

INSTITUTO ESTADUAL DE DIABETES E ENDOCRINOLOGIA LUIS CAPRIGLIONE

NOVAS TÉCNICAS CITOGENÉTICAS DE INTERESSE EM
ENDOCRINOLOGIA - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

AUTOR: Eliana Ternes Pereira - médica

SUPERVISOR: Rosa Rita dos Santos Martins - médica

Rio de Janeiro, outubro de 1977

R E S U M O

As anomalias cromossômicas que mostram perturbações específicas da homeostase endócrina relacionam - se classicamente aos cromossomas sexuais. Nos últimos anos têm sido descritos muitos casos de associação entre anomalias dos autossomas e doenças endócrinas sem que, no entanto, esta relação seja considerada interdependente.

No campo da infertilidade masculina e feminina novas perspectivas diagnósticas se abrem com o reconhecimento de alterações cromossômicas estruturais, antes não identificadas, como responsáveis por abortos de repetição ou esterilidade.

É gratificante o surgimento cada vez mais frequente nesta área de trabalhos elucidativos em relação ao tipo de anomalia e sua frequência. Em todos os casos de abortamento de repetição a determinação do cariotipo dos cônjuges é fundamental para o aconselhamento genético e medicina preventiva, de vez que a viabilidade fetal pode ocorrer, levando a perpetuação das alterações na descendência.

As novas perspectivas abertas, desde os trabalhos iniciais de Casperson e cols., nos trazem a mão mais um instrumento valioso na diagnose médica.

O presente trabalho propõe-se a rever as técnicas citogenéticas utilizadas para diagnóstico das aberrações cromossômicas e referir sua importância em endocrinologia.

Este trabalho de revisão bibliográfica, realizado sob a supervisão da Dr^a Rosa Rita dos Santos Martins, faz parte da exigência do Curso de Especialização em Endocrinologia ministrado pelo Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luis Capriglione, como parte dos requisitos para a habilitação ao título de Especialista.

Rio de Janeiro, 31 de outubro de 1977.

S U M Á R I O

RESUMO	2
1. - INTRODUÇÃO	7
1.1 Estrutura dos cromossomas	8
1.2 Anormalidades cromossômicas	9
1.2.1 Isocromossomas	10
1.2.2 Deleção	10
1.2.3 Duplicação	10
1.2.4 Inversão	10
1.2.5 Translocação	10
1.2.6 Dicêntrico	11
1.2.7 Cromossoma em anel	11
2. - TÉCNICAS CITOGENÉTICAS	13
2.1 Métodos para estudo cromossômico	13
2.1.1 Método convencional - cultura de tecidos	13
2.1.1.1 Preparação de medula óssea	14
2.1.1.2 Cultura de tecidos	14
2.1.1.3 Cultura de leucócitos periféricos	14
2.1.2 Autorradiografia	16
2.1.3 Bandeamento cromossômico	19
2.1.3.1 Método de coloração Q	20
2.1.3.2 Método de coloração G	21
2.1.3.3 Método de coloração R	23
2.1.3.4 Método de coloração C	24
2.1.3.5 Método de coloração T	25
2.1.3.6 Método de bandeamento BrdU	26
2.1.3.7 Método de bandeamento de replicação	27
2.1.3.8 Método de coloração N	28
2.1.4 Outras técnicas	29
2.1.4.1 Método de coloração Giemsa 11	29
2.1.4.2 Método de coloração C 9	29
2.1.4.3 Método de coloração A 1	29
2.1.4.4 Método de coloração C d	29
2.1.4.5 Método de coloração Hoechst 33258	29
2.1.5 Nomenclatura	29

2.2 Métodos especiais para os cromossomas sexuais	31
2.2.1 Corpúsculo de Barr	31
2.2.2 Drumstick	36
2.2.3 Cromatina de Y	37
3. - ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS	40
3.1 Cromossomas sexuais	40
3.1.1 Cromossoma X	40
3.1.2 Cromossoma Y	41
3.2 Desenvolvimento sexual	42
3.3 Anomalias dos cromossomas sexuais	44
3.3.1 Síndrome XXY e variantes	44
3.3.2 Polissomias de Y e variantes	45
3.3.3 Polissomias de X e variantes	45
3.3.4 Monossomias de X e variantes	46
3.3.5 Translocações envolvendo o cromossoma X	48
3.3.6 Anomalias estruturais de Y	48
3.3.7 Disgenesias e hermafroditismo	49
3.4 Outras doenças endócrinas associadas à aberrações cromossômicas	51
3.5 Infertilidade e anomalias cromossômicas	55
4. - CONCLUSÃO	59
5. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
FIGURA 1 - Tipos de cromossomas, segundo a posição do centrômero	15
FIGURA 2 - Cariotipo de mulher normal	17
FIGURA 3 - Cariotipo de homem normal	18
FIGURA 4 - Cromossomas após coloração G	23
FIGURA 5 - Representação diagramática das bandas cromos- sômicas com métodos de coloração Q, G e R	32
FIGURA 6 - Exemplo de numeração das subdivisões dos cro- mossomas	33
FIGURA 7 - Vias morfogênicas do desenvolvimento gonadal	43
QUADRO 1 - Classificação dos cromossomas pelo sistema Denver	15
QUADRO 2 - Símbolos da nomenclatura de partes dos cro- mossomas e seus rearranjos recomendados pela Conferência de Chicago e Conferência de Paris	30
QUADRO 3 - Cariotipos observados na Síndrome de Turner	47
QUADRO 4 - Cariotipos	50

I - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A citogenética humana tem se firmado como um meio de alto valor no diagnóstico de muitas patologias e como recurso em medicina preventiva, através de aconselhamento genético.

Embora o capítulo da genética tenha sido aberto por Mendel, em 1865, demonstrando a transmissão de caracteres na descendência, somente em 1879 Arnold descreveu pela primeira vez o cromossoma. Em 1912, Winawer estimou o número dos cromossomas em 48, sendo 23 pares de autossomos e 2 cromossomas sexuais na mulher e 47 cromossomas no homem, com um único cromossoma X. A existência do cromossoma Y no homem só foi descrito em 1921, por Painter (5).

O marco histórico da citogenética foi o ano de 1956, quando Tjio e Levan demonstraram a presença de 46 cromossomas na célula somática humana (75), achado incontestável até hoje. A primeira anormalidade cromossômica numérica reconhecida foi a Síndrome de Down, apresentando 47 cromossomas (75), descrita por Lejeune, no ano de 1959.

Em 1960, com a Conferência de Denver (83), os cromossomas foram classificados através de seu comprimento e posição do centrômero.

Em 1963, a Conferência de Londres (5) estabeleceu que para a caracterização dos cromossomas devem ser consideradas as constrictões secundárias e características autorradiográficas.

A Conferência de Chicago, em 1966 (75), classificou e estabeleceu um sistema de nomenclatura para as anormalidades cromossômicas.

O advento do método de bandeamento cromossômico revolucionou a citogenética a partir de 1968, adicionando um novo critério para identificação dos cromossomas, que leva em consideração a presença de bandas e sub-bandas, estabelecida na Conferência de Paris, em 1971 (82).

Comings reforça a importância das técnicas de bandeamento cromossômico, salientando que antes delas era impossível o reconhecimento de trissomias e monossomias para segmentos cromossômicos (22).

A cromatina de Y, descrita por Pearson e Bobrow em 1970 (84), veio trazer, associada à cromatina de Barr, novos meios diagnósticos para as alterações sexuais.

O nosso trabalho se propõe a rever as técnicas citogenéticas, focalizando especialmente as de bandeamento cromossômico. Para isso basearemos nossas observações, preferentemente, nas citações originais, de vez que uma revisão mais minuciosa das técnicas modificadas, são de interesse particular para o citogeneticista.

1.1 - Estrutura dos cromossomas:

O cromossoma é formado por uma macromolécula de DNA que se estende de telômero a telômero, formando complexo com proteínas histona e não histona (22), e apresenta 2 hastes de polaridades diferentes, com estrutura helicoidal (119).

O DNA é formado por nucleotídeos constituídos por base nitrogenada, desoxirribose e grupamento fosfato. Estruturalmente apresenta-se como sequência de nucleotídeos, unidos entre si por pontes de hidrogênio, através das bases nitrogenadas, nas combinações de adenina timina e guanina-citosina. A variada sequência e posições dessas uniões, permitem uma diversificação extraordinária do DNA (94). Podemos reconhecer DNA repetitivos em que sequência similares são repetidas mais de um milhão de vezes, ou DNA moderadamente repetitivo, em que as sequências foram reproduzidas centenas ou milhares de vezes (22).

As duas hastes de DNA são bases para síntese de duas novas moléculas, quando se duplicam no período S. Através de autoradiografia, observou-se que nem todos cromossomas completam a síntese do DNA simultaneamente e mesmo entre alguns cromossomas homólogos, pode haver assincronia (40,41).

Toda informação genética está contida na sequência de bases do DNA no cromossoma (94).

As proteínas cromossômicas, histonas e não histonas, encontram-se em proporções diferentes para cada cromossoma. A relação da histona/DNA é 1,0 e entre não histona/DNA é 0,2 a 3,0,

possuindo, esta última, maior atividade genética (22). Referem a elas função de manutenção da estrutura da cromatina e possível fator de repressão gênica (95).

Os cromossomas apresentam-se desespiralizados durante a interfase e condensados durante a divisão celular (15).

Existem diferentes tipos de cromatina nos genomas, sendo os mais importantes a eucromatina e a heterocromatina (22). A heterocromatina é definida como regiões inertes geneticamente, de replicação tardia no período S e condensados na interfase (18). Pode ser de dois tipos:

a)- Heterocromatina constitutiva, localizada na região homóloga do cromossoma homólogo;

b)- Heterocromatina facultativa, presente em apenas um cromossoma homólogo, sendo o cromossoma X inativado ao acaso, um exemplo desse último tipo.

Segundo a localização, a heterocromatina constitutiva pode ser centromérica ou intercalar. Nas técnicas citogenéticas, os métodos de bandas distinguem basicamente os diferentes estados da cromatina. A eucromatina apresenta-se, usualmente, dispersa na interfase, replica precocemente no período S e é usualmente "ativa" (22).

A "atividade" de um cromossoma é expressa de duas formas: Atividade genética expressa na codificação de RNA e síntese de DNA (41).

1.2 - Anormalidades cromossômicas:

As anormalidades cromossômicas foram revistas e classificadas em 1966, no Congresso Sobre Genética Humana, em Chicago (75).

Há, dois tipos básicos de aberrações:

- a)- Alteração do número dos cromossomas
- b)- Alterações estruturais.

As alterações numéricas são denominadas aneuploidia ou poliploidia e decorrem da não disjunção dos cromossomas. Podem ocorrer durante a divisão mitótica ou meiótica, ou por perda durante a anáfase. Das células filhas resultantes, uma recebe o cromos

soma extra que falta na outra. A denominação polissomia é utilizada para expressar a presença de cromossomas adicionais e, o termo monossomia, indica a ausência de um cromossoma. Quando a não disjunção ocorre após a fertilização, o embrião pode apresentar duas linhagens celulares, caracterizando um mosaicismo. Quanto mais precocemente ocorrer a não disjunção, maior o número de células anormais que serão encontradas e mais grave será a repercussão fenotípica (5, 44, 73, 75).

As anomalias estruturais resultam da quebra do cromossoma durante a divisão celular mitótica ou meiótica, com a perda ou fusão inadequada dos segmentos (5, 44, 48, 73, 75).

São eles:

1.2.1 - Isocromossomas:

Divisão transversal próxima ao centrômero. O segmento com deficiência do centrômero é eliminado e o segmento remanescente forma um cromossoma metacêntrico, podendo ser de braço curto ou longo, com duplicação dos gens;

1.2.2 - Deleção:

Quebra e perda de um segmento terminal ou intercalar do cromossoma, no braço curto ou longo. Representa uma monossomia de segmento, desde que o homólogo permaneça íntegro;

1.2.3 - Duplicação:

O segmento perdido pela deleção de um cromossoma é incorporado ao homólogo, na mesma posição em relação ao centrômero (tandem) ou em posição invertida (tandem invertido);

1.2.4 - Inversão:

Há quebra em dois pontos e o segmento livre une-se novamente ao cromossoma, em posição invertida. Se as duas quebras ocorrem em um mesmo braço, é chamada inversão paracêntrica; se ocorre quebra nos dois braços, envolvendo o centrômero na inversão, é chamada pericêntrica.

1.2.5 - Translocação:

Troca de segmentos entre cromossomas não homólogos. As translocações podem ser recíprocas ou não recíprocas. A translocação recíproca resulta de quebra localizada em qualquer ponto

de dois cromossomas, exceto na região centromérica, com troca mútua de segmentos. A translocação não recíproca ocorre quando há simples translocação de um segmento para outro não homólogo em que não houve quebra. Há um tipo especial de translocação denominada fusão cêntrica ou Robertsoniana, em que a quebra ocorre perto ou no centrômero dos cromossomas acrocêntricos (42). O mecanismo envolvido na fusão cêntrica tem sido considerado como translocação recíproca entre dois cromossomas acrocêntricos, dando origem a um grande cromossoma e um pequeno fragmento cêntrico (20);

1.2.6 - Dicêntrico:

Perda de segmento de um dos braços com fusão das cromátides irmãs e quebra do centrômero, formando um cromossoma dicêntrico; se uma translocação envolve dois cromossomas em que a quebra envolve o centrômero e há união das duas porções com o centrômero, teremos um cromossoma dicêntrico e um fragmento acêntrico, que pode ser perdido;

1.2.7 - Cromossomas em anel:

Deleção de segmentos terminais de um cromossoma e reunião das porções distais, formando um anel.

