correlação torna-se maior

(Delemarre-van de Waal, H. A., 1993). Os fatores genéticos, ambientais e socioculturais também têm influência no desenvolvimento intelectual do indivíduo, tornando o défice cognitivo o transtorno do desenvolvimento mais comum, caracterizado por evidentes limitações no funcionamento intelectual e na conduta adaptativa (Belkady, B. et al., 2018; Katz G. et al., 2008).

1.3.2.1 Perturbações do desenvolvimento e distúrbios endócrino

O normal desenvolvimento de uma criança/jovem resulta do contributo de vários fatores: hereditários, sociais e ambientais (Delemarre-van de Waal, H. A., 1993).

No normal desenvolvimento da criança, podem surgir outras perturbações para além dos distúrbios do crescimento, nomeadamente o défice intelectual, as malformações congénitas, doenças hereditárias e alterações cromossómicas que geralmente exercem uma influência supressora. Para que o desenvolvimento da criança/jovem ocorra normalmente, diferentes hormonas atuam no corpo humano de forma a regular órgãos específicos que afetam diferentes sistemas ao nível do crescimento, desenvolvimento e distúrbios endócrinos. Desde antes do nascimento que as hormonas têm um papel fundamental no controlo e regulação do crescimento, no entanto, é após o nascimento que se tornam fundamentais evitando que ocorram alterações (Fowden, A. L., 1995).

As primeiras manifestações fenotípicas surgem muitas vezes na infância ou na puberdade, sendo necessário excluir as possíveis alterações responsáveis pelo quadro clínico desequilibrado no indivíduo.

Nas últimas décadas tem sido referido na literatura uma tendência crescente para o aparecimento precoce de sinais de desenvolvimento pubertário, sobretudo no sexo feminino (Castro-Correia, C. et al., 2015). As alterações em jovens do sexo feminino mais frequentemente encontradas são: baixa estatura, menarca e telarca em idades precoces. O motivo de estudo do cariótipo destas meninas deve-se sobretudo ao facto de existir suspeita de Síndrome de Turner (Delemarre-van de Waal, H. A., 1993). As alterações encontradas no sexo masculino ao contrário das encontradas no sexo feminino, incluem a alta estatura nas crianças/jovens e alterações dos caracteres sexuais

secundários como a ginecomastia que leva muitas vezes à suspeita de Síndrome de Klinefelter (Delemarre-van de Waal, H. A., 1993). As alterações associadas à genitália masculina, nomeadamente a criptorquidia e a hipospádias são também comuns e afetam cerca de 2-9 e 0,2-1%, respetivamente, da população do sexo masculino (Castro-Correia, C. et al., 2015).

1.3.2.2 Défice intelectual e malformações congénitas

De acordo com a OMS, o défice intelectual (DI) caracteriza-se por um transtorno definido pela presença de desenvolvimento mental incompleto ou interrompido, caracterizado principalmente pela deterioração de funções concretas como funções cognitivas, de linguagem, motoras e de socialização (Katz G. et al., 2008). Existem categorias, com base no QI, para caracterizar o estado intelectual do indivíduo, variando de um estado ligeiro a profundo. O DI afeta cerca de 3% da população mundial, de acordo com a OMS, no entanto as pessoas afetadas apresentam maioritariamente a forma leve (Belkady, B. et al., 2018). Dada a heterogeneidade da doença, a incidência e prevalência mundial, altamente variáveis, tendem a ser maiores em áreas de menor nível socioeconómico e em países em desenvolvimento devido a uma combinação de causas multifatoriais. Considera-se que exista uma maior prevalência de mulheres com DI em relação aos homens, cerca de 25 a 30%, devendo-se esse excesso em parte às mutações em genes do cromossoma X (Belkady, B. et al., 2018).

A deficiência intelectual é uma doença com enormes efeitos sociais, não afeta apenas os portadores da doença, mas também a família e a sociedade. As alterações cromossómicas patogénicas são a causa genética mais comum de DI, sejam elas numéricas ou estruturais, sendo a síndrome de Down a alteração cromossómica mais comum. As principais alterações estruturais responsáveis por DI são, por um lado, as deleções e, por outro os cromossomas derivativos das translocações, gerando na maioria das vezes uma deleção parcial de um cromossoma, associada a uma trissomia parcial de outro cromossoma (Belkady, B. et al., 2018). A história clínica destes doentes deve incluir os resultados de todos os estudos anteriores, incluindo uma árvore

genealógica de pelo menos três gerações e informação, caso exista, de antecedentes familiares de atraso mental, doenças psiquiátricas e anomalias congênicas (Katz G. et al., 2008). O exame físico deve focar sobretudo avaliações fenotípicas neurológicas e comportamentais mas também em alterações secundárias e malformações congênicas (Katz G. et al., 2008). A especialidade de genética médica é a mais indicada para a avaliação dos doentes com patologias do desenvolvimento psicomotor.

1.4 Diagnóstico citogenético na atividade assistencial do hospital terciário

O diagnóstico citogenético tem como objetivo identificar alterações cromossómicas em indivíduos com história clínica ou reprodutiva de possível associação etiológica a cromossomopatias. Este tipo de diagnóstico pode ser realizado em contexto pré e pós-natal. Neste projeto realizado no Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética Médica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), as análises são realizadas na área pós-natal. O Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) é um hospital terciário com diversas especialidades médicas, nas quais o diagnóstico citogenético é requisitado em contexto pós-natal para dar resposta a diferentes áreas e consultas no acompanhamento clínico dos utentes.

O diagnóstico pós-natal consiste na análise pela citogenética convencional, que permite a visualização total do genoma constituído pelo complemento dos cromossomas de cada célula, a partir de culturas celulares de linfócitos, obtidos através do sangue periférico. Este diagnóstico é solicitado em consultas de diferentes especialidades médicas, nomeadamente: genética médica, endocrinologia, ginecologia, urologia, medicina da reprodução, desenvolvimento da criança/adolescente, medicina e neurologia.

As principais indicações clínicas para o estudo do cariótipo convencional incluem: infertilidade primária ou secundária; menopausa precoce; alterações do desenvolvimento e endócrinas em crianças e jovens; indivíduos com alterações dos caracteres sexuais secundários; quadro clínico com dismorfismos e/ou anomalias congênicas múltiplas sugestivas de cromossomopatia; défice intelectual ou atraso de

desenvolvimento psicomotor; suspeita de síndrome de deleção/microdeleção/duplicação; história de familiar portador de cromossomopatia.

Nestes estudos etiológicos, as alterações cromossómicas são um dos diagnósticos realizados na avaliação de um grande grupo de patologias. Atualmente, com as diversas ferramentas de diagnóstico à disposição da clínica na área da genética, desde a citogenética convencional até à sequenciação massiva, as tecnologias de citogenética, genómica e biologia molecular, permitem uma caracterização abrangente e também direcionada do genoma. É fundamental que a estratégia de diagnóstico seja adequada à situação clínica, na melhor relação custo benefício para o utente e para a instituição tendo em conta os recursos tecnológicos disponíveis.

1.5 Objetivos deste estudo

Com o desenvolvimento deste trabalho, pretende-se:

- avaliar a importância do diagnóstico citogenético em pós-natal para as diferentes áreas clínicas no Hospital Terciário CHUC;
- interpretar os mecanismos biológicos associados às cromossomopatias e correlacionar com o quadro clínico;
- definir a importância desta ferramenta de diagnóstico, como teste de primeira ou segunda linha, nos diferentes contextos clínicos.

Estes objetivos serão alcançados através do levantamento retrospectivo, num grupo alargado de utentes, das indicações clínicas e dos seus cariótipos, concluindo sobre a importância da citogenética convencional, na qualidade assistencial da resposta ao utente.

Capítulo II - Materiais e Métodos

2.1 Grupo de estudo – distribuição pela indicação clínica

O levantamento retrospectivo dos utentes enviados pelas diferentes consultas para o estudo citogenético, foi realizado de forma anonimizada, englobando 3357 amostras. Integrei a equipa do Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética Médica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) de setembro de 2021 a junho de 2022.

Os utentes incluídos no estudo, são referenciados pelas diversas especialidades médicas e foram organizados nos grupos etiológicos:

1 - Indivíduos com problemas reprodutivos:

- Infertilidade primária (no casal; de causa masculina; de causa feminina)
- Infertilidade secundária (casais com abortos de repetição; casais com nado morto/feto anterior malformado)
- Mulheres com POF

2 – Indivíduos com problemas do desenvolvimento/malformações congénitas e distúrbios do crescimento e/ou endócrino

- Autismo, défice intelectual e atraso de desenvolvimento psicomotor
- Baixa estatura
- Baixa estatura e outras alterações fenotípicas
- Alterações endócrinas e dos caracteres sexuais secundários (femininos e masculinos)
- Suspeita de Síndrome/alteração cromossómica
- Distúrbios neurológicos/ epilepsia

3 – Estudos familiares por portador de cromossomopatia

2.2 Citogenética Convencional

À chegada ao Laboratório de Citogenética, as amostras encontram-se identificadas com os dados do utente concedidos pelo Centro Hospitalar e Universitário

de Coimbra (CHUC). É-lhes atribuído um número interno (CGS) em sequência e anual (ex: CGS 123/21) no laboratório. Na informação relevante para o estudo, inclui-se: idade, sexo, consulta/médico e a informação clínica. As amostras de sangue periférico são colhidas em heparina sódica.

O procedimento de citogenética convencional em pós-natal inclui as seguintes etapas: identificação de amostras; estabelecimento e manipulação da cultura (meio de cultura PB-MAX, solução de MTX, solução de timidina, meio de cultura pós-MTX, solução hipotónica e fixador 3:1 metanol-ácido acético); espalhamento; bandagem e análise cromossómica ao microscópio.

2.2.1 Cultura sincronizada de linfócitos para obtenção de prometafases

Preparação da cultura celular

São estabelecidas duas culturas de sangue periférico heparinizado para cada utente. Na câmara de fluxo laminar, adicionar cerca de 0,5ml de sangue periférico aos 5ml de meio de cultura completo (PB-MAX, Gibco®). Homogeneizar e colocar na incubadora a 37°C com uma inclinação de 45° para um acesso mais uniforme das células a todo o meio de nutrientes.

As prometafases são obtidas a partir de culturas sincronizadas de linfócitos de sangue periférico, pelos procedimentos de rotina do laboratório (protocolos adaptados a partir do manual Current Protocols in Human Genetics (Haines et al., 1995).

Sincronização do ciclo celular

Após 48 ou 72 horas de incubação, adicionar 0,5µl de solução stock de Metotrexato 55µmol/ml (5×10^{-3} µM final) a cada cultura, homogeneizar a cultura suavemente, e incubar a 37°C com inclinação de 45° durante 17 horas.

Após a incubação, renovar o meio das amostras depois de as centrifugar 10 minutos a 1200 rpm e remover o sobrenadante. O novo meio adicionado é constituído por: 5ml de RPMI (1640 com Glutamax-Gibco®), suplementado com 1ml de FBS 10%

(Gibco®) e 1µl de penicilina/estreptomicina 1% (antibiótico Gibco®), para cada cultura. Adicionar 50µl de timidina (10^{-3} M) a cada tubo, homogeneizar e incubar durante 5 horas.

O Metotrexato (MTX), é um inibidor utilizado para boquear todas as células do ciclo celular na fase S, por redução dos níveis de timidina disponível. Mais tarde, o novo meio adicionado, vai permitir às células avançar para a fase G2 do ciclo celular e prosseguir. No entanto, devido à toxicidade do MTX, a cultura não deve ser bloqueada por um período superior a 18 horas (Haines et al., 1995).