Os rearranjos cromossômicos têm um grande espectro de expressões fenotípicas. A grande maioria é letal, tanto antes da implantação do embrião como durante os primeiros meses da embriogênese (42).

II - TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

2. TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

As técnicas citogenéticas objetivam a contagem e identificação dos cromossomas e suas aberrações, baseados nos critérios estabelecidos nos Congressos de Genética Humana.

Existem métodos que analisam todos os cromossomas, estabelecendo o cariotipo e métodos especiais de identificação dos cromossomas sexuais:

2.1 - Métodos para Estudo cromossômico:

- 2.1.1 - Método convencional - cultura de tecidos
- 2.1.2 - Autorradiografia
- 2.1.3 - Bandeamento cromossômico

2.2 - Métodos especiais para os cromossomas sexuais:

- 2.2.1 - Corpúsculo de Barr
- 2.2.2 - Drumstick
- 2.2.3 - Cromatina de Y

2.1 - Métodos para Estudo Cromossômico:

2.1.1 - Método convencional - cultura de tecidos

Os cromossomas evidenciam-se mais facilmente na metáfase (5) e prófase tardia (75).

São descritos 3 métodos principais de obtenção de células em divisão para estudo cromossômico (5,75,115):

- 2.1.1.1 - Preparação de medula óssea
- 2.1.1.2 - Cultura de tecidos
- 2.1.1.3 - Cultura de leucócitos periféricos

A preparação citogenética inclui: a)- Com 70 horas adição de colchicina ou colcemid ao material colhido, produzindo inibição do fuso celular e interrupção da mitose, encurtando e dispersando os cromossomas no citoplasma; b)-Exposição a soluções hipotônicas

que promovem aumento do volume celular por embebição osmótica e separação dos cromossomas; c)-Secagem ao ar ou flambagem e montagem da lâmina com lamínula.

2.1.1.1 - Preparação de medula óssea

O material da medula óssea é obtido por punção esternal. Apresenta a vantagem de necessitar curto tempo de incubação e dispensar os agentes mitogênicos (75), sendo um procedimento rápido e simples (115). No entanto, pelas características da coleta, não pode ser usada para grande número de indivíduos (5).

2.1.1.2 - Cultura de tecidos

As técnicas de cultura de tecidos variam de acordo com o tipo celular (115) e são obtidos por biópsia. Necessitam de períodos longos para cultura (uma semana ou mais), mas apresentam a vantagem de serem mantidas muito tempo para utilização (5). O tecido mais utilizado é a pele e é útil na confirmação dos cariotipos encontrados em cultura de leucócitos e no diagnóstico de mosaicismos.

(75)

2.1.1.3 - Cultura de leucócitos periféricos

É a técnica mais utilizada, desde que foi descrita por Moorhead e cols. (70) em 1960, por apresentar maior facilidade na obtenção do material, adequado padrão mitótico e alta qualidade das células em metáfase. Difere das técnicas anteriores pois no início da cultura é adicionada uma substância mitogênica para os leucócitos, a fitohemaglutinina, objetivando um maior número de células em metáfase. O tempo de incubação varia de 48 a 72 horas, tempo necessário para que ocorram duas divisões celulares.

As células colhidas por esses meios são fixadas, montadas em lâminas, coradas e depois examinadas ao microscópico ótico. A contagem e classificação dos cromossomas é realizada após fotografia ampliada da lâmina, quando são recortados e dispostos em grupos e pares (115), formando o cariotipo.

O cariotipo normal para a espécie humana é de 23 pares de cromossomas, sendo 1 par sexual, XX para a mulher e XY para o homem, nas células somáticas. No óvulo e espermatozóide as células são haplóides, constituídas por 23 cromossomas, sendo 1 sexual, X para o óvulo e X ou Y para o espermatozóide.

Os critérios mais utilizados para identificação dos cromossomas, são: comprimento, índice centromérico, características autorradiográficas, localização das constricções secundárias e padrão das bandas (82).

O centrômero é um ponto de constricção primária dos cromossomas que o divide em dois ramos, chamados braço curto e braço longo quando desiguais (115). De acordo com a posição do centrômero, os cromossomas podem ser: metacêntricos, quando os dois braços têm o mesmo comprimento; submetacêntrico, quando o centrômero divide o cromossoma em dois braços desiguais e acrocêntrico, quando o centrômero está quase no final do cromossoma (FIG. 1). Alguns dos cromossomas acrocêntricos ainda possuem pequenos corpos arredondados, chamados satélites, no braço curto (75).

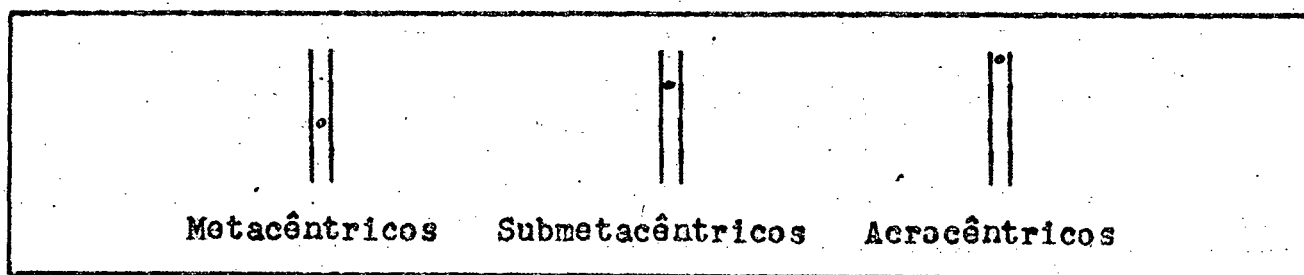


FIG. 1 - TIPOS DE CROMOSSOMAS, SEGUNDO A POSIÇÃO DO CENTRÔMERO.

Os cromossomas nas células somáticas, constituem-se de 22 pares homólogos, numerados de 1 a 22 em ordem decrescente de comprimento e 1 par sexual designado pelas letras X e Y. Foram classificados em 7 grupos, de acordo com o comprimento e posição do centrômero, pelo Congresso de Denver (83), demonstrado no Quadro 1.

GRUPOS	CROMOSSOMAS	POSIÇÃO DO CENTRÔMERO
A	pares 1, 2 e 3	1 e 3 metacêntricos 2 submetacêntrico
B	pares 4 e 5	todos submetacêntricos
C	pares 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e cromossoma X	todos submetacêntricos
D	pares 13, 14 e 15	todos acrocêntricos
E	pares 16, 17 e 18	16 metacêntrico 17 e 18 submetacêntricos
F	pares 19 e 20	todos metacêntricos
G	pares 21 e 22 e cromossoma Y	todos acrocêntricos

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMAS PELO SISTEMA DENVER

Os métodos convencionais, descritos acima, para estudo cromossômico, são mais úteis para precisar rapidamente as anomalias de número, particularmente os mosaicos e para apreciar a importância de certas variantes cromossômicas, como por exemplo, grandes satélites (43). Apresentam a desvantagem de não identificar claramente todos os cromossomas e pareá-los utilizando somente dois parâmetros, que têm como medida apenas a acuidade do observador (22).

Pequenas anomalias estruturais não podem ser reconhecidas e, um cromossoma anômalo, pode ser classificado em um grupo a que não pertence (15,16).

Nas Figuras 2 e 3, exemplificamos cariotipos normais.

Outros métodos desenvolvidos permitem identificar características próprias a cada cromossoma, facilitando seu reconhecimento e detecção das anomalias. Todos utilizam a preparação cromossômica da forma convencional, variando o tratamento, após a obtenção das células (4, 9, 15, 27, 40, 55, 65, 101).

2.1.2 - Autorradiografia

Histórico:

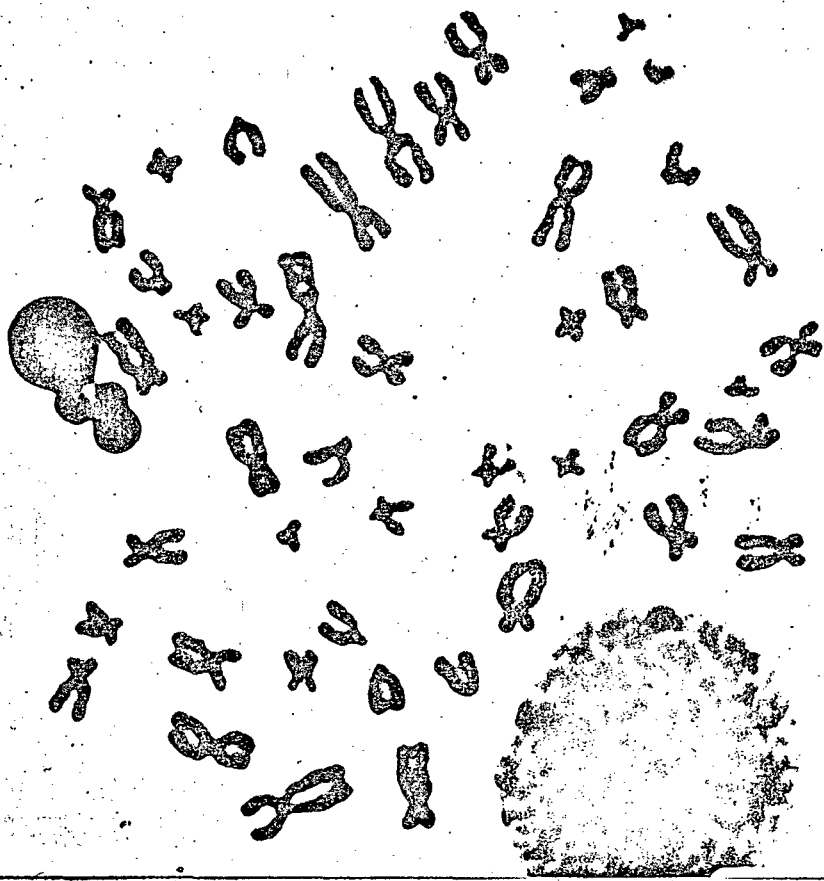
Descrita por Taylor, em 1957, utilizando timidina marcada com trítio (H_3^+) para identificação dos cromossomas (111).

Descrição do método:

Cultura de leucócitos periféricos; diluição com meio 199 (glaxo), 37°C, 3 dias, adição de timidina tritiada, 0 a 32 horas antes da fixação; colcemid; preparação da lâmina com secagem ao ar; Giemsa; fotografia das células selecionadas; análise do cariotipo com contagem e anotações da posição dos grãos sobre os cromossomas individuais e separação dos homólogos (40,41).

Fundamentos teóricos:

A duplicação dos cromossomas no período S da divisão celular, utiliza bases nitrogenadas. A adição de timidina marcada com trítio permite a observação da síntese do DNA em relação ao tempo de incorporação da timidina e distribuição da mesma ao longo de cada cromossoma (40,41).



CARIOTIPO :

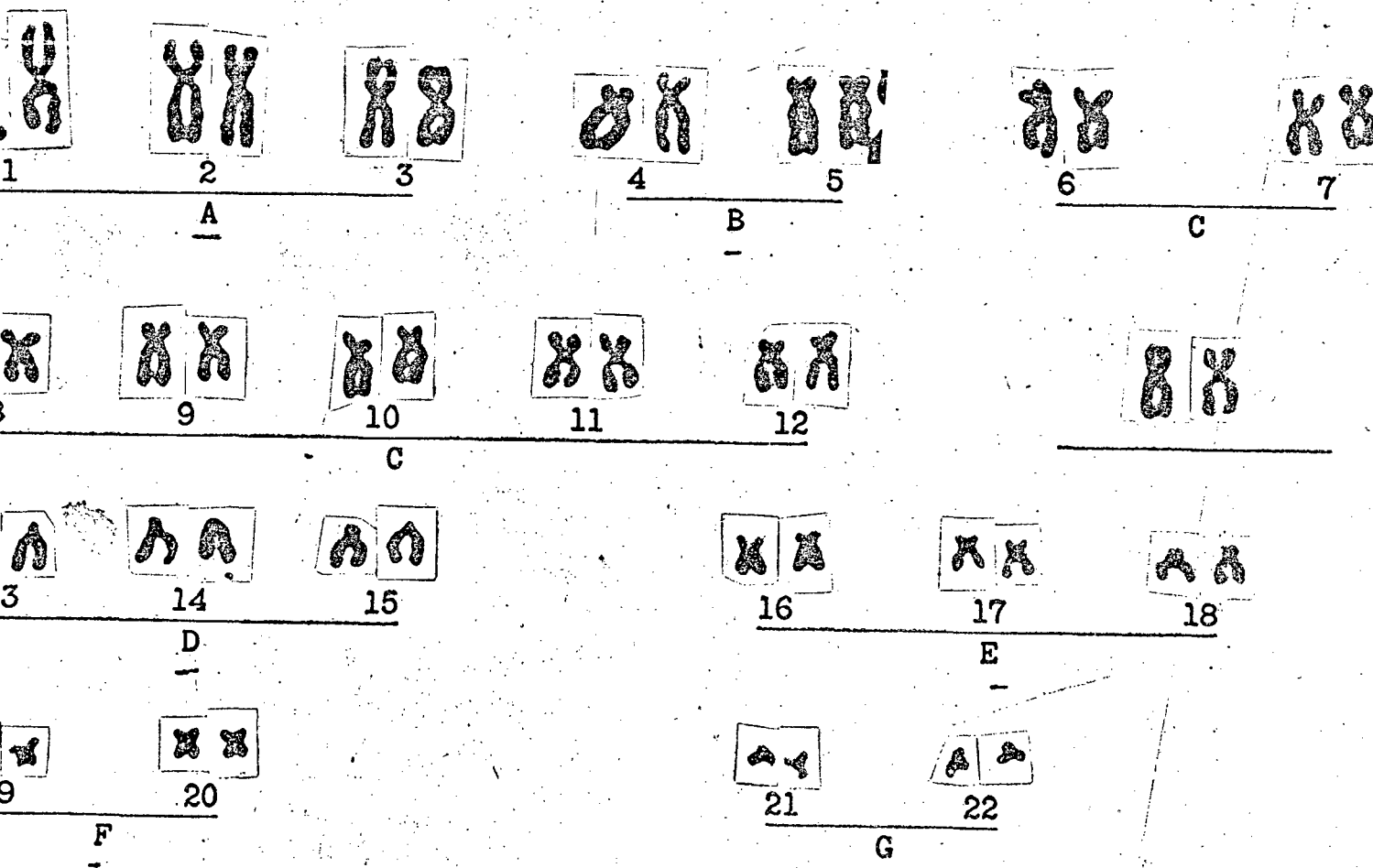


FIG. 2 - CARIOTIPO DE MULHER NORMAL
 (Gentileza do Instituto de Biofísica da UFRJ)



CARIOTIPO :

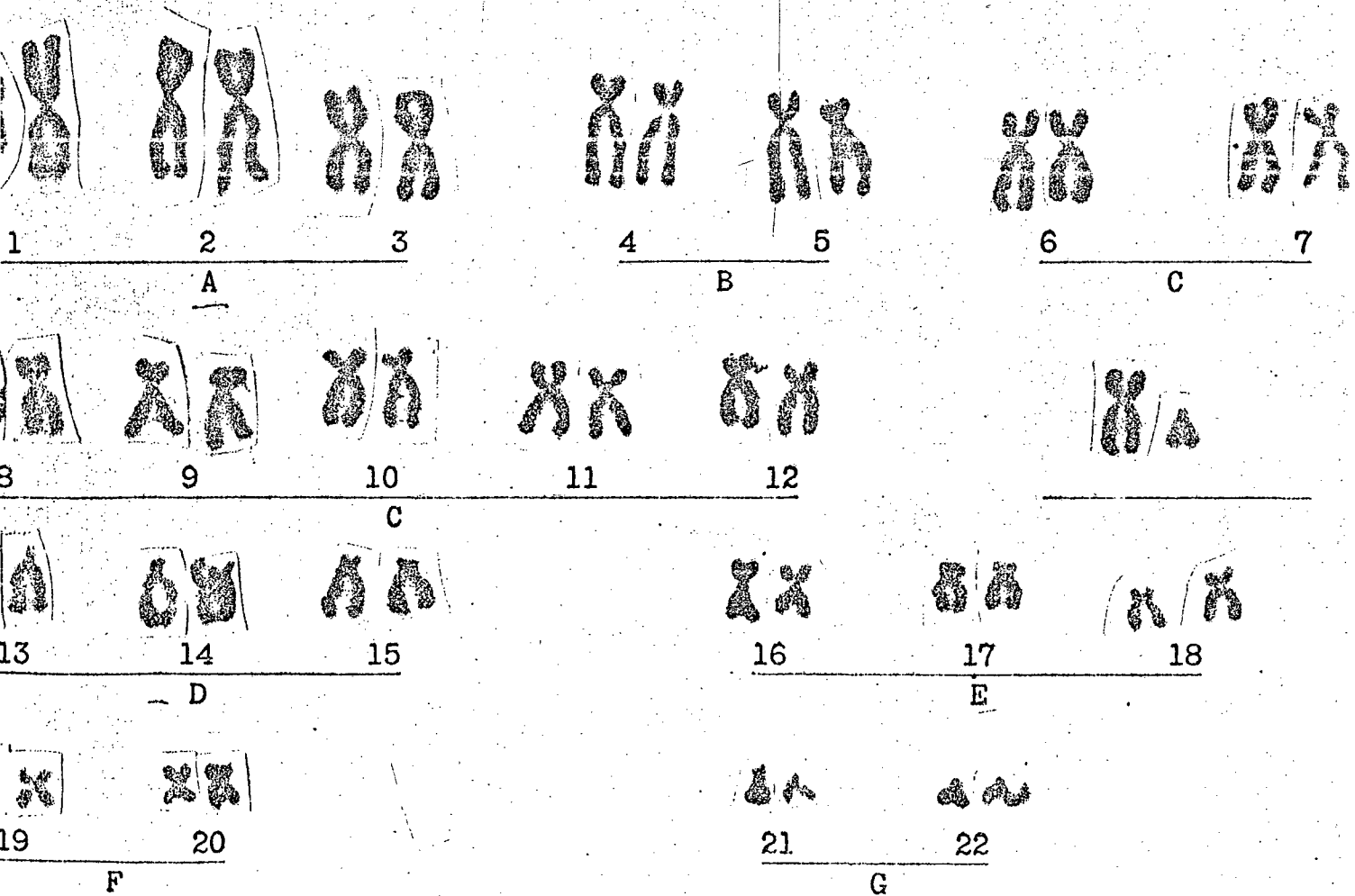


FIG. 3 - CARIOTIPO DE HOMEM NORMAL
 (Gentileza do Instituto de Biofísica da UFRJ)

Características de coloração:

A timidina tritiada aparece na fotografia como grãos distribuídos ao longo dos cromossomas, com variações entre os cromossomas individuais, que permitem sua identificação e detecção de aberrações.

O número de cromossomas envolvidos na reprodução do DNA, varia com o tempo de exposição à $[^3\text{H}] \text{Td}$, sugerindo que nem todos os cromossomas completam a síntese simultaneamente.

Embora a síntese do DNA nos cromossomas homólogos pareça sincronizada, alguns apresentam assincronia. O exemplo mais importante é o do par de cromossoma X, em que um replica mais tardiamente que outro. Este é o menor do par, encontra-se em posição periférica no núcleo, é heteropicnótico e dá origem ao corpúsculo de Barr (40,41).

Outros cromossomas podem apresentar assincronia de síntese para segmentos, como é o caso dos pares números 1 e 3 (40).

Observações

Nem todos os cromossomas homólogos podem ser pareados por essa técnica (75). Hoje, praticamente não está sendo mais utilizada (43).

2.1.3 - Bandeamento cromossômico:

Uma banda é definida como uma parte do cromossoma que é nitidamente distinta do segmento adjacente, por aparecer clara ou escura, com os métodos de coloração Q, G, R ou C. Esta definição foi dada no Congresso de Paris, em 1971 (66). Depois dessa data, outros métodos de bandeamento cromossômico foram descritos, os quais serão referidos posteriormente neste trabalho.

Os métodos de bandeamento, são:

2.1.3.1 - Método de coloração Q

2.1.3.2 - Método de coloração G

2.1.3.3 - Método de coloração R

2.1.3.4 - Método de coloração C

2.1.3.5 - Método de coloração T

2.1.3.6 - Método de bandeamento BrdU

2.1.3.7 - Método de bandeamento de replicação

2.1.3.8 - Método de coloração N

São mais utilizados os métodos Q, R e G.

Os métodos C, T e BrdU, são utilizados em casos particulares (43).

2.1.3.1 - Método de coloração Q

Histórico:

Desenvolvido por Casperson, Forbes, Foley, Kridinowsk, Modest, Simonson, Wagh e Zechs em 1968, baseado na interação de agentes alquilantes com regiões do DNA. Utilizando quinaquina e quinaquina - mustarda em coloração de cromossomas de plantas e Hamster, evidenciaram um padrão de estriações transversais fluorescentes ao longo das cromátides (14).

Descrição do método:

Etanol 95%, 70%, 50%, 5 minutos, respectivamente; Buffer de Mc Ilvaine 7,0; solução dihidrocloride quinaquina, 20 minutos, 20°C; água destilada, 3 X; exame sob fonte de luz ultravioleta (75). A preparação dos leucócitos periféricos é realizada na técnica convencional, com duas modificações: a)-A colchicina permanece no meio de cultura apenas 1 hora, para que os cromossomas não fiquem muito contraídos; b)-As lâminas são secadas ao ar (75).

Também pode ser utilizada a preparação direta de medula óssea (15)

Fundamentos teóricos:

Somente certas regiões dos cromossomas ligam a quinaquina mustarda e, esses locais, parecem estar localizados nas regiões heterocromáticas (14,18,75,122) que incorporam tardiamente a timidina marcada (40).

Os trabalhos iniciais de Casperson e cols., sugeriam que a quinaquina mustarda se ligasse, preferencialmente, aos segmentos ricos em guanina-citosina (14). Estudos posteriores, entretanto, sugerem que o corante liga-se aos segmentos ricos em adenina-timina, preferentemente (5,22,29,44).

Características de coloração:

A fotografia da lâmina corada indica claramente a presença de regiões com alta capacidade de ligar a quinacrina mustarda nos cromossomas de plantas e mamíferos durante a metáfase (14). A técnica é reprodutível e pode ser usada para identificação dos cromossomas e estudo de aberrações cromossômicas (17). Todos os pares podem ser identificados com esse método. A maior desvantagem é que os segmentos distais das cromátides não são corados, não sendo possível detectar alterações estruturais, às vezes encontradas nessa região (29).

O cromossoma Y é facilmente reconhecido por uma especial fluorescência brilhante na porção distal do braço longo (29,75,122). Por isso, a técnica está indicada em todos os casos suspeitos de anomalia estrutural e numérica de Y.

Em 1970, Pearson e Bobrow baseados nesse fato, identificaram a cromatina de Y através da coloração com quinacrina dihidroclorido, nos núcleos em interfase (84).

Observações:

Quinacrina mustarda induz a quebras cromossômicas em 50% das células coradas (14).

As lâminas devem ser examinadas logo após a feitura pois, cerca de 5 minutos após a exposição à luz ultravioleta, perdem a cor (75). Deve, então, ser realizada microfotografia (18,75).

2.1.3.2 - Método de coloração G

Histórico:

As bandas G são produzidas após coloração com Giemsa, através de diferentes técnicas (43). As mais importantes são as que usam pré-tratamento com ASG (Giemsa salinoacético), descritas por Summer, em 1971 (110) e o pré-tratamento com tripsina, descrito por Seabright, em 1971 (101).

Descrição do método:

ASG - 0,3 M Na Cl + M solução de citrato de sódio, 60°C, 1 hora; água destilada; giemsa, 10 minutos; água destilada; secar ao ar; 5 minutos; montar em Permount.

Tripsina-Solução tripsina 0,1%, pH 7,0, 37°C, 10 a 15 segundos; etanol 5 e 100%, 10 segundos, respectivamente; secar ao ar; giemsa, 10 a 15 minutos; água destilada; secar ao ar; montar em permount. Ver diretamente ao microscópio e fotografar.

Fundamentos teóricos:

A maioria das técnicas de coloração G, utilizam agentes que desnaturam as proteínas como proteases, sal, calor, detergentes e uréia. Comings sugere que a desnaturação das proteínas com a destruição das estruturas terciárias, é importante fator no padrão de coloração (22) e, citando Latt(1973), refere que existe uma precisa correlação entre DNA de replicação tardia e as bandas G.

Características de coloração:

Cora as regiões de heteromatinas constitutiva intercalar (22). O padrão de bandas G corresponde aos resultados obtidos com o método de coloração Q, com exceção da constrição secundária dos braços longos dos cromossomas 1 e 16, que coram no primeiro e são negativos no segundo método. O segmento distal Yq é brilhante no método Q e variável no G (82). Este método é dos mais úteis na detecção de anormalidades cromossômicas (58), porque a distribuição de bandas claras e escuras é característica para cada par cromossômico, permitindo, assim, a perfeita classificação dos mesmos. Identifica com mais certeza aberrações cromossômicas como deleções e translocações, que seriam praticamente impossíveis de interpretar pela técnica convencional.

Observações:

O método de coloração G apresenta o mesmo padrão de bandas que o método Q (29, 58). No entanto, devido a maior facilidade e rapidez de execução (101) e por usar microscópio comum, é mais econômico e mais utilizado (73). Os cromossomas não perdem a cor e são mais distintos que na banda Q (75). La Maza e Sanchez, propoem um novo método de coloração em que as bandas G e C são produzidas simultaneamente, claramente identificadas em todos os cromossomas, propondo o nome de bandas W para esse padrão encontrado (58).

Na Fig. 4, exemplificamos cromossomas após coloração G.