Bloqueio do ciclo celular em metafase

Após incubação, adicionar 50µl de colcemida 10 µg/ml (0,05 µg/ml final) (KaryoMax colcemida solution, Gibco®) a cada cultura, homogeneizar e incubar durante 10 minutos a 37°C.

Ao ligar-se à tubulina, a colcemida inibe a formação do fuso acromático, impossibilitando a separação dos cromátídeos irmãos na anafase. Este tratamento resulta numa paragem mitótica, que por sua vez leva a uma acumulação de células em metafase.

Choque hipotónico

Após centrifugação durante 10 minutos a 1200rpm, remover o sobrenadante e adicionar 5 ml de solução hipotónica de cloreto de potássio (75mM), previamente aquecido a 37°C e incubar cerca de 25 minutos a 37°C.

Para realizar o choque hipotónico é usado cloreto de potássio (KCL) para promover a turgescência celular e ajudar à dispersão dos cromossomas na célula.

Fixação com solução de metanol-ácido acético (3:1)

Após centrifugação durante 10 minutos a 1200rpm e remoção do sobrenadante. A fixação das células é realizada com uma solução de metanol-ácido

acético (3:1), denominado fixador. A 1ª fixação realiza-se sob agitação contínua no vórtex, de modo a prevenir a formação de coágulos e adiciona-se 4ml de fixador preparado no próprio dia. A 2ª e 3ª fixação repete o passo anterior, não sendo necessária agitação contínua e entre elas, reservar as amostras no frio para a estrutura da cromatina repousar a -4°C durante 20 minutos.

A utilização de uma solução de metanol-ácido acético (3:1), provoca a morte celular por desidratação e preservando a estrutura da cromatina. A 1ª fixação é crucial na obtenção de uma boa qualidade no resultado, uma vez que serve para a estabilização de lípidos e proteínas. Se a fixação não for efetuada de forma correta, a estrutura do citoesqueleto não se desintegrará completamente e vai originar cromossomas enrolados e sobrepostos resultando num espalhamento de má qualidade.

Espalhamento

Os sedimentos celulares são espalhados em lâminas de vidro, previamente limpas, numa câmara de espalhamento com as condições de temperatura e humidade controladas, 22°C e 54% de humidade relativa. Segue-se o envelhecimento das lâminas histológicas numa estufa a 80°C, durante 3/4 horas, para realizar após a desnaturação, a bandagem GTL e a bandagem CBG quando necessário.

2.2.2 Bandagem dos cromossomas

A bandagem é uma técnica de coloração que serve para produzir um padrão de bandas específico de cada par de cromossomas homólogos. O padrão de bandas obtido será idêntico de célula para célula, de tecido para tecido e, exceto em regiões polimórficas, de indivíduo para indivíduo dentro da mesma espécie. Existem técnicas de bandagem especializadas para regiões específicas dos cromossomas: bandagem NOR (Nucleolus Organizing Region) destina-se à coloração das regiões NOR presentes nos satélites dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos (pode ser substituída por uma sonda FISH de rRNA); para a coloração dos centrómeros e regiões heterocromáticas, a bandagem C (identifica toda a heterocromatina centroméricas e

distal Y e revela polimorfismos) e para identificar todos os cromossomas do indivíduo e as respetivas bandas, a bandagem GTG/GTL (Tripsina-Giemsa; Tripsina-Leishman). A escolha da técnica varia com a finalidade do estudo e portanto da região que se pretende visualizar.

Bandagem G

O método de coloração GTL é dos mais utilizados nos laboratórios de citogenética visto ser um método simples e as lâminas marcadas podem ser mantidas durante meses sem que haja detioração. A bandagem G permite não só a deteção de alterações cromossómicas, nomeadamente numéricos, como também de rearranjos estruturais cruciais para o diagnóstico.

Este método inclui o tratamento das lâminas com uma protease (tripsina) e posterior coloração com corante Giemsa (GTG') ou Leishman (GTL), no Laboratório de Citogenética do CHUC, a bandagem é realizada com o corante Leishman. A bandagem GTL segue a seguinte sequência:

Incubar numa solução de tripsina [0,02g/mol] (37°C), durante alguns segundos (ajustar o tempo depois de avaliar o estado de cada caso).

Este é um passo fundamental na aparência final dos cromossomas porque a tripsina é uma enzima proteolítica, logo o tempo que as lâminas se encontram expostas é determinante.

Lavar numa solução salina de NaCl [0,9%] (37°C). Lavar a lâmina em seguida em 50 ml de tampão Gürr (pH=6,8 a 37°C) e colocar a incubar durante 6 a 8 minutos em Corante de Leishman (5%) (16 ml de Corante de Leishman filtrado + 80 ml de tampão Gürr) (à temperatura ambiente). Terminada a incubação no corante, lavar a lâmina em 50 ml de tampão Gürr (37°C), seguidamente em água e deixar a lâmina secar à temperatura ambiente para a avaliar ao microscópio.

Bandagem CBG/Banda C

A técnica de bandagem CBG, marca seletivamente a heterocromatina junto aos centrómeros, as áreas polimórficas presentes nos cromossomas 1, 9, 16 e no cromossoma Y. Regiões com marcação após a banda C, contém DNA repetitivo, DNA α -satélite e algum DNA codificante não repetitivo Leishman (Rooney, D. E., 2001). Este método é ainda utilizado para determinar a presença de cromossomas dicêntricos e pseudodicêntricos e também para o estudo de cromossomas marcadores (Gersen, S., & Keagle, M., 2013).

A bandagem CBG segue a seguinte sequência:

Incubar 10 minutos em HCl 1N e lavar em água destilada. Incubar numa solução de hidróxido de bário (2,5g de hidróxido de bário preparada em 50ml de água destilada) preparada previamente estando durante este tempo em agitação contínua e aquecida na placa térmica.

O hidróxido de bário tem uma função desnaturante e o tempo de exposição depende da "idade" do sedimento/lâmina histológica.

Após a desnaturação, lavar as lâminas duas vezes em água para remoção da película de bário. Incubar as lâminas para a solução de 2xSSC a 56°C durante uma hora.

Coloração durante 15 minutos no corante Giemsa 4% (2,5 ml de corante Giemsa em 47,5 ml de tampão Gürr).

Lavar as lâminas duas vezes em tampão Gürr e deixar secar à temperatura ambiente.

2.2.3 Análise ao microscópio

Após a bandagem os cromossomas são analisados ao microscópio ótico, são analisadas no mínimo 15 metafases com cromossomas de boa qualidade e com poucas sobreposições (bom espalhamento e coloração). Após a captura de metafases usando o software específico, cytovision®, são construídos os kariogramas e analisada a sua

estrutura. O cariótipo final é estabelecido com base nas regras de nomenclatura internacionais [ISCN, 2020]. Nos casos de mosaicismo, o número de metafases avaliadas pode atingir as 30 a 50, em ambas as culturas estabelecidas.

Capítulo III - Resultados

A análise retrospectiva dos resultados de 3357 amostras distribuíram-se pelos seguintes grupos etiológicos: Indivíduos com problemas reprodutivos; Indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino e Indivíduos em contexto de estudos familiares (Gráfico 1). A incidência global de cromossomopatias, traduziu-se num total de 301 resultados com diferentes alterações. Para a sistematização dos resultados, organizaram-se 19 Tabelas, seis das quais presentes no capítulo III e as restantes 14 no Apêndice 1 e três Gráficos (Capítulo III), para uma visualização e interpretação mais adequada.

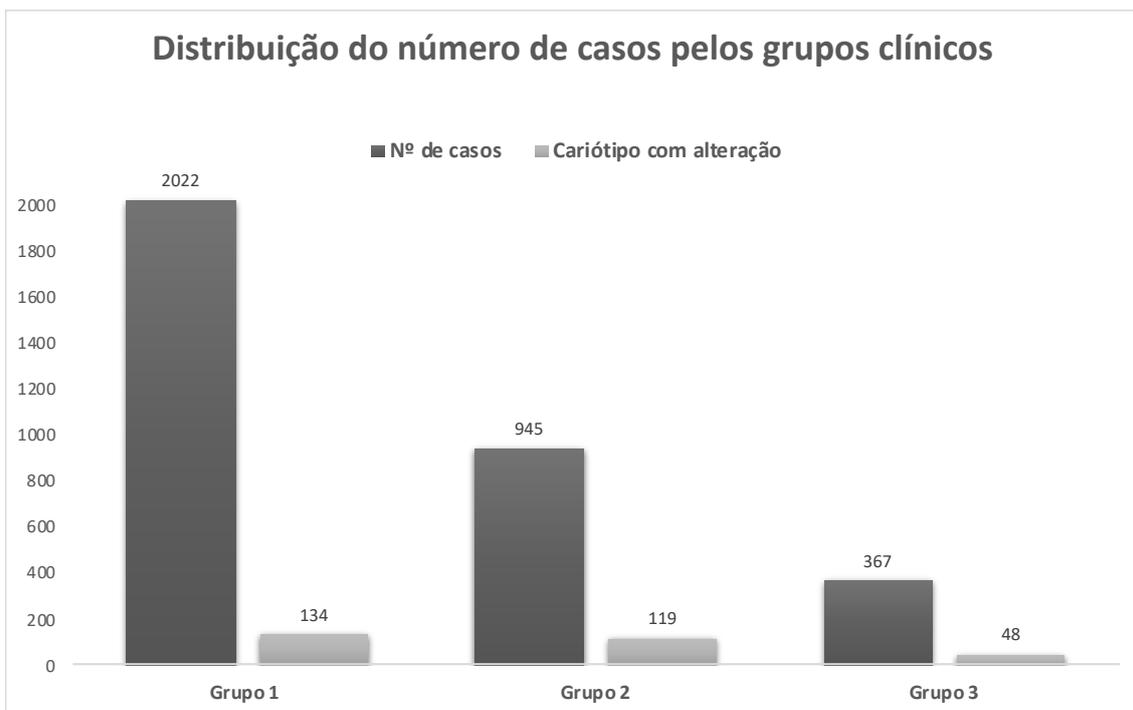


Gráfico 1 - Distribuição dos casos analisados por grupos, de acordo com a informação clínica de cada utente. Grupo 1: Indivíduos com problemas reprodutivos; Grupo 2: Indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino e Grupo 3: Indivíduos em contexto de estudos familiares

Nos 3357 utentes estudados por técnicas de citogenética convencional revelaram em 3056 (91%) amostras um cariótipo normal e 301 (9%) com resultado patológico. O grupo que abrange maior número de utentes é o grupo 1, relacionado com

problemas reprodutivos. A incidência das cromossomopatias detetadas nos grupos etiológicos, está esquematizada na tabela 1. Numa primeira abordagem os resultados anormais obtidos nos diferentes grupos clínicos, num total de 301, foram distribuídos de acordo com o tipo de alteração (Tabela 1 e 2): aneuploidias dos cromossomas sexuais; aneuploidias dos autossomas; anomalias estruturais dos autossomas e anomalias estruturais envolvendo os gonossomas.