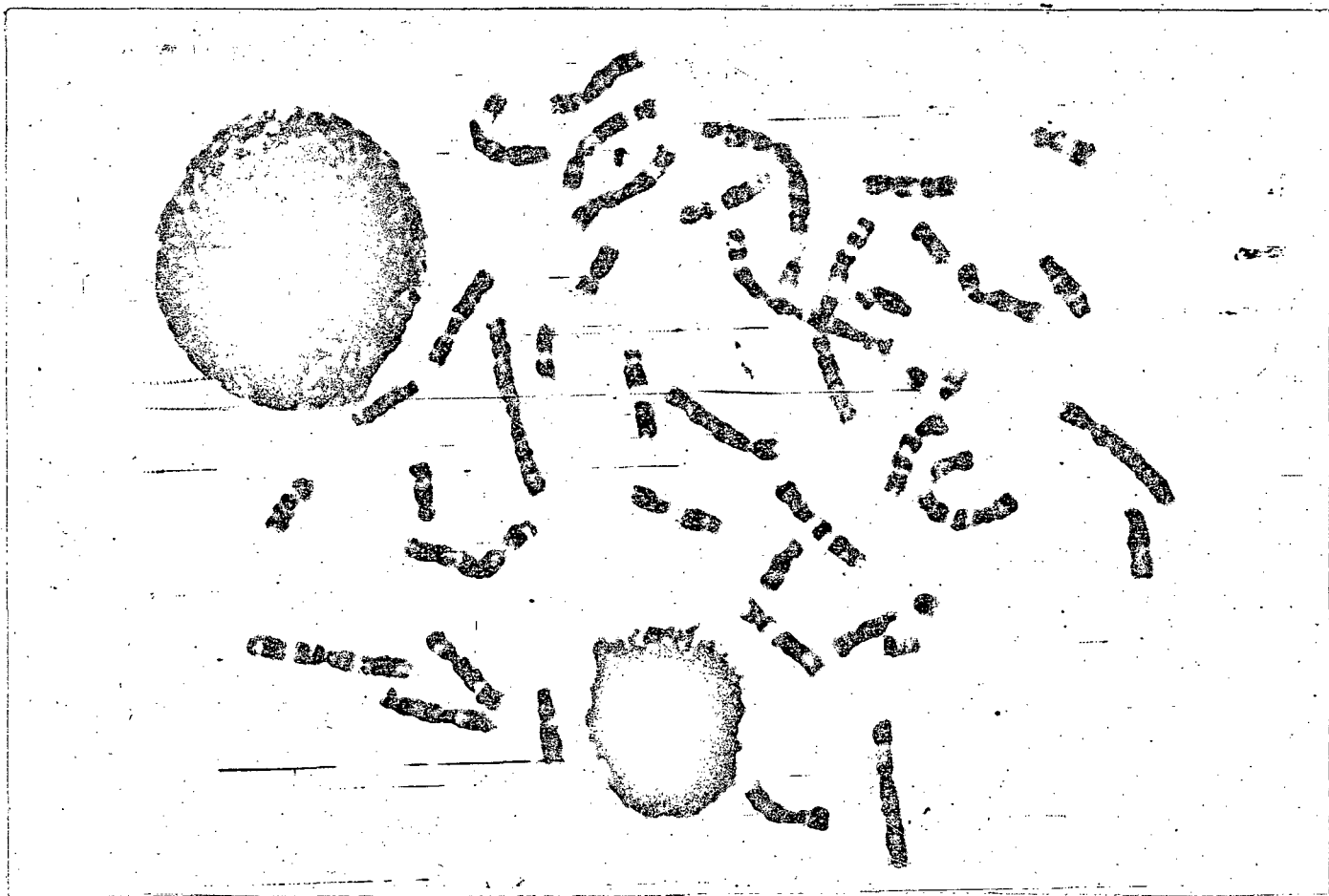


FIG. 4 - CROMOSSOMAS APÓS COLORAÇÃO G
(Gentileza do Instituto de Biofísica da UFRJ)

2.1.3.3 - Método de coloração R

Histórico:

Descrito por Dutrillaux e Lejeune (28) em 1971, envolvendo aquecimento em solução pH predeterminado.

Descrição do método:

Cultura de leucócitos periféricos; fixação e secagem ao ar livre; 20 mM PO_4 , pH 6,5, 87° C, 10 a 12 minutos; Giemsa temperatura ambiente, 10 minutos (28).

É particularmente adequada para análise na prometáfase.

Fundamentos teóricos:

As regiões das bandas R, correlacionam-se bem com a cromatina de replicação precoce, eucromatina (22) e com os segmentos onde o DNA não particularmente rico em adenina-timina (29).

Características de coloração:

Cora os segmentos não corados nos métodos G e Q, dando um padrão reverso a estes (28,29). As constricções secundárias dos braços longos dos cromossomas 1, 9 e 16 são excessões, pois não coram nos métodos R e Q. O segmento distal do cromossoma Y é variável (82). A constância dessas estruturas permite separar os pares cromossômicos (28).

Esta técnica é útil na detecção das pequenas alterações estruturais das extremidades das cromátides, que são coradas em todos os cromossomas (29). Complementa a técnica G e de fluorescência.

Observações:

O mesmo padrão de bandas é observado após coloração com acridina orange, descrito por Bobrow e cols., permitindo, segundo esses autores, maior resolução das bandas R (9).

2.1.3.4 - Método de coloração CHistórico:

Técnica original de Pardue e Gall, em 1970 (81) e adaptada por Arrighi e Hsu em 1971 (4), após tratamento vigoroso com soluções salinas visualizando as bandas C, principalmente na metáfase.

Descrição do método:

Cultura de leucócitos periféricos; 0,07 N Na OH, 1 a 2 minutos; 2 x SSC, 60°C, durante a noite, corado com Giemsa 15 a 30 minutos.

Fundamentos teóricos:

As regiões das bandas C são as de heterocromatina constitutiva, provavelmente áreas de repetitivo DNA (4). Parece corresponder a região em que as proteínas não histonas envolvem o DNA (22).

Características de coloração:

Cora as regiões justacentroméricas, constricções secundárias e o braço longo do cromossoma Y, enquanto o resto das cromátides permanecem pálidas (4,29). Cora também os cromossomas 1, 9 e 16 que apresentam uma porção justacentromérica maior que os outros cromossomas. (20).

A técnica não permite a identificação de todos os cromossomas das células somáticas. Tem valor quando usada em conjunto com as outras técnicas e é de particular valor no estudo dos cromossomas meióti-cos masculinos (55,82). Sua principal indicação é o estudo do cromossoma Y.

Observações:

Como já referido nos comentários do bandeamento G, foi descrito recentemente um método de coloração simultânea C e G (58).

2.1.3.5 - Método de coloração T

Histórico:

Descrito por Dutrillaux em 1973 (30), observado após tratamento térmico e coloração por acridine orange ou Giemsa.

Descrição do método:

Solução fisiológica de Earle pH 5,1, 87°C, 30 minutos, corado com Giemsa ou acridina orange (22).

Fundamentos teóricos:

As bandas T podem ser consideradas como aquelas frações das bandas R, mais resistentes ao tratamento com agentes desnaturantes (29).

Características de coloração:

Cora a região do telômero, semelhante às bandas R (22). Diferencia-se das bandas R pelo desaparecimento quase completo das bandas intercalares e reforço da coloração de certas extremidades das cromátides (27). A técnica é útil no diagnóstico de aberrações estruturais nos segmentos distais das cromátides (29), principalmente nos casos de pequenas deleções de extremidades.

Observações:

A coloração com acridina orange, aumenta o contraste das bandas (27,29).

2.1.3.6 - Método de bandeamento BrdU:

Histórico:

Descrita por Zakharov, Seleznev, Benjusch e Baranovskaya em 1971. (29). A 5-bromodéoxyuridine (BrdU), é um análogo da timidina. Sua incorporação na cultura de linfócitos periféricos na fase S tardia constitui um método simples e eficaz de colocar em evidência os segmentos cromossômicos de replicação tardia. É mais simples e de resultado superior a autorradiografia (43,87).

Descrição do método:

Cultura de leucócitos periféricos; BrdU 0,26%, 0,5 ml em meio fisiológico, 2 horas; colchicina; KCl 0,075 M; álcool metil acético; acridine orange 5 mg/100 ml, pH 6,7, 10 minutos; montar e observar sob luz ultravioleta (43).

Fundamentos teóricos:

BrdU induz a desespiralização dos segmentos de replicação tardia por um mecanismo ainda não conhecido. (43).

Características de coloração:

Mostra as marcações de bandas R, habitual, reconhecendo o X de replicação tardia. Nas polissomias de X observa-se mais de um cromossoma inativado. Se houver um X estruturalmente aberrante, este será de replicação tardia. Nas translocações X/autossoma balanceadas o X normal é que será inativado, ocorrendo o contrário se houver translocação desbalanceada. No último caso, a inativação não evita a expressão fenotípica da aberração (43).

Observações:

Após dois ciclos celulares em presença de BrdU, as duas cromátides de um mesmo cromossoma adquirem propriedades tintoriais diferentes, que permitem reconhecer aquela de primeira geração da cromátide de segunda geração. Esta distinção é realizada com o emprego de Hoechst 33258 ou acridine orange ou a combinação Hoechst 33258-Ciensa (43,60).

2.1.3.7 - Método de bandeamento de replicação:

Histórico:

Descrito por Latt em 1973 e Perry e Wolff em 1974 (87), sendo observado que após dois ciclos de replicação na presença de BrdU, seguido por coloração com Hoechst 33258, as cromátides coram diferencialmente (60).

Descrição do método:

Método descrito por Perry e Wolff: BrdU, 24 horas, escuro; Colce mid 2×10^{-7} M, 2 horas; 0,075 M KCl, 8 minutos; ácido-acético 3:1; Hoechst 33258, 12 minutos; água desionizada; 24 horas; 2 x SSC ou água, 2 horas, 60°C; Giemsa 3%, 30 minutos (87).

Fundamentos teóricos:

As células são cultivadas com BrdU por 24 horas, tempo em que 2 ciclos de replicação ocorrem.

Latt sugere que a diferença entre as 2 cromátides é causada por um apagamento diferencial da fluorescência do BrdU incorporado em 1 ou 2 filamentos do DNA. Kushima e Wolff, entretanto, têm postulado que diferenças na ligação da proteína ao BrdU contido nas cromátides é a causa da coloração diferencial com Giemsa (87).

Características de coloração:

As células cultivadas por 2 completos ciclos em presença de BrdU após tratamento com um dos métodos de coloração diferencial da cromátide irmã, mostra uma cromátide escura e outra clara (23).

Observação:

O método descrito inicialmente por Latt, não utiliza a coloração com Giemsa após Hoechst 33258; é fotoinstável e a imagem escurece rapidamente (87). A preparação com Giemsa é permanente

Empregado para identificação de cromossomas de replicação tardia.

2.1.3.8 - Método de coloração N

Histórico:

Descrita por Matsui e Sasaki, em 1973 (65).

Descrição do método:

5% TCA, 30 minutos 85°C; 0,1 N HCl, 30 a 45 minutos, 60°C; corado com Giemsa (22).

Fundamentos teóricos:

A técnica extrai as proteínas histonas e ácidos nucléicos (65). As bandas N parecem corresponder às regiões de proteínas não histonas (22). Cora especificamente a região organizadora dos nucleolos (22,65).

Características de coloração:

Nas células humanas em metáfase, as bandas N aparecem como manchas vermelho-arroxeadas, restritas às regiões dos satélites de todos os cromossomas acrocêntricos (35,65). Geralmente aparecem duas manchas sobre o segmento mas, muitas vezes, elas se fundem. Nos núcleos dos linfócitos em interfase, aparecem como minúsculas manchas agrupadas dentro do nucleólo (65). São importantes para diferenciar satélites de braço curto nos cromossomas acrocêntricos.

Observações:

Ferraro e cols., em publicação recente (35), apresentaram modificações da técnica com uso de AG-AS, que não altera a morfologia dos cromossomas e dá melhor coloração aos mesmos. A contrário de outros autores (22,65), encontraram que os sítios corados diferencialmente com Giemsa e AG-AS localizam-se no braço curto de todos os acrocêntricos, bem abaixo dos satélites, na constrição secundária. Os sítios da bandas N e AG-AS são as mesmas onde ocorre reassociação DNA/rRNA e, os autores, concluem que os gens são localizados na constrição secundária das acrocêntricos.

2.1.4 - Outras técnicas:

Outras técnicas para identificação de alguns cromossomas, são também descritas (22):

2.1.4.1 - Método de coloração Giemsa 11:

Cora a constricção secundária do cromossoma 9 e algumas outras heterocromatinas centroméricas. É variante do Método C (43).

2.1.4.2 - Método de coloração C 9:

Cora a constricção secundária do cromossoma 9.

2.1.4.3 - Método de coloração A 1:

Cora a constricção secundária dos cromossomas 1 e 16.

2.1.4.4 - Método de coloração C d:

Cora "Kinetochores".

2.1.4.5 - Método de coloração Hoechst 33258:

Cora distintamente a cromátide de replicação tardia. É variante do Bandeamento BrdU (60,75).

2.1.5 - Nomenclatura:

Com o surgimento das técnicas de bandeamento, a Conferência de Paris estabeleceu normas para a nomenclatura dos cromossomas. (QUADRO 2)

cen	:	centrômero
p	:	braço curto
q	:	braço longo
h	:	constricção secundária
r	:	anel
i	:	isocromossoma
dic	:	dicêntrico
del	:	deleção
dup	:	duplicação
inv	:	inversão
ins	:	inserção
inv ins	:	inserção invertida
t	:	translocação
rcp	:	translocação recíproca
rob	:	translocação robertsoniana (fusão cêntrica)
tan	:	translocação tandem
ter	:	terminal (pter = final do braço curto) (qter = final do braço longo)
:	:	quebra sem união
::	:	quebra e reunião
—	:	de... para...
+	:	cromossoma adicional
-	:	perda de cromossoma

QUADRO 2 - Símbolos da nomenclatura de partes dos cromossomas e seus rearranjos recomendados pela Conferência de Chicago e Conferência de Paris (82).

Baseado nos métodos de coloração Q, G e R (FIG. 5), cada cromossoma é considerado consistir de uma contínua série de bandas, que são numeradas em ordem crescente, a partir do centrômero, em cada braço.

"Landmark" são as áreas com características morfológicas distintas que servem como pista diagnóstica na identificação dos cromossomas. Podem ser as regiões terminais dos braços, o centrômero e outras bandas.

Uma região é definida como a área entre 2 "landmarks" adjacentes, numerados em ordem crescente.

Se uma banda que serve de "landmark" requer subdivisão, as sub-bandas conservam o número da banda e da região.

Na designação de uma banda, utilizam-se 4 critérios:

- Número do cromossoma
- Símbolo do braço
- Número da região
- Número da banda dentro da região (FIG.6).

Para uma breve revisão das Normas determinadas na Conferência de Paris, para identificação e descrição das aberrações cromossômicas, sugerimos o trabalho de Simpson (96), a esse respeito.

2.2 - Métodos especiais para os cromossomas sexuais:

2.2.1 - Corpúsculo de Barr:

Histórico:

Descrita por Barr e Bertran, em 1954, em células nervosas de gato (5). Mais tarde identificada em tecidos humanos, presente nas células femininas e ausentes nas masculinas (69). Corresponde ao cromossoma X, inativado na célula.

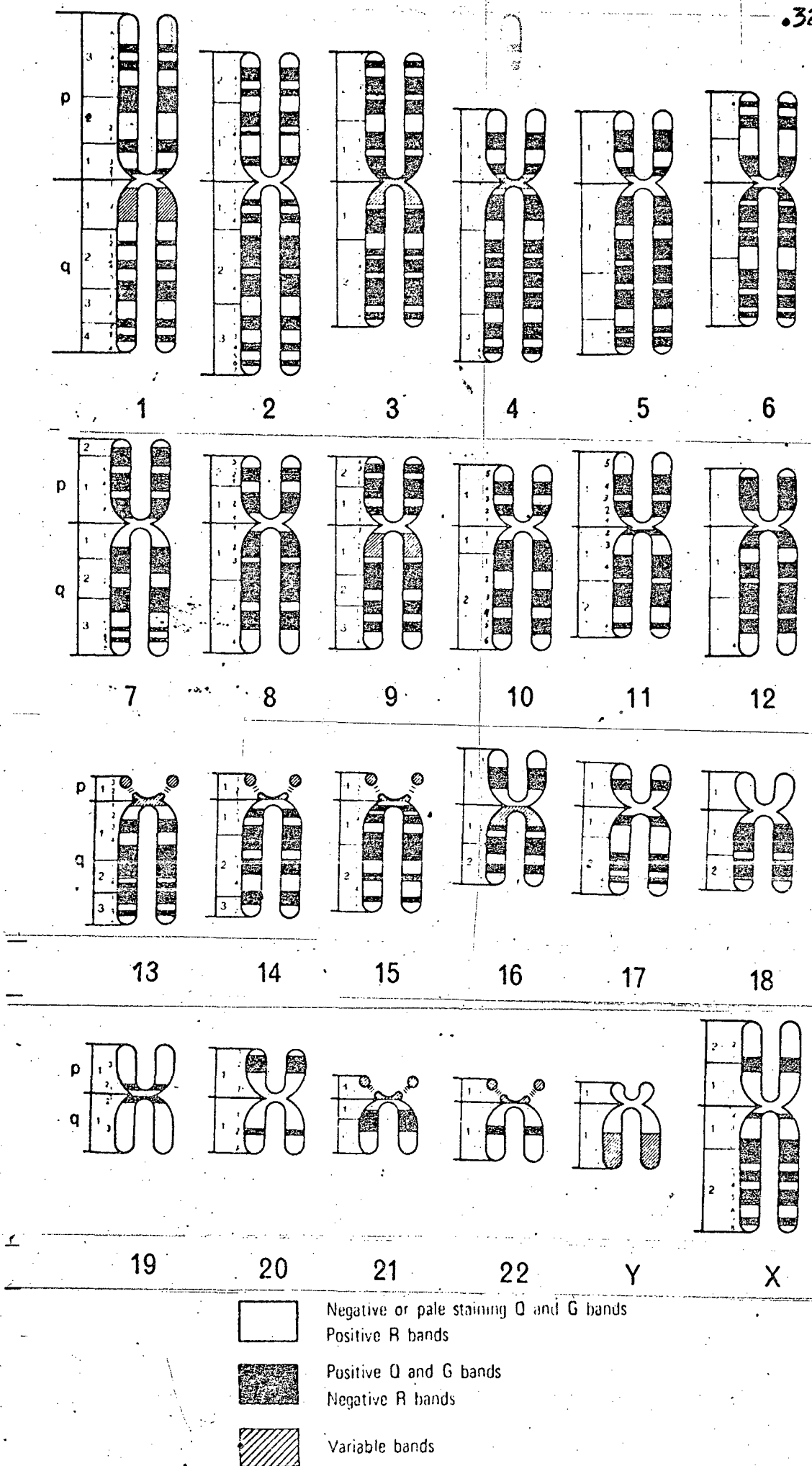


FIG. 5 - REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DAS BANDAS CROMOSSÔMICAS, OBSERVADAS COM OS MÉTODOS DE COLORAÇÃO Q, G e R. (Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics. Birth Defects 8: 7, 1972. The National Foundation, New York)

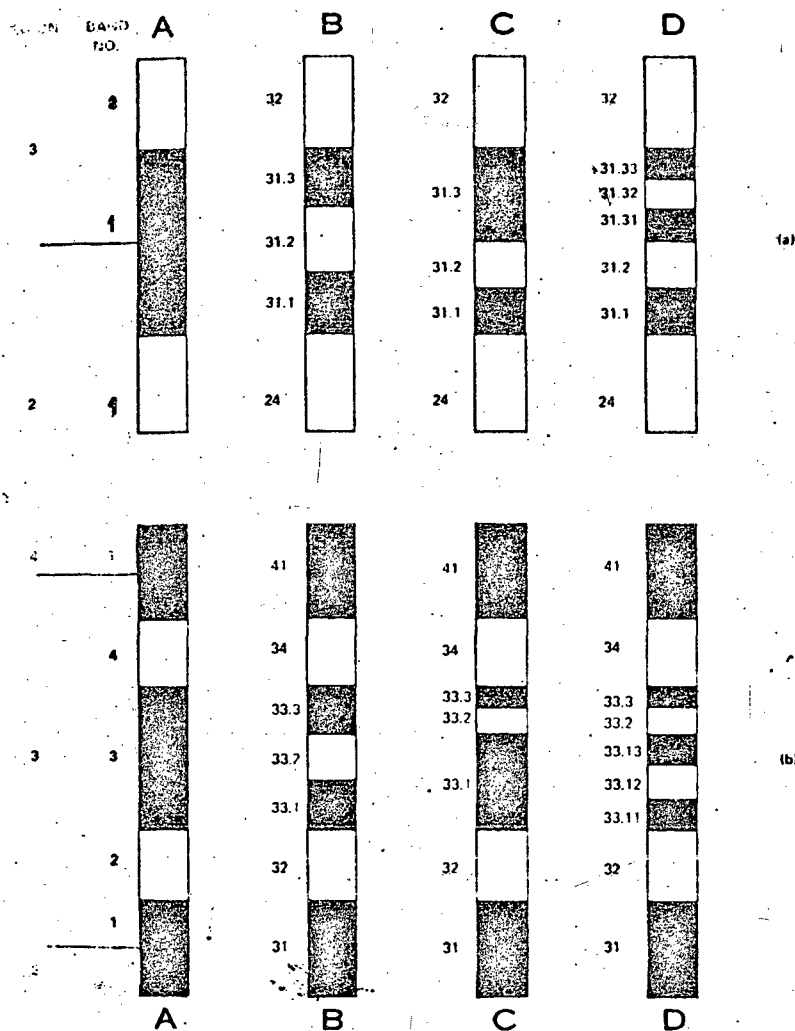


Fig. 6a. Example illustrating the convention for numbering the subdivisions of a landmark bridging two regions: (A) the original landmark (band 31); (B) the subdivision of band 31 into three equal bands 31.1, 31.2, and 31.3; (C) alternatively, the subdivision of band 31 into three unequal bands; (D) further subdivision of band 31.3 into three equal bands 33.31, 33.32, and 33.33.

Fig. 6b. Example illustrating the convention for numbering the subdivisions of a band within a region: (A) the original band 33; (B) three equal bands 33.1, 33.2, and 33.3; (C) alternatively, the subdivision of band 33 into three unequal bands; (D) further subdivision of band 33.1 into three equal bands 33.11, 33.12, and 33.13.

FIG. 6 - EXEMPLO DE NUMERAÇÃO DAS SUBDIVISÕES DOS CROMOSSOMAS.
(explicações na figura)

(Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics.
Birt Defects 8: 7, 1972. The National Foundation, New York)

Essa inativação ocorre ao acaso, envolvendo ora o X de origem materna ora o X de origem paterna (Teoria de Lyon).

Descrição do método:

Esfregação oral; fixar com etanol 95%, 30 minutos; etanol 70%, etanol 50%, água destilada, 5 minutos; cresy violeta 5 minutos; etanol 95%, agitar por 10 minutos; montar a lâmina com objetiva de imersão em óleo (75).

Técnica utilizada no I.E.D.E.: Fixação em álcool-éter 50%; hidrólise do núcleo em ácido corídrico 1 N, durante 10 minutos; lavar em água corrente; corar em cristal-violeta durante 1 minuto. (Comunicação pessoal da Dra Rosa Rita dos Santos Martins).

Fundamentos teóricos:

A cromatina de X é Feulgen positivo e tem grande afinidade pelo methyl green, mostrando que possui DNA em alta concentração (69).

Estudos com timidina tritiada demonstraram ser o corpúsculo de Barr o que replica tardiamente no período S (41). A cromatina de X condensa em volta de um centro situado no braço longo do cromossoma X, na região pericentromérica(114).

Características de coloração:

A cromatina de X é vista como um corpúsculo plano convexo, de 1 μ de diâmetro, acoplada a face interna da membrana nuclear.

Estudo de diversos tecidos humanos mostrou que todos têm a cromatina de X nas células femininas. É melhor reconhecida nas células da cartilagem e da zona fasciculada da suprarrenal, devido a presença de um núcleo vesicular; mais difícil de ser reconhecida onde a cromatina é grosseira, como nas células tubulares renais e fígado(69).

Para uso de rotina, são escolhidas as células de esfregação oral, pela maior facilidade de colheita, considerando-se normal para a mulher a identificação de 25 ou mais corpos de cromatina por 100 células (75). No entanto, este tecido é o que tem o menor número de núcleos positivos (44). Corpúsculos semelhantes aos de X também foram encontrados em células masculinas, mas em número muito menor: em 2 de cada 100 células (69,75).

A cromatina de Barr aparece em número igual ao de cromossoma X, de replicação tardia. Assim, em mulheres normais 46,XX há 1 corpúsculo. Em indivíduos XO e nos homens normais, a cromatina é negativa.

Considerando n o número de cromossomas X da célula, o número de cromatinas será sempre igual a $n - 1$. Por exemplo: indivíduos 47,XXX

têm duas cromatinas e indivíduos 48,XXXX têm três cromatinas.

A cromatina pode ser menor que 1 μ nos casos de deleções de X ou em presença de X em anel. A cromatina maior que 1 μ é encontrada no isocromossoma de braço longo de X (44).

Moore e Barr sugerem que nas células da cartilagem, cortex adrenal e nos folículos tireoideanos, a cromatina possa ser um pouco maior que nos outros tecidos (69). Mosaicismo pode ser suspeitado quando a frequência da cromatina de Barr nas células da mucosa oral estiver abaixo de 10% (2).

É postulado que, em alguns núcleos, a cromatina de Barr tem estrutura bipartida (44). Therman e cols. (114) afirmam que um cromossoma X normal praticamente nunca tem o corpo de Barr bipartido e sugerem um centro de condensação no braço longo do cromossoma, na região pericentromérica. Apresenta dois casos de duplicação do braço longo, [1(Xq) e dic(Xq)], que evidenciam cromatina bipartida, sugerindo a presença de dois centros de condensação. De acordo com essa hipótese, a perda total do braço longo [Xq⁻ e i(Xp)] não formaria corpúsculo de Barr e o cromossoma não seria inativado, sendo a linha gem inviável. Isso talvez justifique a ausência dos padrões relatados.

Interessantes trabalhos têm mostrado variações no número de corpos de Barr no esfregaço oral, durante o ciclo menstrual e gestação.

Schmidt e cols. (98), estudando durante 3 e meio meses 17 mulheres com regularidade menstrual e sem uso de medicação hormonal, encontraram redução de cromatina positiva no esfregaço oral, durante o período do 9º a 12º dias do ciclo. Sugerem que, se a presença da cromatina de X representa um cromossoma inativo, o número de cromossomas inativos deve diminuir durante esse período.

Towser e cols. (116) encontraram diminuição da cromatina de Barr durante a gestação em 44 pacientes, nas quais realizaram contagens periódicas. Correlacionam os achados com "ativação" e "desativação" periódica do 2º cromossoma X, na mulher. Confirmando essa hipótese, referem que a dosagem de glicose-6-fosfato desidrogenase e o fator VIII dependentes do cromossoma X, estão aumentados nesse período.

Em ambos os casos, a diminuição da contagem da cromatina correlaciona-se mais consistentemente com níveis aumentados do estrogênio, que com os níveis de progesterona e gonadotrofinas (116).

Observações:

A cromatina de X é encontrada em todos os mamíferos fêmeos, podendo haver variações no aspecto morfológico (69).

2.2.2 - "Drumstick"

Histórico:

Em 1974, Davidson e Smith(25) verificaram que há diferença entre o núcleo dos neutrófilos nos dois sexos. Em 50 lâminas examinadas ao acaso, não houve erro na determinação dos sexos.

Descrição do método:

Lâmina com esfregaço de sangue periférico, coradas com Giemsa ou Feulgen (25).

Fundamentos teóricos:

Os autores sugerem que a agregação da cromatina no "drumstick" represente a combinação do cromossoma XX e que a agregação da cromatina XY forme uma projeção insignificante, ou permaneça dentro dos lobos dos neutrófilos. Os "drumsticks" ocorrem caracteristicamente nos neutrófilos maduros, sendo raramente encontrados nas formas não segmentadas e não foram demonstrados nas células precursoras (25).

Características de coloração:

A condensação da cromatina no núcleo dos neutrófilos, é mais no tável na mulher que no homem. No entanto, é mais fácil reconhecer a mulher por um nódulo de cromatina solitário, o qual aparece separado do principal lobo nuclear. A denominação de "drumstick" foi dada pelos autores (25).