Tabela 1 - Distribuição do total dos 301 casos pelos diferentes tipos de cromossomopatias no total dos 3357 cariótipos realizados

	Nº de casos com cromossomopatias	Incidência no nº de casos com cromossomopatias (%)
Alterações numéricas	161	53,5
Autossomas	27	9,0
Mosaico dos autossomas	5	1,7
Cromossomas sexuais	67	22,3
Mosaico dos cromossomas sexuais	62	20,6
Alterações estruturais	135	44,9
Equilibradas	80	26,6
Translocações Recíprocas	50	16,6
Translocações Robertsonianas	14	4,7
Inversões	16	5,3
Desequilibradas	55	18,3
Deleções	12	4,0
Duplicações	7	2,3
Cromossomas em anel	2	0,7
Isocromossomas	6	2,0
Isodicêntrico	6	2,0
Cromossoma marcador	6	2,0
Derivativos	14	4,7
Regiões frágeis	2	0,7
Gonossomas discordantes de fenótipo	5	1,7
Total	301	100

A incidência no número de casos refere-se à percentagem de cada alteração dentro do grupo com cromossomopatias, composto por 301 cariótipos alterados.

As 161 aneuploidias encontradas, representam o grupo de alterações mais numeroso, sendo que cerca de 67 dessas alterações foram encontradas na forma de mosaico. Embora representem 53,5% das alterações, apresentam uma incidência global de 4,8%. As alterações estruturais, com uma incidência global de 4%, caracterizam-se por alterações equilibradas e desequilibradas, encontradas em cerca de 80 e 55 casos, respetivamente, e portanto revela uma incidência inferior à das alterações numéricas.

Tabela 2 - Frequência dos diferentes tipos de cromossomopatias detetadas nos 3 grupos etiológicos estudados, com divisão do grupo dos indivíduos com problemas reprodutivos em infertilidade primária e infertilidade secundária

Grupo	Problemas reprodutivos		Distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino	Contexto de estudos familiares
	Infertilidade primária	Infertilidade secundária		
Alterações numéricas	83		74	4
Autossomas	0	0	27	0
Mosaico dos Autossomas	0	2	3	0
Cromossomas sexuais	36	1	30	0
Mosaico dos Cromossomas sexuais	14	30	14	4
Alterações estruturais	48		43	44
Equilibradas	34		7	39
Translocações Recíprocas	6	13	4	27
Translocações Robertsonianas	3	4	2	5
Inversões	2	6	1	7
Desequilibradas	14		36	5
Deleções	4	1	7	0
Duplicações	2	0	3	2
Cromossomas em anel	0	0	2	0
Isocromossomas	1	1	4	0
Isodicêntrico	1	0	5	0
Cromossoma marcador	1	0	3	2
Derivativos	3	0	10	1
Regiões frágeis	0	0	2	0
Cromossomas discordantes de fenótipo	3	0	2	0
Total	76	58	119	48

Número de casos com cromossomopatias referentes a cada tipo de alteração dentro dos grupos definidos.

A análise da tabela 2, revela detalhadamente a incidência de cada tipo de cromossomopatia encontrada em cada um dos grupos. O grupo dos indivíduos com problemas reprodutivos apresenta maioritariamente aneuploidias dos cromossomas

sexuais, sendo que mais de metade estão associadas a mosaico. Também o grupo que engloba os distúrbios do crescimento, perturbações do desenvolvimento e/ou endócrino, é constituído em grande parte por alterações cromossómicas numéricas, no entanto distribui-se por 30 alterações nos autossomas e 44 nos cromossomas sexuais. Neste grupo as alterações encontradas não são maioritariamente em mosaico, portanto, como se verifica pela análise da informação clínica, existe na maioria das vezes, manifestação de quadro clínico sindrómico. No grupo de indivíduos em contexto de estudo familiar, ao contrário do que acontece nos dois primeiros grupos, as alterações estruturais são encontradas na maioria dos casos, com maior prevalência das alterações equilibradas.

Alterações em indivíduos com problemas reprodutivos

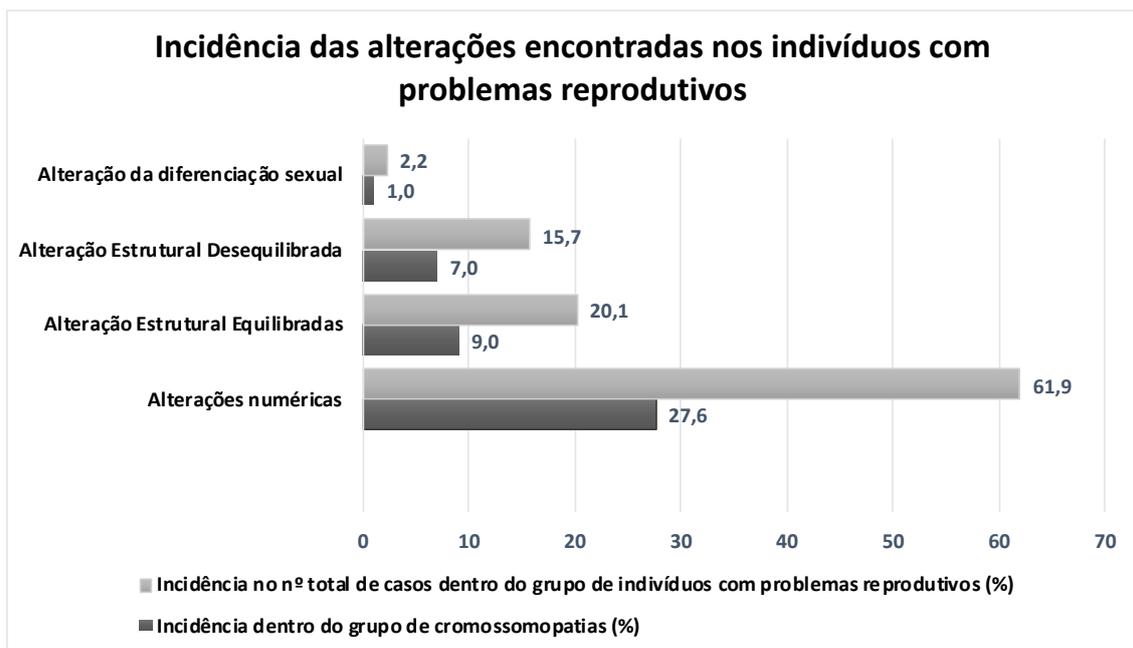
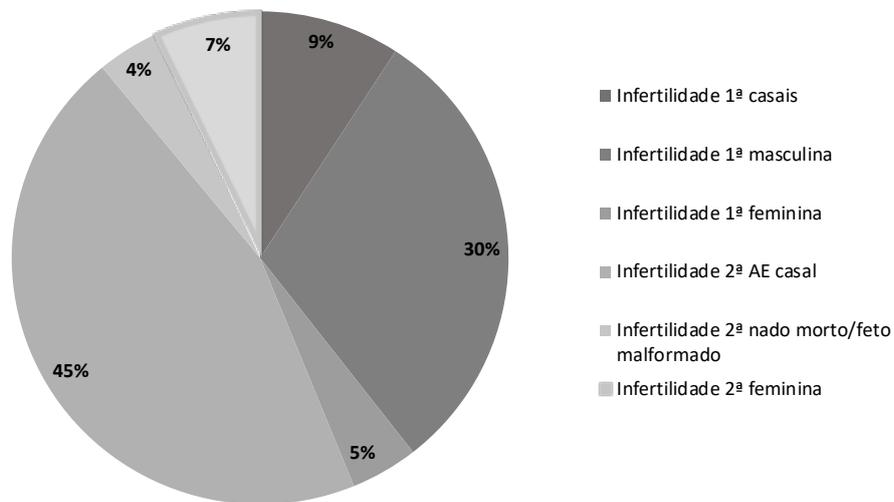


Gráfico 2 - Incidência das alterações encontradas em indivíduos com problemas reprodutivos dentro do grupo e dentro do grupo destes indivíduos com cromossopatias

Distribuição dos utentes com prolemas reprodutivos pelos tipos de infertilidade

**Gráfico 3** - Frequência das causas de infertilidade em indivíduos com prolemas reprodutivos

O grupo de indivíduos com problemas reprodutivos engloba todas as causas de infertilidade primária e secundária. Dentro da infertilidade primária, a infertilidade de causa masculina é a que apresenta maior incidência (30%), foram estudados 613 indivíduos e 58 apresentaram cariótipos com cromossomopatias. Este resultado já era expectável, uma vez que a grande maioria destes utentes são encaminhados das consultas de infertilidade/urologia por apresentarem alteração no espermograma ou dos caracteres sexuais secundários masculinos. Na infertilidade secundária, a causa de infertilidade com maior incidência são os abortos de repetição com mais de 45%, reunindo cerca de 419 casais, 60 mulheres e 14 homens (sem cônjuge) nas consultas de Pré-concepcional, Reprodução Humana ou Aconselhamento Genético a partir das quais foram encaminhados.

A prevalência de alterações numéricas verificadas nos indivíduos com infertilidade primária com suspeita de causa masculina (6,5%) e/ou feminina (6,7%) é bastante superior à verificada nos casais (2,2%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Incidência de cada tipo de cromossomopatia em casais/utentes do sexo masculino e feminino com infertilidade primária

Grupo	Infertilidade primária					
	Casal		Masculina		Feminina	
Alterações	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)
Numéricas	50	2,2	69,0	6,5	60	6,7
Estruturais Equilibradas	38	1,6	12,1	1,1	0	0,0
Estruturais Desequilibradas	12,5	0,5	13,8	1,3	40	4,5
Gonossomas discordantes de fenótipo	0	0	5,2	0,5	0	0
Total	100	4,3	100	9,5	100	11,2

Nos 40 indivíduos com infertilidade de causa masculina com cromossomopatia identificada, cerca de 30 apresentam Síndrome de Klinefelter (47,XXY) (Figura 9) e quatro apresentam um cariótipo 47,XYY (Tabela 10). As indicações clínicas englobam geralmente: azoospermia, oligospermia, oligoastenoteratospermia severa (OAT severa) e suspeita de Síndrome de Klinefelter.



Figura 9 - Cariograma humano de um indivíduo com Síndrome de Klinefelter com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 47,XXY [ISCN, 2020] (Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra).

Na infertilidade de causa feminina, a monossomia 45,X (Figura 10) é observada apenas uma vez nestas mulheres, no entanto em mosaico está presente em sete casos (Tabela 11). Embora os casos encontrados em mosaico não estejam associados a um fenótipo da Síndrome de Turner, os indivíduos apresentam infertilidade, amenorreia primária e/ou insuficiência ovárica primária.

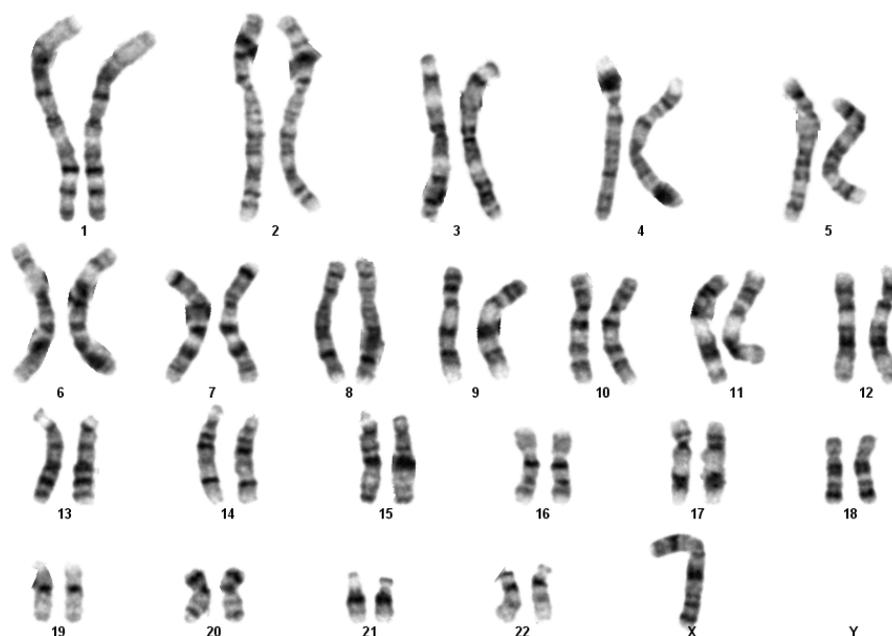


Figura 10 - Cariograma humano de um indivíduo com Síndrome de Turner com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo feminino com cariótipo 45,X [ISCN, 2020] (Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra).

Tabela 4 - Incidência de cada tipo de alteração encontrada nos casais com abortos, casais com nado/feto anterior com malformado e infertilidade secundária em mulheres (POF)

Grupo	Infertilidade secundária					
	Abortos no casal		Nado/feto anterior malformado		Feminina (POF)	
Alterações	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)
Numéricas	53,5	0,1	50	1,3	69,2	6,3
Estruturais Equilibradas	46,5	0,1	50	1,3	15,4	1,4
Estruturais Desequilibradas	0	0	0	0	15,4	1,4
Total	100	0,2	100	2,5	100	9,2

Na infertilidade secundária, o grupo de utentes com abortos de repetição é o grupo que engloba o maior número de indivíduos estudados com 419 casais, 60 indivíduos do sexo feminino e 14 do sexo masculino que vieram das consultas de Pré-Concepcional, Medicina da Reprodução e Aconselhamento Genético, representando 45% dos casos de indivíduos com problemas reprodutivos (Gráfico 3). Das 43 cromossomopatias encontradas nos casais com abortos de repetição (0,2%), 22 estão associadas às alterações numéricas dos cromossomas sexuais em mosaico, apenas uma mulher de 31 anos com indicação clínica por abortos de repetição e sem filhos, apresentou um cariótipo 47,XXX (Figura 11). As alterações estruturais equilibradas representam 46,5% neste grupo: seis inversões, três translocações Robertsonianas e doze translocações recíprocas. Identificou-se uma mulher portadora de uma translocação recíproca e simultaneamente de uma aneuploidia em mosaico, mos45,X,t(2;6)(q24.2;p21.1)/47,XXX,t(2;6)(q24.2;p21.1)/46,XX,t(2;6)(q24.2;p21.1) (Tabela 12).



Figura 11 - Cariograma humano de um indivíduo com Síndrome de triplo X com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo feminino com cariótipo 47,XXX [ISCN, 2020] (Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra).

Os indivíduos deste grupo não desenvolveram alterações fenotípicas severas, no entanto apresentam indicações de alterações reprodutivas como azoospermia e

oligospermia e no caso feminino, amenorreia primária e em alguns casos alterações dos caracteres sexuais secundários.

Os casais estudados por nado/feto malformado/com cromossomopatias apresentam apenas dois cariótipos alterados. Detetou-se uma alteração estrutural num homem com 27 anos com um cariótipo 46,XY,inv(11)(p11.2q21) e uma alteração de ploidia do cromossoma X em mosaico encontrada numa mulher de 35 anos com um cariótipo mos 47,XXX/45,X/46,XX, descritos na tabela 12.

As mulheres com infertilidade secundária (POF), têm alterações numéricas que representam 69,2% enquanto as estruturais quer equilibradas quer desequilibradas, têm uma frequência de 15,4% (Tabela 4), no total das 13 cromossomopatias encontradas (Tabela 13). Como se encontram sempre em forma de mosaico, estas utentes não apresentam fenótipos severos de Síndrome de Turner, apenas manifestam falência ovárica precoce (FOP) e amenorreia secundária, sem outras alterações.

Alterações em indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbações do desenvolvimento e/ou endócrino

Tabela 5 - Incidência de cada tipo de alteração nos indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino

Alterações	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)
Numéricas	61,2	7,6
Estruturais Equilibradas	5,8	0,7
Estruturais Desequilibradas	31,4	3,9
Cromossomas discordantes de fenótipo	1,7	0,2
Total	100	12,5

Dentro dos 968 indivíduos com problemas do crescimento/desenvolvimento e/ou endócrino, as alterações numéricas são responsáveis por cerca de 2/3 das alterações no grupo, seguidas das alterações desequilibradas (1/3), depois as alterações

equilibradas com apenas 5,8% e em menor percentagem e apenas com dois casos, os cromossomas discordantes de fenótipo, com uma incidência de 1,7. Dentro deste grande grupo que abrange um vasto quadro clínico com 118 alterações, existem subgrupos para melhor caracterização destas alterações fenotípicas (Tabelas 7 e 8).

Dentro deste grupo, 285 indivíduos foram diagnosticados com problemas do desenvolvimento e malformações congénitas, mais de metade das 27 alterações encontradas (Tabela 14) são alterações numéricas (55,6%) e as restantes estruturais desequilibradas (44,4%). Ao contrário do descrito na literatura, o Síndrome de Down (Figura 12) não foi a alteração mais vezes observada neste grupo, contando apenas com seis casos sendo um deles em mosaico. Esta incompatibilidade deve-se ao facto do desenvolvimento do diagnóstico pré-natal e à sua recorrente aplicação permitirem a deteção precoce destas aneuploidias.

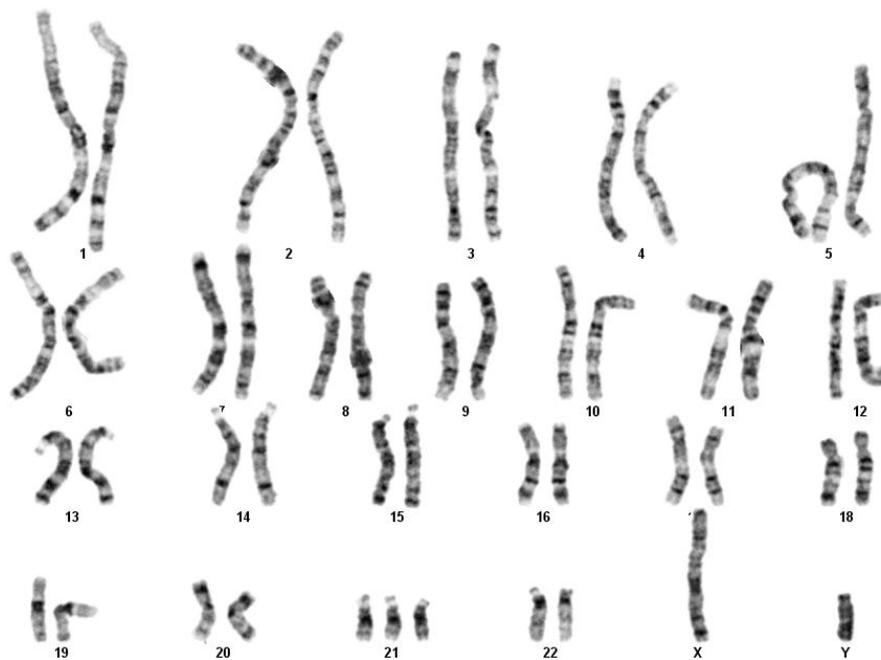


Figura 12 - Cariograma humano de um indivíduo com Síndrome de Down com um padrão de bandas G. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 47,XY,+21 [ISCN, 2020] (Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra).

As restantes alterações numéricas encontradas foram: dois casos de trissomia 18, um bebé de um dia com cardiopatia congénita, retrognatismo e sindactilia e outro bebé de 22 dias com um quadro clínico mais severo; um caso de trissomia 16 (mosaico) num indivíduo com nove anos encaminhado com microssomia, manchas cutâneas,

atraso de desenvolvimento psicomotor (ADPM) e possível mosaicismo. As manifestações fenotípicas da maioria destes indivíduos são de um quadro clínico grave, sobretudo em indivíduos com malformações podendo em casos de défice intelectual e ADPM, variar de ligeiro a severo.

No grupo de 322 indivíduos com distúrbios do crescimento, foram encontradas 12 alterações (Tabela 15), sendo a maioria das alterações encontradas numéricas em mosaico e estruturais desequilibradas ligadas ao cromossoma X. O fenótipo destes indivíduos geralmente está de acordo com a alteração obtida e as meninas/jovens estudadas apresentam sempre e apenas baixa estatura.

No grupo dos distúrbios endócrinos em indivíduos do sexo feminino e masculino, é de esperar que estes jovens desenvolvam telarca e menarca precoces e tenham características, como ginecomastia, do Síndrome de Turner. Neste estudo, as alterações numéricas tiveram uma incidência 74% dos casos, e como previsto, o mosaicismo 45,X associado à Síndrome de Turner e o cariótipo 47,XXY de Síndrome de Klinefelter, foram as anomalias mais frequentemente encontradas nestes indivíduos.

Este grupo de indivíduos engloba ainda os casos em que se estudou o indivíduo por suspeita de síndrome uma vez que apresentavam um quadro clínico muito semelhante ao da patologia. Dos 109 casos, 57 confirmaram ter na sua constituição, cromossomopatias (Tabela 8). Dentro das alterações numéricas (69%), 21 são associadas aos autossomas (trissomia 21) e 19 aos cromossomas sexuais embora quatro fossem situações mosaico. Por último e representando apenas um pequeno grupo de 20 indivíduos com distúrbios neurológicos e epilepsia, as três alterações estruturais desequilibradas encontradas foram um cromossoma 20 em anel, 46,XX,r(20)(::p13->q13.3::)[11]/46,XX.ish, numa mulher de 23 anos com indicação clínica: atraso desenvolvimento psicomotor; epilepsia refratária com suspeita de cromossoma 20 em anel, um derivativo de origem conhecida (translocação) e uma deleção, ao nível dos autossomas (Tabela 18).

Alterações em indivíduos para estudo familiar por portador de cromossomopatia

Tabela 6 - Incidência de cada tipo de alteração encontrada nos indivíduos para estudo familiar por portador de cromossomopatia

Alterações	Incidência no nº de casos com cromossomopatias	Incidência no nº total de casos do grupo (%)
Numéricas	8,3	1,1
Estruturais Equilibradas	81,3	10,6
Estruturais Desequilibradas	10,4	1,4
Total	100	13,1

Na análise da tabela 6, foram incluídos 367 indivíduos estudados por familiar portador de cromossomopatia, 51 grávidas. Das 48 alterações detetadas, 81,3% foram estruturais equilibradas distribuídas por 27 translocações recíproca, cinco translocações Robertsonianas (Figura 13) e sete inversões (Tabela 19), todas ao nível dos autossomas.