Observações:

Tem o mesmo significado que a cromatina de X nos outros tecidos (44). Não foi evidenciado no homem (25). Ocorrem 1 a 3% das células (44,75). Esta técnica é muito pouco usada, apresentando pouca aplicação na prática.

2.2.3 - Cromatina de Y

Histórico:

O método foi descrito por Pearso e Bobrow, em 1970 (84).

Baseados nos trabalhos de Casperson e cols. (18), os autores utilizaram derivados fluorescentes da acridina, devido a sua propriedade de coloração do cromossoma Y na interfase.

Descrição do método:

Esfregação oral fixado com metanol ou álcool 50%, cultura de fibroblastos da pele ou cultura de linfócitos. Lâminas expostas por 5 minutos em solução aquosa de quinacrina dihidrocloride, lavadas por 3 minutos em água corrente; Buffer pH 5,5; montadas em buffer de glicerol (84).

Fundamentos teóricos:

A quinacrina liga-se, preferentemente, aos segmentos ricos em adenina-timina (5,22,29,44).

Características de coloração:

Em 25 a 50% das células, são identificados os cromossomas Y como simples ponto de fluorescência de 0,25 μ m de diâmetro. Em 10 a 20% dos casos, o corpo de Y mostrou dupla estrutura, menores que o corpo simples. Não aparecem nas células femininas. São importantes para o diagnóstico de polissomias de Y, onde aparecem tantos corpos fluorescentes quantos forem os cromossomas Y presentes (84). Nos indivíduos XYY ou XXYY, dois corpos de Y são demonstrados em 15% das células (44).

Já que cora a porção distal de Y, é também importante para o diagnóstico de aberrações estruturais. Por exemplo: isocromossoma de braço longo de Y. Nestes casos, visualiza-se duas massas fluorescentes sempre juntas. No caso de deleção de braço longo, a cromatina Y é negativa. Aparecem em qualquer posição no interior do núcleo (2) e, frequentemente, perto da membrana nuclear (44).

Observações:

Esta técnica complementa a técnica de Barr e Bertram (84). Está indicada nos casos de hermafroditismo verdadeiro, disgenesias gonádicas mistas e suspeita de XYY.

III - ANOMALIAS CROMOSSÓMICAS

3 - ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS

As doenças cromossômicas originam-se de aberrações numéricas ou estruturais dos autossomas ou cromossomas sexuais.

As anomalias cromossômicas que mostram perturbações da homeostase endócrina, são classicamente relacionadas aos cromossomas sexuais mas, nos últimos anos, tem sido descritos alguns casos de associação entre anomalias dos autossomas e doenças endócrinas. Ainda de interesse para o endocrinologista, no campo da infertilidade masculina e feminina, novas perspectivas diagnósticas se abrem com o reconhecimento de alterações estruturais, antes não identificadas, como responsáveis por abortos de repetição e esterilidade.

3.1 - Cromossomas Sexuais:

3.1.1 - Cromossoma X:

Cromossoma sexual presente em ambos os sexos, submetacêntrico, pertencente ao grupo C, ocupando a periferia da placa metafisária (2).

Com a técnica de autorradiografia, foi demonstrado que no par de cromossoma X, presentes na mulher, um deles incorpora tardiamente ^3H |Td em todo o comprimento (40,41,111) e dá origem ao corpo de Barr (82).

As técnicas de bandeamento mostram os seguintes padrões, conforme descrito pela Conferência de Paris (66):

Técnica Q-Xp: Banda central de média fluorescência, com segmento proximal pálido.

Xq: Segmento proximal pálido, seguido por banda de média fluorescência.

Técnica G: Igual a técnica Q.

Técnica R: O reverso das técnicas Q e G.

Técnica C: Banda restrita ao centrômero.

Técnica BrdU: Reconhece o cromossoma X de replicação tardia (43).

No homem, a inativação genética de X não envolve todo o cromossoma, pois indivíduos com monossomia ou polissomia de X, têm anormalidades no desenvolvimento sexual e somático. Há evidências de que nos indivíduos normais existem locus no X heteropicnótico e no cromossoma Y, que pareiam com locus do cromossoma X ativo, expressando-se fenotipicamente (44).

Determinantes gonadais parecem estar presentes em Xp e Xq, desde que deleções parciais ou totais de ambos os braços estão usualmente associados a disgenesias gonadais, sendo que a duplicação de um braço não compensa a perda do outro. A localização dos determinantes gonadais ainda não está estabelecida, mas existem indicações de que estejam junto ao centrômero em um dado braço e no telômero em outro. Uma vez que as deleções de braço longo usualmente não alteram a estrutura nem manifestam estigmas de Turner, é sugerido que os determinantes estruturais e somáticos localizem-se no braço curto (104).

3.1.2 - Cromossoma Y:

Cromossoma sexual, presente no homem normal em dose simples, ausente na mulher normal, submetacêntrico (104), ocupando posição periférica na placa metafisária (5).

O padrão de bandas descritas pela Conferência de Paris, é a seguinte:

Técnica Q: Banda de intensa fluorescência na porção distal do braço longo.

Técnicas G e R: Variáveis.

Técnica C: Pequena banda no centrômero, banda larga no segmento distal de Yq.

A autorradiografia, mostra um padrão semelhante aos métodos Q e C. (5).

O cromossoma Y é o mais variável do cariotipo humano (11). A variação de comprimento corresponde ao segmento terminal Yq inativo (10), que apresenta fluorescência brilhante pelo método Q (84,122), sendo igual nos descendentes e diferindo entre os grupos raciais (44, 97).

A presença de cromossoma Y leva a diferenciação testicular, mesmo em indivíduos com polissomias de X (Ex.: 48,XXX \bar{Y}) (44), localizando-se os determinantes testiculares em Yp, próximo ao centrômero (36,44,104,118). Os determinantes estruturais existem em Yp, provavelmente homólogos em Xp (44,76,104).

Quack e Noel (91), utilizando coloração pela prata em células de biópsia testicular, evidenciam associação término-terminal entre o cromossoma X e Y, durante a meiose.

3.2 - Desenvolvimento Sexual:

O desenvolvimento sexual normal necessita da presença de dois cromossomas sexuais. Na mulher, a determinação de sexo é feita pelo par sexual XX e, no homem, pelo par sexual XY (8).

Segundo Jirásek (49), existem quatro vias de desenvolvimento, nas quais o padrão cromossômico influencia na histogênese gonadal (FIG. 7):

3.2.1 - Primeira:

A presença de cromossoma Y determina a diferenciação dos cordões seminíferos testiculares, mesênquima testicular intersticial e túnica albugínea. As combinações compatíveis com a diferenciação normal dos cordões testiculares, são XY, XYY e XXY. A regressão dos ductos de Müller depende da diferenciação normal dos cordões testiculares e túnica albugínea.

3.2.2 - Segunda:

A diferenciação defeituosa dos cordões testiculares e túnica albugínea primitiva ocorre se a linhagem XO encontra-se presente em mosaicos com linhagens contendo o cromossoma Y (XO/XY; XO/XYY; XO/XXY), ou se houver deficiência dos determinantes sexuais no cromossoma Y, como nos casos de disgenesia gonadal pura XY e anomalias estruturais de Y.

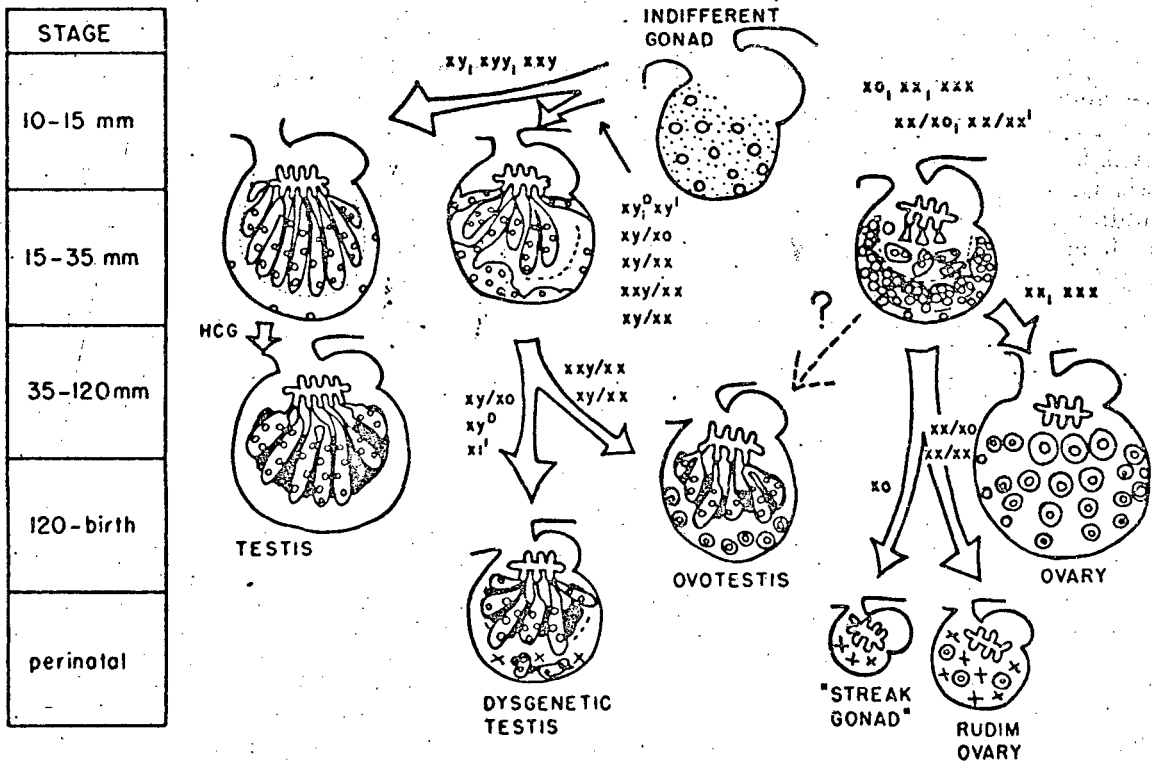
Nesses casos, a diferenciação dos elementos gonadais é prolongada e a túnica albugínea hipodesenvolvida. A persistência dos ductos de Müller, é associada a disgenesia testicular.

3.2.3 - Terceira:

A regressão dos componentes do ovário primitivo e inabilidade na formação dos folículos primordiais, é observado em indivíduos XO. Isso ocorre devido a ausência da porção não heteroplenótica do segundo cromossoma X. A degeneração dos elementos germinativos começa no início da formação dos folículos primordiais, resultando numa gônada "streak",

3.2.4 - Quarta:

A diferenciação dos folículos primordiais é um traço ovariano específico, ocorrendo somente na presença da porção ativa do X heteroplenótico. É o que acontece na mulher normal 46,XX e nas polissomias de X.



MORPHOGENETIC PATHWAYS OF GONADAL DEVELOPMENT

FIG. 7 - VIAS MORFOGÊNICAS DO DESENVOLVIMENTO GONADAL (Jirásek, J.E. Birth Defects 7(6): 164, 1971)

3.3 - Anomalias dos Cromossomas Sexuais:

As anomalias numéricas dos cromossomas sexuais, são representadas por monossomias de X, polissomias de X e polissomias de Y, associadas ou não, a mosaicismos (29,36,44,50,76,104,118). A monossomia de Y é inviável (26). Quase todas as anomalias estruturais relatadas para os demais cromossomas, também têm sido descritas para o cromossoma X e Y, tais como deleções, translocações, isocromossomas de braço longo e curto, inversões, dicêntricos e anéis (2,76,104). As anomalias estruturais de X e Y estão geralmente associadas ao fenotipo da Síndrome de Turner, em mosaicismo ou não, com as linhagens XO e/ou XX ou mais complexos (26,33,36,76,104,107). Nos casos de isocromossomas de braço longo de Y, isso se deve a perdas dos determinantes testiculares dos braços curtos (104).

De Grouchy (42) cita que menos de 0,6% dos recém-nascidos, são carreadores de uma anormalidade cromossômica. Os cromossomas sexuais aneuplóides representam um terço de todos os rearranjos. Os mais frequentes, são: 47,XXY e mosaicos (0,12%); 47,XYY e mosaicos (0,10%); 47,XXX (0,08%) e 45,X (0,04%).

3.3.1 - Síndrome XXY e variantes:

Indivíduos com cariotipos 47,XXY são reconhecidos como portadores da Síndrome de Klinefelter, sendo cromatina positiva. Clinicamente, apresentam hábito eunucóide, ginecomastia, hipogonadismo hipergonadotrópico, com testículos pequenos e firmes e azoospermia (2,44,57,76). Têm tendência ao retardamento mental e, em cerca de 15 a 20% dos casos, o Q.I. encontra-se abaixo de 80. Comumente são inseguros, tímidos e lentos de raciocínio (106). Foi encontrada uma incidência de 9,71/1000 indivíduos, em instituição de retardamento mental (76).

São relatadas variantes dessa Síndrome, com cariotipos 48,XXXY; 49,XXXXY; 46,XX/47,XXY; 46,XY/47,XXY e 46,XX. (2,32,38,44,76,90,103). O maior número de cromossomas X é relacionado com maior grau de retardamento mental. Pacientes com mosaicismo 46,XY/47,XXY, podem ter algum desenvolvimento testicular e não exibir as características clínicas da Síndrome, queixando-se, apenas, de esterilidade. São descritos alguns casos 46,XY/47,XXY férteis (44).

Quando ocorre mosaicismos com 45,XO, o fenotipo pode apresentar estigmas de Turner a agenesia gonadal (50). Nos casos 46,XX, Ferguson-Smith e cols. (32,34) sugerem a ocorrência de crossing over acidental durante a meiose paterna, com recombinação dos determinantes gonadais de X e Y.

A despeito de ser descrito, o mosaicismos é menos comum na Síndrome de Klinefelter que em outras desordens de diferenciação sexual (36).