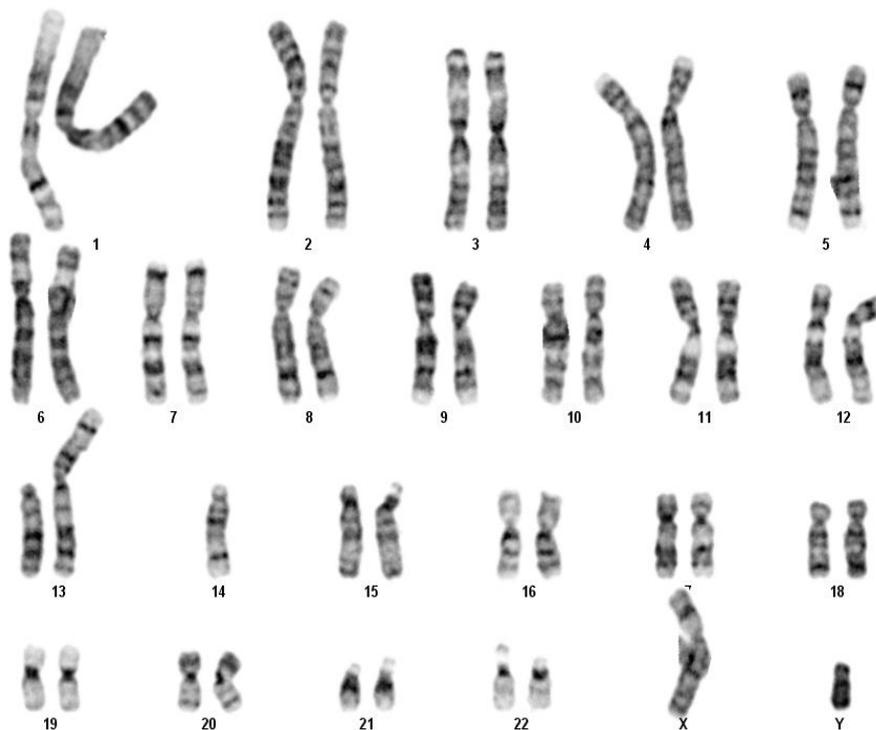


Figura 13 - Cariograma humano com uma translocação Robertsoniana com um padrão de bandas GTL. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 45,XY,der(13;14)(q10q10) [ISCN, 2020] (Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra).

Capítulo IV - Discussão

A avaliação retrospectiva dos resultados da análise citogenética de 3357 utentes, comprovou o que está descrito na literatura, em que as alterações numéricas dos cromossomas sexuais são as mais comuns de entre todas as alterações citogenéticas (Gersen, S., & Keagle, M., 2013), com 129 resultados no total de 301 alterações. A incidência de anomalias estruturais e de aneuploidias nos cromossomas sexuais é mais representativa quando comparada à incidência nos autossomas. Estão descritas aneuploidias dos cromossomas sexuais, com 47, 48 ou 49 cromossomas, muitas vezes em mosaico com uma linha celular normal, mais frequente do que nos autossomas, facto que se comprova pela análise da tabela 1. Assim, a perda de um cromossoma sexual por não-disjunção durante a gametogénese é um acontecimento relativamente comum que leva à formação de zigotos monossómicos ou supranumerários para cada um dos cromossomas sexuais (Bondy e Cheng, 2009).

O grupo de indivíduos com problemas reprodutivos, abrange a infertilidade primária e secundária, e os resultados encontram-se descritos nos gráficos 2 e 3 e nas tabelas 3 e 4. A infertilidade é um dos crescentes problemas em saúde pública, devido não só às suas causas genéticas mas também às causas ambientais. A infertilidade em casais (15%) varia geralmente entre 50% a 60% de causa masculina, afetando cerca de 20 milhões de homens em todo o mundo e a restante é atribuída à causa feminina (Barros, B. M., 2020). O estudo revelou uma incidência inferior à descrita na literatura, com uma infertilidade de 4,3% nos casais, no entanto a distribuição da causa etiológica é semelhante à relatada, atribuindo 50% das alterações encontradas ao sexo feminino e 50% ao sexo masculino. A distribuição das alterações encontradas nos casais com infertilidade primária (Tabela 9), foram três aneuploidias do cromossoma X em mosaico, um indivíduo com Síndrome de Klinefelter e as restantes, quatro alterações estruturais desequilibradas. Depois de estudados, a maioria destes indivíduos são acompanhados em consultas de Pré-Concepcional/Reprodução Humana e Esterilidade, para eventualmente se submeterem aos métodos de reprodução medicamente assistida.

A distribuição dos casos com alterações no grupo de indivíduos com infertilidade primária de causa masculina (Tabela 10), revelou em mais de 50% das 58 alterações encontradas nestes indivíduos, uma superioridade de casos com Síndrome de Klinefelter e Síndrome XYY, como era expectável. No entanto, muitos destes indivíduos não são identificados precocemente, uma vez que podem apresentar poucas ou nenhuma manifestações fenotípicas, nomeadamente: OAT severa; espermograma a revelar azoospermia e/ou oligospermia e/ou criptozoospermia; astenoterazoospermia; criptorquida (por vezes corrigida na infância); Suspeita de Síndrome de Klinefelter e Insucesso em PMA ou ainda outras manifestações de infertilidade no homem.

Das alterações encontradas nestes indivíduos, 30 apresentavam Síndrome de Klinefelter e quatro um cariótipo 47,XYY. As alterações estruturais equilibradas (12,1%), como era de esperar que fossem também de grande prevalência, nomeadamente as translocações recíprocas, foram encontradas em cinco destes homens (duas entre autossomas e cromossomas sexuais e três ao nível dos autossomas), uma Translocação Robertsoniana e uma inversão. Um dos indivíduos com cariótipo alterado apresentava uma deleção ao nível do cromossoma Y, no entanto, sem fenótipo alterado e encaminhado da consulta apenas com a informação de azoospermia e infertilidade, foi confirmada por FISH, a presença do gene SRY. Foi ainda identificado um indivíduo de 47 anos, portador de um cariótipo 46,XX ish Xp22.3(SRY-), com a indicação clínica de infertilidade primária, azoospermia/esterilidade I e testículos atroficos bilateralmente sem massas palpáveis, no entanto a FISH revelou a ausência do gene SRY. Foram identificados quatro homens portadores de derivados catalogados, sendo que três deles envolvem ambos os gonossomas 46,XX,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.31).

No caso da infertilidade de causa feminina, esperava-se detetar maioritariamente alterações ao nível do cromossoma X, uma vez que estas mulheres apresentam desde amenorreia primária, baixa reserva ovárica, falhas de implantação e/ou insucesso em PMA, Síndrome de Rokitansky e Síndrome de Turner. A literatura indica que estas mulheres são portadoras, grande parte das vezes, de uma monossomia do X, e embora neste estudo fossem detetadas quase sempre em situação de mosaicismo, a linha celular 45,X, estava presente em quase todos cariótipos com

cromossomopatia. As alterações encontradas (Tabela 11), envolvem sobretudo alterações numéricas do cromossoma X (60%), quatro em mosaico e um caso de Síndrome de Turner. As alterações estruturais desequilibradas encontradas (40%), foram: um cariótipo com um isocromossoma e simultaneamente uma linha monossómica do X [mos 45,X/46,X,i(X)(q10)]; uma duplicação do braço curto de um autossoma, 46,XX,dup(4)(p12) e três deleções do cromossoma X duas em mosaico simultaneamente com monossomia do X.

A infertilidade pode também ser secundária e portanto nestes casos não há inicialmente dificuldade em engravidar mas sim em manter a gravidez, e este tipo de problema pode ser verificado em casais com abortos e/ou fetos malformados e em mulheres com falência ovárica precoce (POF). O aborto recorrente define-se como três ou mais abortos consecutivos, embora alguns autores considerem o limite de dois abortos, afetando cerca de 1% dos casais que tentam procriar (Knight SJ et al., 2006). Para um casal com história de abortos, o risco de recorrência na gravidez seguinte é de cerca de 25%, aumentando para cerca de 33% num casal com história de três abortos espontâneos. As causas dos abortos recorrentes permanecem por explicar em cerca de 80% dos casos, sugerindo a possibilidade de causas genéticas. Também nestes casos a idade materna é um fator de enorme relevância. Para as mulheres com três ou mais abortos espontâneos, o risco de um próximo aumenta de 40% aos 35 – 39 anos para 60% aos 40 – 44 anos (Andersen, A. M. N. *et al.*, 2000). Neste grupo de mulheres, a média de idades é de 36 anos, variando dos 17 aos 51 anos, comprovando que a idade é um fator de risco associada à gravidez.

Sabendo que em aproximadamente 3-4% dos casais com abortos de repetição, um dos membros é portador de um rearranjo estrutural equilibrado (De Braekeleer, M. et al., 1991; Knight SJ et al., 2006), a análise da tabela 4 permite concluir que embora neste estudo representem 0,1% dos casos, foram encontradas 12 translocações recíprocas, cinco inversões e três translocações Robertsonianas (Tabela 12). Os portadores destas translocações equilibradas são fenotipicamente normais, no entanto, pode ter ocorrido formação de gâmetas anormais devido à já referida segregação desequilibrada dos cromossomas na meiose e estes promoverem os abortos ou

nascimentos de fetos malformados. Existem diferentes padrões de segregação para os gâmetas formados por um portador de uma translocação recíproca (Fig.10): segregação alternada (2:2); segregação adjacente-1; segregação adjacente-2 e segregação 3:1 em que se formam normais, equilibrados e desequilibrados (Gardner, R. J. M. et al., 2004). Por esta razão, indivíduos portadores de translocações, têm filhos normais e filhos com alterações, podendo também estes serem portadores e não desenvolverem fenótipo como os progenitores.

Ainda dentro do grupo de indivíduos com problemas reprodutivos, as mulheres com infertilidade secundária (POF), apresentam sobretudo alterações envolvendo o cromossoma X (Tabela 13). Este tipo de alteração é considerada a causa genética mais comuns de POF, representando cerca de 9% dos casos do grupo com infertilidade secundária feminina. O cromossoma X apresenta um papel essencial na manutenção do desenvolvimento e função ovárica. As 13 alterações verificadas são maioritariamente numéricas em mosaico, aproximadamente 61,5%, existindo ainda casos de translocação recíproca entre gonossoma e autossoma, translocação Robertsoniana e deleção. A POF é uma das causas mais comuns de amenorreia em mulheres com menos de 40 anos de idade, a idade média das mulheres com este diagnóstico no estudo é de 38 anos. O cariótipo 47,XXX é frequentemente observado em mulheres com infertilidade secundária, que podem por vez manifestar alterações fenotípicas como hipogonadismo e amenorreia secundária que pode levar a distúrbios meióticos. A descoberta da causa permite o tratamento dirigido, mais precocemente, por exemplo através da reposição hormonal com estrogénios, permitindo atrasar o desenvolvimento de complicações associadas à FOP, nomeadamente a infertilidade, cujo único tratamento é a doação de ovócitos.

No grupo dos indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino, geralmente são apresentadas variadas formas de atraso desenvolvimento psicomotor, défice cognitivo e perturbação do desenvolvimento intelectual, portanto já existe um diagnóstico anterior. A principal causa de patologia em indivíduos com défice intelectual e/ou o atraso de desenvolvimento psicomotor é atribuída em cerca de 28% às anomalias cromossómicas

(Curry et al., 1997). A trissomia 21 (Síndrome de Down) é a causa mais frequente de atraso mental e afeta 1 em 1500 nados vivos, estando este tipo de alteração relacionado com o aumento da idade materna. Como descrito anteriormente, a trissomia 13 e a trissomia 18, são reportadas em nados vivos, no entanto na sua maioria, os bebés não ultrapassam as primeiras semanas após o nascimento. O facto dos cromossomas 13, 18 e 21 estarem entre os três cromossomas do genoma Humano mais carentes de genes, ajuda a explicar a viabilidade destas trissomias. As aneuploidias autossómicas podem representar desequilíbrios de tal forma graves, que resultam em morte fetal, uma vez que são incompatíveis com a vida.

Neste grupo também foram estudados indivíduos com malformações congénitas, dismorfismos e cardiopatias congénitas, e como tal, as alterações ao nível dos autossomas, estruturais e numéricas, são mais abundantes provocando um fenótipo mais severo. As alterações deste grupo (tabela 7) foram maioritariamente numéricas (55,6%), cerca 2/3 ocorreram ao nível dos autossomas e as restantes ao nível dos gonossomas, que era expectável segundo a literatura. Cerca de 44,6% dos indivíduos apresentam alterações estruturais desequilibradas, nomeadamente deleções e derivativos de origem não identificada, o que explica os fenótipos mais severos encontrados nos indivíduos deste grupo.

Ao contrário dos indivíduos do grupo anterior, os indivíduos com baixa estatura e distúrbios endócrinos, apresentam também alterações numéricas, maioritariamente ao nível do cromossoma X (Tabela 15). A desaceleração progressiva do crescimento na infância é a característica clínica que se encontra sistematicamente presente nas mulheres com um cariótipo 45,X, além de um padrão de crescimento caracterizado por atraso do crescimento intra-uterino e ausência de desenvolvimento pubertário (Schinzel, A., 2020 ; Multidisciplinar, U. A., 2010). A ausência de desenvolvimento pubertário devido à insuficiência ou ausência de produção de estrogénio é também uma das manifestações desta condição, uma vez que na maioria dos doentes ocorre uma diminuição da quantidade de oócitos produzidos ainda durante o desenvolvimento embrionário (Bondy e Cheng, 2009).

Segundo a literatura, nas meninas e mulheres com informação clínica de baixa estatura e distúrbios do crescimento e/ou endócrino, seria identificado um cariótipo 45,X. Foram detetados apenas cinco casos de Síndrome de Turner (quatro em mosaico) no grupo das baixas estaturas onde o número esperado era consideravelmente maior, no entanto, à exceção de três alterações estruturais desequilibradas dos autossomas, as restantes oito envolvem o gonossoma X. Também as alterações identificadas nos indivíduos com problemas do desenvolvimento e/ou endócrinas e/ou dos caracteres sexuais secundários, foram cariótipos com uma linha celular 45,X em mosaico (Tabela 16). O estabelecimento de um diagnóstico precoce desta patologia é extremamente importante uma vez que, quanto mais cedo se iniciar a terapia de suplementação hormonal, melhores serão os resultados obtidos (Multidisciplinar, U. A., 2010).

A monossomia do X não é a única síndrome predominantemente encontrada em mulheres abrangidas nos grupos de infertilidade, distúrbios do crescimento e suspeita de síndrome. O cariótipo 47,XXX, anomalia cromossómica descrita como a mais frequente em mulheres ao nascimento (Lalatta *et al*, 2010), foi detetada em 33 casos (30 em mosaico) deste estudo. Apesar dos cariótipos 47,XXX não mosaicos serem os mais frequentes na literatura, ao contrário dos resultados obtidos neste estudo, o mosaicismo ocorre em aproximadamente em 10% dos casos e pode surgir em variadíssimas combinações incluindo linhas celulares típicas de Síndrome de Turner (Tartaglia *et al*, 2010).

A alta incidência dos isocromossomas envolvendo o cromossoma X, descrita na literatura, nomeadamente: i(Xq), deleções em Xp e Xq e os cromossomas X em anel, originam uma monossomia parcial do cromossoma X, e resultam em variantes do Síndrome de Turner em mosaico (Robinson *et al.*, 2004). No conjunto dos casos analisados nos três grupos, existem oito isocromossomas, onde se pode verificar o cariótipo 46,X,i(X)(q10) como o mais frequente, à semelhança do que está descrito na bibliografia (Jacobs *et al*, 1997). As mulheres com cariótipo 46,X,i(Xq) têm um fenótipo semelhante ao das mulheres 45,X, referindo-se em todas baixas estaturas, disgenesia gonadal e outras alterações (Schinzel, A., 2020).

Neste estudo detetaram-se ainda 5 cromossomas isodicêntricos, quatro deles sob a forma de mosaico: mos 45,X[12]/46,X,idic(Y)(q11.2) A presença da anomalia cromossómica idic(X)(p11.2) está associada a um fenótipo pouco severo (Lebo *et al*, 1999), facto de acordo com o verificado nos indivíduos envolvidos neste estudo. A maioria dos cromossomas isodicêntricos foram detetados no grupo de indivíduos estudados por suspeita de síndrome ou alteração cromossómica (Tabela 17). Dos 109 indivíduos estudados, 58 apresentam um cariótipo alterado, sendo que a maioria confirma a suspeita feita pela parte clínica. As alterações numéricas apresentam a maior incidência de alterações detetadas neste grupo, nomeadamente dos autossomas com 20 casos de trissomia 21 e dos gonossomas com a confirmação de 12 indivíduos com Síndrome de Klinefelter.

No grupo de indivíduos estudados em contexto familiar, foram detetadas sobretudo alterações estruturais, de acordo com o descrito na literatura, representando mais de 81,3% do total das 48 alterações encontradas. As translocações recíprocas de autossomas foram identificadas em 27 indivíduos, o que justifica o facto de muitos indivíduos serem estudados apenas pela existência de um familiar portador de cromossomopatia e em vários casos ser encontrada a mesma alteração. Foram ainda identificadas cinco translocações Robertsonianas, das quais quatro indivíduos familiares partilhavam a mesma alteração e sete inversões. Dois homens 45,XY,der(13;14)(q10;q10) e duas mulheres 45,XX,der(13;14)(q10;q10). O derivativo 46,XY,der(18)dup(18)(p11pter)del(18)(q23qter), presente apenas num elemento deste grupo, trata-se de um recombinante com origem numa inversão pericêntrica que por crossing-over na meiose, deu origem a um gâmeta com um segmento duplicado e outro deletado. Este indivíduo com 19 anos, foi estudado devido à mãe ser portadora da mesma alteração.

Capítulo V – Conclusão

No grupo de indivíduos com problemas reprodutivos, de acordo com a literatura, as alterações numéricas dos cromossomas sexuais, são as mais frequentes, verificando-se apenas dois casos envolvendo autossomas. As aneuploidias representam uma causa frequente de anomalias e morte fetal, pelo que, a análise citogenética se apresenta como uma ferramenta de enorme importância na pesquisa das causas de insucesso reprodutivo. A análise citogenética convencional, continua a atuar como diagnóstico de primeira linha nos estudos de indivíduos com problemas reprodutivos, uma vez que geralmente são saudáveis, sem manifestações clínicas de alterações, no entanto possíveis portadores de alterações. A partir do diagnóstico, os indivíduos ou o casal, têm não só o conhecimento da sua condição, mas também lhes é permitido iniciar um planeamento que pode passar por procriação medicamente assistida, tratamentos hormonais ou até mesmo a adoção. Também as alterações estruturais equilibradas, detetadas em 27 indivíduos com infertilidade primária e secundária, e embora não provoquem patologia nos progenitores, por não disjunção na meiose, podem originar gâmetas desequilibrados resultando em abortos ou nados/fetos mortos/malformados. Embora estas alterações englobem a maioria dos casos de indivíduos com cromossomopatias, as alterações desequilibradas também foram detetadas num número considerável de 21 indivíduos, uma vez que não era esperado.

No grupo de indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbações do desenvolvimento e/ou endócrino era expectável a deteção a larga escala de alterações numéricas (Tabela 19), maioritariamente dos autossomas. Sabe-se que as alterações numéricas dos autossomas são mais prejudiciais em relação às dos cromossomas sexuais, por essa razão, os quadros clínicos encontrados nestes indivíduos são geralmente graves. No entanto, este estudo revelou 30 indivíduos com aneuploidias dos autossomas contra 44 nos gonossomas, o que vai contra o definido na bibliografia. Este facto deve-se ao recurso frequente ao diagnóstico pré-natal, aplicado em situações de suspeita de alteração durante a gestação, permitindo a identificação precoce da patologia, possibilitando ao casal prosseguir ou interromper a gravidez. Além disso e por não serem alterações tão severas ao nível do fenótipo, os indivíduos portadores de

aneuploidias dos cromossomas sexuais são detetados mais tardiamente, estimando-se que muitos permaneçam por identificar. O cariótipo funciona como teste de segunda linha em casos de indivíduos com indicação clínica de DI, ADPM, ou qualquer perturbação do desenvolvimento, são estudados através das técnicas moleculares como o *array-CGH*, no entanto o auxílio da citogenética convencional é fundamental na correta caracterização da alteração. Por expressarem fenótipos graves, a deteção destas condições é efetuada cedo na infância, o que permite estudar os progenitores averiguando se a alteração foi herdada ou *de novo*, e permite ainda calcular os riscos associadas em futuras gestações. É importante estudar os pais e irmãos, no caso de existirem, e serem acompanhados mesmo que portadores de alterações equilibradas, uma vez que podem originar descendência afetada. A descendência portadora de cromossomopatia pode por vezes apresentar fenótipos semelhantes ao dos progenitores ou mais severos.

Um indivíduo saudável e fenotipicamente normal, pode recorrer a consultas de aconselhamento genético para efetuar o seu estudo por familiares portadores de cromossomopatias. Existem casais que para esclarecimento de dúvidas ainda na fase pré-concepcional, por familiar direto ou afastado portador de cromossomopatia, procuram a consulta de aconselhamento genético para estudar a situação. Também em casos de um familiar portador de uma alteração, é necessário estudar os familiares diretos, pais, filhos, irmãos para se detetar a origem hereditária ou *de novo* da mutação e deste modo fazer o aconselhamento direcionado conforme o resultado obtido. Neste grupo, o cariótipo é um teste de primeira linha uma vez que atua em situações de portadores de alterações equilibradas podem originar uma descendência desequilibrada afetada, e por este método são facilmente detetadas e permitem o rápido prognóstico da situação e aconselhamento dos indivíduos e respetivos familiares. Verificou-se nestes indivíduos, uma maior prevalência de alterações estruturais equilibradas, verificando-se a sua presença em 34 casos, sendo 27 translocações recíprocas, sete inversões e 5 translocações recíprocas, explicando assim a maioria dos 367 indivíduos apresentarem fenótipos normais.

A análise do cariótipo continua a ser uma ferramenta essencial para a genética clínica, uma vez que permite o estudo transversal de todo o genoma, a deteção de alterações estruturais e alterações de ploidia. A combinação da citogenética convencional com as demais técnicas moleculares, é uma mais-valia para a obtenção de melhores resultados, mais rápidos e eficazes no aconselhamento genético do utente e dos seus familiares, complementando o prognóstico e diagnóstico.