A cromatina de Y e X, são sempre positivas. Nos casos XXXY e XXXXY, há dois e três corpos de Barr, respectivamente (44). O cariotipo convencional é útil na detecção de mosaicismos, possibilitando o estudo de vários tecidos (43).

3.3.2 - Polissomias de Y e variantes:

Um grande número de aberrações numéricas do cromossoma Y, tem sido descritas: 47,XXY; 45,XO/47,XXY; 45,XO/46,XXY; 48,XXYY; 48,XYYY; 46,XX/47,XXY; 49,XXYY, 46,XY/47,XXY (2,44,76,106).

As polissomias de Y estão relacionadas com o desenvolvimento testicular, fertilidade, alta estatura, distúrbios de comportamento, agressividade, acne, anomalias esqueléticas (44,46,106). A coloração com quinaquina dihidrocloride, mostra tantos corpos fluorescentes quantos são os cromossomas Y presentes. A cromatina de Barr é positiva, nos poucos casos de mosaicos com mais de um cromossoma X. O cariotipo convencional pode identificar os mosaicos.

3.3.3 - Polissomias de X e variantes:

As polissomias de X são relacionadas a mulheres férteis, com ciclos menstruais regulares, sem desvios grosseiros do fenotipo e com aumentada incidência de retardamento mental. Podem ser encontrados os seguintes cariotipos: 47,XXX; 48,XXXX; 47,XXX/48,XXXX; 46,XX/47,XXX/48,XXXX, sem desvios acentuados do fenotipo da mulher normal (2,45,76). Quando associados ao padrão 45,XO, como no caso 45,XO/46,XX/47,XXX, apresenta estigmas de Turner, amenorréia primária e baixa estatura (50). A cromatina de Barr é tantas

vezes positiva quantos são os cromossomas X, menos um. O cariotipo convencional identifica os mosaicos.

3.3.4 - Monossomias de X e Variantes:

A monossomia de X é representada pela Síndrome de Turner, com baixa estatura, amenorréia primária, ausência de desenvolvimento mamário e desenvolvimento escasso ou ausente de pilificação (2,44,57,76,90,108). A baixa estatura está presente em 95% dos casos. Nas séries estudadas, os autores encontraram em 3% das pacientes ocorrência de menstruação e, em 5%, desenvolvimento mamário, sendo relatado alguns poucos casos de fertilidade. Os estigmas somáticos podem ser variáveis, ocorrendo, em ordem de frequência: pescoço curto, hipoplasia e malformação ungueal, nevos pigmentados, cubitus valgus, torax em escudo, IV metacarpo curto, anormalidades auditivas, pescoço alado, linfedema, anomalia renal, hipertelorismo, palato ogival, epicanto, anormalidade visual, retardo mental, anomalia vertebral e cardiovascular (104). Há aumento das gonadotrofinas hipofisárias, caracterizando o hipogonadismo primário (44,50 66,92).

Ao padrão básico 45,X0, podem ser encontrados mosaicismos com 46,XX e/ou alteração numéricas e estruturais de X ou Y representando variantes da Síndrome de Turner (QUADRO 3). A variabilidade da síndrome dismórfica é mais importante nesses casos, podendo haver com mais frequência, algum desenvolvimento mamário, pelos axilares e pubianos e menstruação (43,72,104). Em pacientes com linhagens simples de anomalias estruturais dos cromossomas sexuais, o aspecto somático e gonadal parecem ser relacionados à extensão da deficiência dos braços curtos e longos do segundo cromossoma X ou do cromossoma Y (44).

O aspecto macroscópico e microscópico das gônadas, é também variável. A aplasia total, em banda fibrosa, é mais frequente em alguns casos. Pode haver início de desenvolvimento ovariano, que se reduz à presença de alguns folículos primordiais (43,53).

Entre as desordens da diferenciação sexual, a Síndrome de Turner é a que apresenta maior número de mosaicismos, encontrando-se em 1/3 dos casos (36).

CARIOTIPOS	CORPO DE BARR	FREQUÊNCIA %
1) - Monossomia de X 45,X	0	55
2) - Mosaicos 46,XX/45,X 47,XXX/45,X 47,XXX/46,XX/45,X	1 2 2	10
3) - Isocromossomas de X 46,X,i(Xq) 46,X,i(Xq)/45,X 47,X,i(Xq),i(Xq)/46,X,i(Xq)/45,X 46,X,i(Xp) (*) 46,X,i(Xp)/45,X	1 1 2 1 1	20
4) - Deleções de X 46,X,del(Xp) 46,X,del(Xq) 46,X,del(Xp)/45,X 46,X,del(Xq)/45,X	1 1 1 1	5
5) - Anel de X 46,X,r(X)/45,X	1	5
6) - Cromossomas Y 46,XY (**) 46,XY/45,X 46,XXY/45,X 46,X,del(Yp)/45,X 46,X,i(Yq) 46,dic(Y)	0 0 0 0 0 0	5
7) - Cariotipo normal 46,XX (***)	1	

(*) Padrão inviável, segundo Therman (114).
(**) Síndrome de Noonan (77)
(***)

QUADRO 3 - CARIOTIPOS OBSERVADOS NA SÍNDROME DE TURNER
(de Grouchy, J. & Turleau, C. Atlas des Maladies Chromosomique.
Paris, Exp. Scientifique, 1977. p. 286)

O diagnóstico é confirmado pela cromatina de Barr negativa, nos padrões XO. Nos mosaicos e anomalias estruturais de X, a cromatina é positiva. O cariotipo de diversos tecidos pode estabelecer o diagnóstico de mosaicismo.

Nos casos de anomalias estruturais de X devem ser empregados os métodos de bandeamentos cromossômicos, que identifica e estabelece o tipo de anomalia cromossômica (44). Se o padrão XO estiver em mosaico com linhagens contendo o cromossoma Y, a cromatina de Y será positiva se o cromossoma tiver preservado o segmento distal do braço longo.

Se a aberração for dicêntrica de braço longo do cromossoma Y, ou isocromossoma de braço longo de Y, a coloração com quinaacrina dihidrocloride mostrará ambos os braços fluorescentes. (2). Se a cromatina de Y for negativa mas houver suspeita da presença do cromossoma, o cariotipo deve ser estabelecido através dos métodos de bandeamento. A maior importância da identificação do cromossoma masculino nesses casos, é a alta incidência de gonadoblastomas e disgerminomas nos resquícios gonadais existentes (2, 97, 100, 108). A indicação precoce da estirpação cirúrgica do tecido, é imperiosa. (97,108).

3.3.5 - Translocações envolvendo o cromossoma X:

São ainda citados casos de translocações de X/autossoma, translocação X/Y e translocação X/X. No primeiro caso, se a translocação for balanceada, não haverá alteração do fenotipo. A translocação desbalanceada X/autossoma, X/Y e X/X, podem estar associadas com alguns estigmas de Turner (2). Também são descritos casos de cariotipos 45,XO com presença de X gigante, devido a fusão dos dois cromossomas, apresentando alguns estigmas de Turner - (44).

3.3.6 - Anomalias estruturais de Y:

As anomalias estruturais de Y têm sido descritas com os mais variados fenotipos. Almeida e cols. (2), classificam-nas em dois tipos:

3.3.6.1 - Sem repercussão fenotípica:

Inversão pericêntrica e paracêntrica e deleção parcial de braço longo.

3.3.6.2 - Com repercussão fenotípica:

Isocromossoma de braço longo ou curto, dicêntrico, anel e translocação Y/autossoma.

3.3.7 - Disgenesia e hermafroditismo:

Linhagens XX, XY e mosaicos com padrões XO, polissomias de X e alterações estruturais de cromossomas Y e X, têm dado origem a fenotipos variáveis, classificados segundo a natureza da gônada e do fenotipo:

3.3.7.1 - Disgenesias gonado-somáticas com gônadas "streak, compreendendo a Síndrome de Turner e variantes (QUADRO 3).

3.3.7.2 - Disgenesias gonadal pura (Síndrome de Swyer), com gônadas streak, infantilismo sexual e ausência de defeitos somáticos de baixa estatura (2,3,21,43,90).

3.3.7.3 - Disgenesias gonadal mista, apresentando diferenciação gonadal assimétrica, sendo uma das gônadas constituída por testículos mais ou menos diferenciados e, a outra gônada Streak, ou tumor ou inexistente. É considerada como a principal causa do chamado pseudo hermafroditismo masculino (2). A maioria dos casos apresenta genitalia externa ambígua, acne, calvície parietal, etc. (93). Se a linhagem XO estiver presente, o indivíduo pode apresentar estigma de Turner (1.2.71.90).

3.3.7.4 - Hermafroditismo verdadeiro, com presença de tecido testicular e ovariano, separados ou fundidos. Quando se encontram fundidos em uma mesma gônada, chama-se ovotestis (103). A genitalia externa, quase sempre tem aparência intersexual (43). Nos pacientes com testículos de um lado e ovário de outro, o desenvolvimento do ducto homolateral é usualmente consistente com a glân

A - CARIOTIPOS OBSERVADOS NO HERMAFRODITISMO VERDADEIRO:

Cariotipos:	Frequência:
46,XX	50
46,XY	20
46,XY/45,X	20
46,XX/46,XY	
47,XXY/46,XX	10
47,XXY/46,XY/46,XX	
48,XXYY/46,XX	
49,XXYYY/47,XXY/46,XX	
47,XX,1(Yq)/46,XX,45,X	
47,XXX/46,XX	

B - CARIOTIPOS NO PSEUDO HERMAFRODITISMO MASCULINO POR ABERRAÇÕES CROMOSSOMIAIS:

Maioria dos casos:	Excepcionalmente:
46,XY/45,X	46,X,del(Yq)/45,X
	46,XX/46,XY/45,X
	47,XY,1(Yp)/46,X,1(Yp)/45,X
	47,XXY/46,XX/46,XY/45,X
	47,XXY
	47,XXY/47,XXY/46,XY
	46,XX/45,X
	46,XX (*)
	45,X

C - CARIOTIPOS NAS DISGENESIAS GONADAIS PURAS:

46,XY (**)
 46,XY/45,X
 47,XXY/46,XY/45,X
 46,XX/46,XY
 46,XX (***)
 46,XX/45,X
 47,XXX/46,XX/45,X
 46,X,del(Xq)

D - CARIOTIPOS NAS DISGENESIAS GONADAIS MISTAS

46,XY/45,X (****)
 45,X
 46,XY
 46,XX/46,XY/45,X
 48,XXX/45,X
 47,XXY/46,XX/46,XY/45,X
 47,XY,1(Yp)/46,X,1(Yp)/45,X
 46,X,del(Yz)/45,X
 48,XXX,del(Yq)/46,X,del(Yq)/45,X

(*)- Ferguson-Smith (34) sugere nesse caso, recombinação dos determinantes gonadais de X e Y.

(**)- Provavelmente, herança autossômica recessiva (90).

(***)- Mais comum (1).

QUADRO 4 - CARIOTIPOS

(de Grouchy, J. & Turleau, C. Atlas des maladies chromosomiques.

Paris, Exp. Scientifique, 1977. p. 313)

duela do mesmo lado. A maioria dos pacientes com ovotestis, tem predominantemente desenvolvimento feminino dos ductos genitais (44).

3.3.7.5 - Pseudo hermafroditismo pode ser feminino ou masculino (51), mas somente este último pode se originar de aberrações cromossômicas. De Grouchy e Turleau (43) consideram raros esses casos. Grumbach e Van Vick (44) definem o pseudo hermafroditismo masculino como uma condição na qual as gônadas são exclusivamente testículos. Nesta condição os ductos genitais e a genitália externa, falham em atingir a completa masculinização, desenvolvendo, a genitália externa, graus variáveis de feminilização.

Almeida e cols. (2) consideram que a disgenesia gonadal mista, seja a principal causa dessa anomalia. Outros autores consideram as duas entidades separadamente (1, 43, 90).

Os padrões cromossômicos encontrados nestas anomalias estão representados no Quadro 4. O diagnóstico de certeza dessas entidades, é dada pelo estudo histológico da gônada (57). O estudo citogenético deve ser sempre realizado para estabelecer o cariotipo; a presença do cromossoma Y orienta para exeresse do tecido gonadal disgenético (97).

Padrões XX associados a disgenesia gonadal, são também descritos. Ferguson-Smith especula a ocorrência de fator mecânico ou viral, interferindo com o desenvolvimento normal das células germinativas (50,67). Levinson sugere deficiência primária de todos os elementos do ducto genital, com a ausência concomitante do ovário fetal(61).

3.4 - Outras doenças endócrinas associadas à aberrações cromossômicas:

Com excessão das anomalias do desenvolvimento sexual, as aberrações cromossômicas não têm sido responsabilizadas na gênese das doenças endócrinas. No entanto, algumas observações interes-

santes tem sido feitas nos casos em que essa associação foi relatada.

Cita-se os seguintes tópicos, a guiza de exemplos:

- Nos pacientes portadores de Síndrome de Turner, a associação com Tireoidite de Hashimoto e Diabetes Mellitus são relativamente frequentes (31,44,107). Tem sido encontrada principalmente associadas a tireoidite autoimune, nos casos de isocromossomas de braço longo de X(Xq1), que apresentam trissomia de braço longo e monossomia de braço curto X (31). A associação é menos frequente nos casos 45,X0 não mosaicos, mas tem sido revelada em outras variantes da Síndrome de Turner (107).

Engels & cols. (31) sugerem que o material genético de X esteja envolvido na expressão de Diabetes Mellitus e Tireoidite de Hashimoto, relevando o fato de que essas duas patologias são mais frequentes no sexo feminino.

- Diabetes Mellitus também é relatada em alta frequência, nos pacientes com Síndrome de Klinefelter XXY (44).