Apêndice 1

Tabela 7 - Incidência das alterações encontradas separadamente em indivíduos com distúrbios do crescimento, perturbação do desenvolvimento e/ou endócrino

Grupo	Problemas do desenvolvimento e malformações		Distúrbios do crescimento		Distúrbios endócrinos	
	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)
Numéricas	55,6	4,9	42	1,6	74	6,7
Estruturais Equilibradas	0	0	0	0	5	0,5
Estruturais Desequilibradas	44,4	3,9	58	2	21	1,9
Total	100	8,8	100	3,7	100	9

Tabela 8 - Incidência das alterações encontradas em indivíduos por suspeita de síndrome

Alterações	Incidência no nº de casos com cromossomopatias do grupo (%)	Incidência no nº total de casos do grupo (%)
Numéricas	69	36,7
Estruturais Equilibradas	10,3	5,5
Estruturais Desequilibradas	17,2	9,2
Diferenciação sexual	3,4	1,8
Total	100	53,2

Tabela 9 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade primária - casal

Resultado	Sexo	Nº de casos
47,XXX	F	1
mos 45,X/46,XX	F	1
mos 45,X/47,XXX/46,XX	F	1
mos 47,XXY/46,XY	M	1
46,XY,t(4;11)(p14;q21)	M	1
46,XX,dup(15)(q11.2q13)	F	1
45,XY,der(13;14)(q10;q10) *	M	2
Total		8

*Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação Robertsoniana

Tabela 10 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade primária de causa masculina

Resultado	Nº de casos
47,XXY	30
47,XYY	4
mos 47,XXY/48,XXX	1
mos 47,XXY/46,XY	2
mos 47,XYY/46,XY	1
mos 45,X/46,XY	1
mos 45,X/46,XX	1
46,X,inv(Y)(p11.1q12)	1
47,XXY,inv(2)(p16.2~21q21.1)/46,XX,inv(2)(p16.2~21q21.1)/46,XY,inv(2)(p16.2~21q21.1)	1
46,Y,t(X;2)(q28;q14.2)	1
46,Y,t(X;1)(p11.23;p32)	1
46,XY,t(1;3)(q31;q26)	1
46,XY,t(2;18)(p11.2;q11.2)	1
46,XY,t(6;21)(p11.2;p11.2)	1
46,X,del(Y)(q11.23~q12)	1
47,XY,i(X)(q10)	1
46,XX ish Xp22.3 (SRY-)	1
mos 45,X/46,X,idel(Y)(q11.2)	1
47,XY,+mar	1
46,XX,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.31)**	3
45,XY,der(13;14)(q10;q10)*	1
46,XX	2
Total	58

*Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação Robertsoniana

**Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação recíproca

Tabela 11 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade primária de causa feminina

Resultado	Nº de casos
45,X	1
mos 45,X/46,X,i(X)(q10)	1
mos 45,X/46,XX	1
mos 45,X/47,XXX/46,XX	3
mos 45,X/46,X,del(X)(p11.2)	1
mos 45,X/46,X,del(X)(q13q24)	1
46,X,del(X)(p22.3)	1
46,XX,dup(4)(p12)	1
Total	10

Tabela 12 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade secundária - abortos e fetos malformados

Resultado	Sexo	Nº de casos
mos 47,XX,+21/46,XX	F	1
47,XXX	F	1
mos 45,X/47,XXX/46,XX	F	8
mos 45,X/46,XX	F	4
mos 48,XXXX/46,XX	F	1
mos 45,X/47,XXX/49,XXXXX/46,XX	F	1
mos 47,XXX/46,XX	F	4
mos 45,X/48,XXXX/46,XX	F	1
mos 45,X/49,XXXXX/46,XX	F	1
mos 47,XXY/46,XY	M	1
46,XX,t(4;8)(q35;p21.1)	F	1
46,XX,t(2;16)(p12;q23)	F	1
46,XX,t(8;16)(p11.21;q12.1)	F	1
46,XY,t(7;12)(q32;p13.1)	M	1
mos45,X,t(2;6)(q24.2;p21.1)/47,XXX,t(2;6)(q24.2;p21.1)/46,XX,t(2;6)(q24.2;p21.1)	F	1
46,XY,t(1;6)(p36.1;q27)	M	1
46,XY,t(2;9)(q23;p22)	M	1
46,XX,t(3;12)(p21.1;q13)	F	1
46,XY,t(11;22)(q23.3;q11.2)	M	1
46,XY,t(6;8)(q21;q11)	M	1
46,XX,t(7;13)(q11.2;q12)	F	1
46,XY,t(3;9)(p25;q12)	M	1
46,X,inv(Y)(p11q11.2)var	M	1
46,XY,inv(2)(q13~q14.1q33.1)t(2;10)(q14.1::q33.2;q24)	M	1
mos45,X,inv(2)(p11.2q13)/47,XXX,inv(2)(p11.2q13)/46,XX,inv(2)(p11.2q13)	F	1
46,XX,inv(2)(p11.2q13)	F	1
46,XX,inv(12)(q15q24.1)	F	1
45,XX,der(13;14)(q10;q10)*	F	2
45,XX,der(15;22)(q10;q10)*	F	1
Total		43

*Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação Robertsoniana

Tabela 13 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com infertilidade secundária – mulher POF

Resultado	Nº de casos
mos 47,XX,+21/46,XX	1
mos 45,X/46,XX	1
mos 46,XY/46,XX	1
mos 47,XXX/46,XX	1
mos 45,X/47,XXX/46,XX	5
46,X,t(X;8)(q24;q24.22)	1
46,X,del(X)(q22.1)	1
mos 46,X,i(X)(q10q10)/45,X	1
45,XX,der(13;14)(1q10;q10) *	1
Total	13

*Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação Robertsoniana

Tabela 14 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com problemas do desenvolvimento e malformações

Resultado	Sexo	Nº de casos
47,XY,+21 e 47,XX,+21	M/F	5
47,XY,+18 e 47,XX,+18	M/F	2
45,X	F	1
47,XXY	M	1
48,XXXX	F	1
mos 47,XY,+21/46,XY	M	1
mos 47,XY,+16/45,XY,-16/46,XY	M	1
mos 45,X/46,XX	F	1
mos 47,XXX/45,X	F	1
mos 45,X/47,XXX/48,XXXX/46,XX	F	1
46,XY,del(5)(p15.1)	M	1
46,XY,del(8)(p22→pter)	M	1
46,XX,del(9)(p22)	F	1
46,XX,dup(8)(q23.1)	F	1
mos 46,X,i(X)(q10q10)/46,XX	F	1
46,X,idic(Y)(q11.2)	M	1
47,XX, + mar idic(22)	F	1
46,X,add(X)(p22.3).ish ***	F	1
46,XX,add(17)(p13) ***	F	1
46,Y,add(X)(p22.3) ***	M	1
46,XY,add(5)(p15.2),inv(7)(p21q11.2)(q11.2q34) ****	M	1
mos 46,XX, fra(11)(q13)/46,XX	F	1
Total		27

***Derivativo não catalogado sem origem familiar identificada

****Derivativo catalogado com origem familiar numa inversão

Tabela 15 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com distúrbios do crescimento

Resultado	Nº de casos
45,X	3
mos 45,X/46,XX	2
46,X,del(X)(q22.1)	1
46,XX,del(18)(p11.1)	1
mos 45,X/46,X,r(X)(::p22→q22~q24::)	1
46,X,i(X)(q10)	1
mos 47,XX,+mar[15]/46,XX[15]	1
mos 45,X/46,X,der(X)(q28).ish	1
der(X)(pter→q28::p22.3→pter) ***	1
46,XX,fra(16)(q22) ***	1
Total	12

***Derivativo não catalogado sem origem familiar identificada

Tabela 16 – Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com distúrbios endócrinos

Resultado	Nº de casos
mos 45,X/47,XXX	1
mos 45,X/46,XX	2
mos 45,X/48,XXXX/46,XX	1
48,XXYY	1
47,XXY	6
47,XYY	1
46,X,inv(Y)(p11.2q11.22)	1
46,XX,dup(8)(p23.1p23.1)	1
46,XX,dup(15)(q11.2q11.2)	1
mos 46,X,i(X)(q10)/45,X	1
46,XX,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.31) **	1
46,XY	1
mos 46,XY/46,XX	1
Total	19

**Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação recíproca

Tabela 17 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos por suspeita de síndrome

Resultado	Sexo	Nº de casos
47,XY,+21 e 47,XX,+21	M/F	20
mos 47,XY,+21/46,XY	M	1
mos 46,XX/46,XY	F	1
mos 45,X/46,XX	F	1
mos 45,X/47,XXX	M/F	2
mos 45,X/47,XXX/46,XX	F	1
45,X	F	1
47,XXY	M	12
47,XXX	F	2
46,X,t(X;4)(q22.3;q12)	F	1
46,XY,t(11;18)(p15.1;q23)	M	1
46,XY,t(1;12)(q23.1;q24.1)	M	1
47,XY,t(4;13)(q21.1;q21.2),+21	M	1
46,XX,del(5)(p14.1)	F	1
mos 45,X/46,X,i(X)(q10)	F	1
mos 45,X/46,X,idic(Y)(q11.2).ish idic(Y)(q11.2)(SRY++,DXZ3++)	F	1
mos 46,X,psu	F	1
dic(X)(qter→p11.3::p11.3→qter)/45,X.ish(DXZ1++)	F	1
46,XX,der(5)t(3;5)(q29;p13.3) **	F	1
45,XY,der(13;15)(q10;q10) *	M	1
46,XY,der(14;21),+21 *	M	1
46,X,add(X)(p22.3)***	F	1
46,XX,add(8)(p23.3) ***	F	1
47,XX,+mar e 47,XY,+mar	F/M	2
46,XY	F	1
Total		57

*Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação Robertsoniana

**Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação recíproca

***Derivativo não catalogado sem origem familiar identificada

Tabela 18 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos com distúrbios neurológicos e epilepsia

Resultado	Nº de casos
mos 46,XX,r(20)(::p13->q13.3::)[11]/46,XX.ish	1
46,XX,var8p23.1	1
46,XX,der(4)t(4;8)(p16.3;p21.1)	1
Total	3

Tabela 19 - Tipos de alterações encontradas nos cariótipos alterados de indivíduos para estudo familiar por portador de cromossomopatia

Resultado	Sexo	Nº de casos
mos 45,X/46,XX	F	2
mos 47,XXX/45,X/46,XX	F	1
mos 47,XYY/46,XY	M	1
46,XY,inv(1)(p13q21)	M	1
46,XX,inv(2)(q13~q14.1q33.1)t(2;10)(q14.1::q33.2;q24)	F	2
46,XX,inv(2)(p16.3q14.3)	F	1
46,XX,inv(4)(q11q21.1)	F	1
46,XY,inv(4)(p14q23)	M	1
46,XY,inv(4)(p15q31)	M	1
46,XX,t(1;13)(p22.3~31.2;q32.3~33)	F	1
46,XX,t(1;4)(q42.1;q35.1)	F	1
46,XY,t(1;4)(q24.1;q35.1)	M	1
46,XY,t(1;5)(q44;q35).ish t(1;5)(q44-,q35.3+;q35.3-,q44+)	M	1
46,XY,t(1;5)(q32.1;q23.2)	M	1
46,XX,t(1;6)(q23.2;p12.3)	F	1
46,XX,t(1;12)(q23.1;q24.1)	F	1
46,XX,t(2;18)(p11.2;q11.2)	F	1
46,XY,t(3;5)(q29;p13.3)	M	1
46,XX,t(3;5)(p24;q22)	F	3
46,XY,t(4;8)(p16.3;p21.1)	M	1
46,XY,t(4;9)(q26;q33)	M	1
46,XX,t(5;7)(q15;q11.2)	F	1
46,XX,t(5;15)(q35.1;q15)	F	1
46,XY,t(7;18)(q22.3;p11.2)	M	1
46,XX,t(8;18)(q13;q22.2)	F	1
46,XY,t(9;22)(q31.2;q11.23)	M	1
46,XX,t(10;12)(p13;q13.1)	F	1
46,XX,t(10;19)(p13;p13.3)	F	2
46,XX,t(11;18)(q24.2;q11.2)	F	2
46,XX,t(12;15)(q21;q26)	F	1
46,XY,t(18;21)(q12.2;q21.1)	M	1
46,XY,t(11;18)(q24.2;q11.2)	M	1
46,XX,dup(8)(p23.1p23.1)	F	1
46,XX,dup(22)(q11.2q11.2)	F	1
45,XY,der(13;14)(q10;q10) *	M	2
45,XX,der(13;14)(q10;q10) *	F	2
45,XX,der(14;21)(q10;q10) *	F	1
46,XY,der(18)dup(18)(p11pter)del(18)(q23qter) ****	M	1
48,XY,+2mar	M	2
Total		48

*Derivativo catalogado com origem familiar numa translocação Robertsoniana

****Derivativo catalogado com origem familiar numa inversão pericêntrica

Bibliografia

Websites

OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Orphanet, <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Referências

Aksglaede, L., Link, K., Giwercman, A., Jørgensen, N., Skakkebaek, N. E., & Juul, A. (2013, February). 47, XXY Klinefelter syndrome: Clinical characteristics and age-specific recommendations for medical management. In American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics (Vol. 163, No. 1, pp. 55-63). Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

Andersen, A. M. N., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., & Melbye, M. (2000). Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *Bmj*, 320(7251), 1708-1712.

Asim, A., Kumar, A., Muthuswamy, S., Jain, S., & Agarwal, S. (2015). Down syndrome: an insight of the disease. *Journal of biomedical science*, 22(1), 1-9.

Balajee, A. S., & Hande, M. P. (2018). History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 3-12.

Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. 1980. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* 128:485-490.

Behjati, S. & Tarpey, P. S., (2013). What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98, 236-8.

Belkady, B., Elkhatabi, L., Elkarhat, Z., Zarouf, L., Razoki, L., Aboulfaraj, J., ... & Barakat, A. (2018). Chromosomal abnormalities in patients with intellectual disability: a 21-year retrospective study. *Human Heredity*, 83(5), 274-282.

Benn, P. A. & Hsu, L. Y. F. 2004. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis, The John Hopkins University Press: Baltimore, 214-296.

Behrend, C., Hagh, J. K., Mehdipour, P., & Schwanitz, G. (2017). *Human Chromosome Atlas: Introduction to diagnostics of structural aberrations*. Springer.

Bondy, C. A., & Cheng, C. (2009). Monosomy for the X chromosome. *Chromosome research*, 17(5), 649-658.

Bonomi, M., Rochira, V., Pasquali, D., Balercia, G., Jannini, E. A., & Ferlin, A. (2017). Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *Journal of endocrinological investigation*, 40(2), 123-134.

Boveri T. 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh Phys-med Ges* 35:67–90.

Casperson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49:219-222.

Casperson T, Zech L, Modest EJ. 1970. Fluorescent labeling of chromosomal DNA: superiority of quinacrine mustard to quinacrine. *Science* 170:762.

Castro-Correia, C.; Fontoura, M. (2015). A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 10(2), 186–192. doi:10.1016/j.rpedm.2014.10.002

Chaudhary, A. G. A. 2011. Establishing an Array CGH Platform for Molecular Diagnosis of Saudi Patients with Intellectual Disability. *Journal of Molecular Genetics*, 3, 12- 22.

Curry, C. J., Stevenson, R. E., Aughton, D., Byrne, J., Carey, J. C., Cassidy, S., ... & Opitz, J. (1997). Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *American journal of medical genetics*, 72(4), 468-477.

da Silva Ribeiro, I. P. T., Carreira, I. M. M., & de Melo, J. B. (2018). Abordagens Citogenéticas e Genómicas: Perspetiva no Diagnóstico em Oncologia e nas Patologias do Neurodesenvolvimento. *Revista Internacional em Língua Portuguesa*, (34), 149-172.

Dave BJ, Sanger WG. Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances. *Semin Pediatr Neurol*. 2007 Mar;14(1):2-6. doi: 10.1016/j.spen.2006.11.003. PMID: 17331878.

De Braekeleer, M., & Dao, T. N. (1991). Cytogenetic studies in male infertility. *Human reproduction*, 6(2), 245-250.

Delemarre-van de Waal, H. A. (1993). Environmental factors influencing growth and pubertal development. *Environmental health perspectives*, 101(suppl 2), 39-44.

Dutta, U. R. (2016). The history of human cytogenetics in India—A review. *Gene*, 589(2), 112-117.

Flemming W. 1882. *Zellsubstanz, Kern und Zellteilung*. Vogel, Leipzig.

Ford C E, Hamerton JL. 1956. The chromosomes of man. *Nature* 178:1020–1023.

Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. 1959. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1:711-713.

Fowden, A. L. (1995). Endocrine regulation of fetal growth. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(3), 351-363.

Freshney R (1987). Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique, 2nd Edition Alan R. Liss, Inc. New York.

Gardner, R. J. M. & Amor, D. J. 2018. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling, Oxford, UK, Oxford University Press.

Gardner, R. J. M. & Sutherland, Grant R. (2004). Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York : Oxford University Press

Gardner R e Sutherland G (2012). Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 4th Edition. Oxford University Press, New York.

Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S. B. & Doebley, J. 2015. Introduction to genetic analysis, Eleventh edition. New York, NY : W.H. Freeman & Company.

Gersen, S., & Keagle, M. (2013). The principles of clinical cytogenetics. S. L. Gersen, & M. B. Keagle (Eds.). New York: Springer.

Groth, K. A., Skakkebaek, A., Høst, C., Gravholt, C. H., & Bojesen, A. (2013). Klinefelter syndrome—a clinical update. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 98(1), 20-30.

Haines J.L., Korf B.R., Morton C.C., Seidman C.E., Seidman J.G. & Smith D.R. Current Protocols in Human Genetics. John Wiley & Sons (1995), Vol.1,Cap.4: 4.1.3- 4.1.4.

Hassold, T., Abruzzo, M., Adkins, K., Griffin, D., Merrill, M., Millie, E., ... & Zaragoza, M. (1996). Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. Environmental and molecular mutagenesis, 28(3), 167-175.

Jacobs, P., Dalton, P., James, R., Mosse, K., Power, M., Robinson, D., & Skuse, D. (1997). Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. Annals of human genetics, 61(6), 471-483.

Jacobs, P. A., & Strong, J. A. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*, 183(4657), 302-303.

Joseph, A., & Thomas, I. M. (1982). Cytogenetic investigations in 150 cases with complaints of sterility or primary amenorrhea. *Human Genetics*, 61(2), 105-109.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., & Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083), 818-821.

Katz, G., & Lazcano-Ponce, E. (2008). Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud pública de México*, 50(S2), 132-141.

Lalatta, F., Quagliarini, D., Folliero, E., Cavallari, U., Gentilin, B., Castorina, P., ... & Gargantini, L. (2010). Triple X syndrome: characteristics of 42 Italian girls and parental emotional response to prenatal diagnosis. *European journal of pediatrics*, 169(10), 1255-1261.

Lebo, R. V., Milunsky, J., Higgins, A. W., Loose, B., Huang, X. L., & Wyandt, H. E. (1999). Symmetric replication of an unstable isodicentric Xq chromosome derived from isolocal maternal sister chromatid recombination. *American journal of medical genetics*, 85(5), 429-437.

Lejeune, J., Turpin, R., & Gautier, M. (1959). Chromosomal diagnosis of mongolism. *Archives francaises de pediatrie*, 16, 962-963.

Liehr, T., Starke, H., Weise, A., Lehrer, H., & Claussen, U. (2004). Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histology and histopathology*.

Luthardt, F. W., & Keitges, E. (2001). Chromosomal syndromes and genetic disease. e LS.

Matoso, E. M. R. D. C. (2015). Desequilíbrios genómicos nas patologias do desenvolvimento e do comportamento (Doctoral dissertation).

Montazerinezhad, S., Emamjomeh, A., & Hajieghrari, B. (2020). Chromosomal abnormality, laboratory techniques, tools and databases in molecular Cytogenetics. *Molecular Biology Reports*, 47(11), 9055-9073.

More, R., Borate, S., & Gangane, S. D. (2016). Cytogenetic Study in Couples with Primary Infertility. *J Med Sci Clin Res*, 4(1), 8941-4.

Moore, C. M., & Best, R. G. (2001). Chromosomal genetic disease: structural aberrations. e LS.

Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F., Hamosh, A., Thompson, J. S., & Thompson, M. W. (2016). *Thompson & Thompson genetics in medicine*.

Paris Conference 1971. 1972. Standardization in Human Cytogenetics. *Birth Defects Orig Artic Ser* 8:1-46.

Patau, K., Smith, D., Therman, E., Inhorn, S., & Wagner, H. (1960). Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *The lancet*, 275(7128), 790-793.

Knight, S. J. L., & Regan, R. (2006). Idiopathic learning disability and genome imbalance. *Cytogenetic and genome research*, 115(3-4), 215-224.

Robinson A, Bender B e Linden M (2004). Prenatal Diagnosis of Sex Chromosome Abnormalities, in *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment*. 5th Edition, the Johns Hopkins Press, Maryland, pp. 211-239.

Rolnik, D. L., Carvalho, M. H. B. D., Catelani, A. L. P. M., Pinto, A. P. A. R., Lira, J. B. G., Kusagari, N. K., ... & Chauffaille, M. D. L. (2010). Cytogenetic analysis of material from spontaneous abortion. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 56, 681-683.

Rooney, D. E. (Ed.). (2001). Human cytogenetics: constitutional analysis: a practical approach (Vol. 1). Oxford University Press, USA.

Multidisciplinar, U. A. (2010). SINDROMA DE TURNER DA CRIANÇA AO ADULTO. *Acta Med Port*, 23, 873-882.

Schinzel, A. (2020). Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30: e57.

Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972.

Smeets, D. F. C. . (2004). Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical Biochemistry*, 37(6), 439–446.

Speicher, M. R., Ballard, S. G., & Ward, D. C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature genetics*, 12(4), 368-375.

Speicher, M. R., & Carter, N. P. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature reviews genetics*, 6(10), 782-792.

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., ... & Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, chromosomes and cancer*, 20(4), 399-407.

Sutton, W. S. (1903). The chromosomes in heredity. *The Biological Bulletin*, 4(5), 231-250.

Tartaglia, N. R., Howell, S., Sutherland, A., Wilson, R., & Wilson, L. (2010). A review of trisomy X (47, XXX). *Orphanet journal of rare diseases*, 5(1), 1-9.

Thomas, N. S., Ennis, S., Sharp, A. J., Durkie, M., Hassold, T. J., Collins, A. R., & Jacobs, P. A. (2001). Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors. *Human molecular genetics*, 10(3), 243-250.

Trask, B. J. (2002). Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature Reviews Genetics*, 3(10), 769-778.

Waldeyer W. 1888. Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikr Anat* 32:1.

Waters J, Campbell P, Crocker A e Campbell C (2001). Phenotypic effects of balanced X-autosome translocations in females: a retrospective survey of 104 cases reported from UK laboratories. *Human Genetics*.108(4): 318-27.

Willis, A. S., van den Veyver, I., & Eng, C. M. (2012). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal diagnosis*, 32(4), 315-320.

Wu, X., Su, L., Xie, X., He, D., Chen, X., Wang, M., ... & Xu, L. (2021). Comprehensive analysis of early pregnancy loss based on cytogenetic findings from a tertiary referral center. *Molecular Cytogenetics*, 14(1), 1-8.

Wu, W., Sun, M., Zou, G. M., & Chen, J. (2007). MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int J Cancer* 120, 953-60.

Yunis, J. J. (1976). High resolution of human chromosomes. *Science*, 191(4233), 1268-1270.