- Síndrome de Kallman, com ginecomastia, agenesia dos músculos braquiais, anomalias dentárias e discromatopsia associados a presença de pequeno cromossoma metacêntrico extra, em cultura de leucócitos periféricos (47,XY,mat?+), foi relatado por Ventruto & cols. (117).

Os autores aceitam a possibilidade de que o caso presente apenas coincidência, mas ressaltam que nesse caso, a histologia testicular mostrou maior lesão do epitélio germinativo que o esperado pela mera ausência de estimulação gonadotrópica e que anormalidades cromossômicas similares, têm sido descritas em casos de oligospermia.

- Doenças autoimunes da tireóide, hipertireoidismo e hipotireoidismo, congênito e adquirido, têm sido descritas na Síndrome de Down (37,120), assim como Diabetes Mellitus (24, 62).

Murdoch & cols. (74), em recente publicação de seus trabalhos sobre o estudo da função tireoideana de 82 pacientes adultos com Síndrome de Down, revela que encontrou incidência elevada de anormalidades, quando comparados com 82 pacientes controles, não

mongóis.

Os níveis de T_3 , T_4 e FTI (índice de tiroxina livre), foram significativamente reduzidos e, os níveis de TSH plasmático, significativamente elevados. Títulos positivos de anticorpos anti-tireoideanos (antitireoglobulina e antimicrosossomiais), foram encontrados em 13,4% dos casos e em 40% anormalidades de um ou mais testes de função tireoideana.

Alguns autores encontraram aumento de anticorpos anti-tireoideanos nas mães de crianças mongóis (37), achado não comprovado em outros trabalhos (121).

- Em 1970, Pergament e cols. (86) descreveram hipoparatiroidismo primário e alterações somáticas em uma criança portadora de cromossoma número 16 em anel. Sugeriram que a homeostase do cálcio e fósforo seria controlada por gens reguladores contidos no cromossoma 16, e que a hemizigose para o locus genético seria incapaz de manter níveis normais desses íons, ou que os distúrbios do desenvolvimento da face e estruturais cervicais, resultariam em paratiroides hipoplásicas.

Posteriormente, em 1972, Olambiwonnu e cols. (78) relataram mais um caso de hipoparatiroidismo primário e alterações somáticas associado a cromossoma em anel. Nesse caso, porém, o cromossoma aberrante era o de número 18. Consideram esses autores que talvez, muitos gens no grupo E podem determinar o equilíbrio do cálcio e fósforo, ou a relação pode ser meramente fortuita.

- Paciente apresentando deleção da porção terminal do braço longo do cromossoma número 1, portadora de hipotireoidismo primário, deficiência de hormônio de crescimento e malformações congênitas, foi descrita por Koivisto e cols., em 1976 (56). O estudo cromossômico foi feito em cultura de leucócitos periféricos e fibroblastos da pele, estabelecendo cariotipo 46,XY,del(1)(q25q32). O bandeamento com método de coloração Q, confirmou a deleção. Os autores se propõem a pesquisar se a perda do locus genético do braço longo do cromossoma número 1 pode afetar a função celular, levando à anomalias do desenvolvimento e distúrbios no metabolismo hormonal.

Algumas drogas utilizadas no tratamento de doenças endócrinas, também têm sido investigadas como agentes causais de aberrações cromossômicas:

- Em biópsia testicular de quatro pacientes com precocidade sexual constitucional, que usaram acetato de medroxiprogesterona por tempo superior a um e meio ano, estudo citogenético evidenciou alterações dos cromossomas meióticos. Aneuploidias, poliploidias e aberrações estruturais foram encontradas, juntamente com lesão de atrofia tubular no exame histopatológico.

Biópsia realizada antes do início do tratamento, não evidenciavam essas alterações.

Camacho e cols. (13), alertam que a lesão testicular permanente pode resultar de tratamento prolongado com essa droga em altas doses, assim como alterações cromossômicas e bioquímicas das células sobreviventes.

- Mc Quarrie e cols. (68), baseados em trabalhos anteriores, realizaram estudo comparativo entre mulheres em uso de contraceptivos orais e mulheres que não fizeram uso dos mesmos, encontrando maior frequência de quebras cromossômicas em cultura de leucócitos periféricos no primeiro grupo. Desde que os hormônios contraceptivos estão em circulação, eles, presumivelmente, têm livre acesso às células germinativas. Os autores discutem que, talvez, o maior perigo de seu uso seja a lesão potencial dos gametas.

Shapiro e cols. (102) estudaram sete mulheres, antes e após o uso da pílula. Não encontraram aumento das anomalias cromossômicas em cultura de leucócitos periféricos, após o uso da pílula.

Littlefiel e cols., considerando o trabalho anterior e de outros autores, realizaram o mesmo estudo e, nas séries estudadas (63,64), não encontraram maior incidência de aberrações cromossômicas com o uso de hormônios sintéticos, deixando a questão em aberto para novas investigações.

3.5 - Infertilidade e Anomalias Cromossômicas:

Um casal é considerado infértil quando não surge gestação após um ano de relacionamento sexual, quando há história de abortos de repetição ou há uma gestação levada a termo e, subsequentemente, as outras concepções são seguidas de aborto (6).

Jacobs (47) considera que 15% de todas as gestações resultam em aborto espontâneo. Outras séries têm incidências de 30% (77) a 50% (89). De Grouchy (42) considera que essa incidência está entre 15 a 20%.

O primeiro estudo citogenético do material abortado foi realizado em 1961, por Penrose e Delhanty (85), que relataram um caso de triploidia. Desde então, estudos subsequentes têm mostrado uma incidência de anormalidades cromossômicas nos abortos espontâneos, que varia de 19% (12), nas séries mais antigas, até 61% (96) nas séries mais recentes. A maioria dos autores têm citado uma incidência de 25 a 55% (54, 80, 109, 113). Dessas, maior número ocorre no primeiro trimestre (12, 54). As aberrações cromossômicas relatadas nesses casos constam de monossomias, polissomias, poliploidias, mosaicismos e aberrações estruturais, atingindo todos os grupos (59).

De Grouchy (42) cita que a monossomia de X é responsável por 15 a 25% de todos os abortos cromossômicos, e que menos de 5% dos zigotos 45,X chegam a termo. A outra maior incidência é para trissomias, que contam com mais de 50% de todas as anomalias. Destas, são mais frequentes trissomias dos grupos C, D, E e G. São mais raras as dos grupos A, B e F, sendo o cromossoma número 16 o mais afetado (15 a 20% de todas as anomalias). Considera que as triploidias são tão frequentes quanto as monossomias de X e que monossomia de autossomas é inexistente. As anomalias estruturais contam com 4% do total, ocorrendo a translocação robertsoniana em 50% desses casos. Essas alterações são devidas a anomalias dos gametas, portanto, de origem meiótica. Os mosaicismos, que também ocorrem, são de origem mitótica.

Larson e Titus (59), fazendo extensa revisão da literatura de todos os casos de abortos cromossômicos relatados até 1970, encontraram que a maior incidência é de trissomia dos autossomas, achado que concorda com a revisão de de Grouchy, referidas

acima.

Dos conceptos portadores de aberrações cromossômicas, menos de 0,6% chegam a termo (92). Poland e Lowry (89) encontraram 10% de incidência de anomalias cromossômicas entre os natimortos.

A incidência de anomalias cromossômicas encontradas na população em geral, é de 0,4% (80). Entre os pacientes com história de infertilidade, essa incidência é 12 vezes maior (109).

Jacobs (47) cita quatro causas para as anormalidades cromossômicas nos conceptos:

- a)- Fertilização de um ovo anormal por um espermatozóide normal.
- b)- Fertilização de um ovo normal por um espermatozóide anormal.
- c)- Polispermia durante a fertilização.
- d)- Perda na anáfase.

Smith, foi o primeiro a relatar anomalia cromossômica em uma família com história de abortos de repetição. Papp e cols. (80), fizeram revisão de todos os trabalhos realizados desde 1962 (Smith) até 1974. De 1066 indivíduos com história de infertilidade, 70 mostraram anormalidades cromossômicas em uma incidência de 2 a 4%, que é muito maior do que a relatada para a população em geral, de 0,4%.

Grande número de aberrações são encontradas entre os casais inférteis: translocação recíproca e robertsoniana (12,39,79,80,109,113.); inversões peri e paracêntricas (42) e polissomias (54,93).

A incidência de aberrações cromossômicas encontrada entre casais inférteis, por Stenchever e cols. (109) e Byrd e cols. (12) foi de 31,2% e 10,9%, respectivamente. Esses últimos autores, entre casais com história de aborto puro e aborto mais malformação fetal, encontraram entre os familiares uma incidência de aberrações cromossômicas de 6,8% a 27,3%, respectivamente. O último grupo, é mais frequente entre as mulheres inférteis.

Entre os casos de aborto de repetição, o estudo cito genético é rotineiramente justificado (80). As técnicas de bandejamento cromossômico trouxeram ao conhecimento diversas aberrações estruturais, que possibilitam um diagnóstico que não era possível com o uso do método convencional (88,99,109,112).

Atualmente, o estudo dos cromossomas meióticos podem mostrar aberrações cromossômicas em homens inférteis, cuja cultura de leucócitos periféricos e esfregaço oral, não revelam anormalidades (52). Além disso, Cheval (19) considera que esse estudo pode ser útil, também, na abordagem terapêutica e detecção do sítio da falha de espermatogênese.

Oligo e azoospermia, assim como história de aborto precoce, têm sido relatados em pacientes carreadores de anomalias cromossômicas (12,52,93), sendo as técnicas citogenéticas úteis no seu diagnóstico (96).

Segundo de Grouchy (42), as crianças nascidas de portadores de translocações, podem ter:

- a)- Fenotipo e cariotipo normais.
- b)- Fenotipo normal e cariotipo balanceado.
- c)- Fenotipo anormal e cariotipo não balanceado.

Análise cromossômica deve ser realizada em todos os casais com história de abortos e crianças malformadas e, nos casos de gestação subsequentes, amniocentese para análise citogenética - (99).

A amniocentese possibilita estabelecer com quase 100% de certeza, a constituição cromossômica dos fetos (80). Deve ser indicada em casos de gestação com alto risco de anormalidades cromossômicas, como nos casais portadores de translocações ou outras aberrações cromossômicas (80,99,112).

O aconselhamento genético deve ser realizado em todos os casos em que anormalidades cromossômicas são detectadas, para prevenir nascimento de crianças malformadas (12,109).

IV - CONCLUSÃO

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho induz a concluir, até o momento, que os métodos citogenéticos disponíveis permitem identificar todos os cromossomas da espécie humana e detectar suas aberrações numéricas e estruturais.

Em endocrinologia, esses métodos são particularmente importantes no diagnóstico das anomalias dos cromossomas sexuais. Através da cromatina X e Y as anomalias numéricas desses cromossomas podem ser identificadas. Se, em casos de aberrações numéricas, ocorrer a suspeita de mosaïcismo, o método convencional com cultura de vários tecidos será indicado para firmar o diagnóstico.

Nos casos de aberrações estruturais dos cromossomas X e Y as respectivas cromatinas estão presentes em número normal, podendo ou não apresentar alteração morfológica. Nessas anomalias, os métodos de bandeamento permitem a correta identificação do cromossoma e suas aberrações. Os métodos mais importantes para o estudo do cromossoma X são os de coloração Q, G, R, C e BrdU. Para o estudo do cromossoma Y são mais úteis os métodos de coloração Q, R e C.

Outras doenças endócrinas, não relacionadas às anomalias de X e Y, têm sido descritas em associação com aberrações cromossômicas, diagnosticadas através dos métodos citogenéticos disponíveis. No caso, o significado dessa participação ainda não está esclarecido.

O endocrinologista depara-se frequentemente com casos de infertilidade masculina e feminina. Os métodos citogenéticos especialmente os de bandeamento, têm demonstrado carreadores de aberrações cromossômicas entre esses pacientes. A investigação diagnóstica, através desses métodos, se impoem quando causa mais frequente não for confirmada.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AARSKOG, D. Intersex condition masquerading as simple hypospadias. Birth Defects: Orig. Art. Ser. 7(6):122-130, 1971.
2. ALMEIDA, J.C.C.; KAYATH, H.C.; CUNHA, A.G.; LIMA, T.A.; CAMPOS, J.M.S.; NETO, J.G.B. Anomalias dos cromossomas sexuais. In: MOTTA, P.A. Genética Médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. cap. 8. p.177-299.
3. AMAROSE, A.P.; KYRIAZIS, A.A.; DORUS, E.; AIZI, F. Clinical, pathologic and genetic findings in a case of 46,XY pure gonadal dysgenesis (Swyer's syndrome). Am. J. Obstet. Gynecol. 127(8): 824-828, 1977.
4. ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10:81-86, 1971.
5. BEÇAK, W. Citogenética humana. In: Genética médica. São Paulo, Sarvier, 1977. cap. 5. p. 79-95.
6. BENSON, R.C. Infertilidade e anticoncepcionais. In: Mannual de Obstetrícia & Ginecologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1970. cap. 27. p. 754-781.
7. BISHOP, A.; BLANK, C.E.; HUNTER, H. Heritable variation in the length of the Y chromosome. Lancet 2: 18-20, 1962.
8. BLIZZARD, R.M. Sexual development normal and abnormal. Birth defects: Orig. Art. Ser. 7(6): 108-112, 1971.
9. BOBROW, M.; COLLACOT, H.E.A.C.; MADAN, K. Chromosome banding with acridine orange. Lancet 2: 1311-1312, 1972.
10. BOBROW, M.; PEARSON, P.L.; PIKE, M.C.; EL-ALFI, O.S. Length variation the quinacrine-binding segment of different sizes. Cytogenetics 10: 190-198, 1971.
11. BOROVIC, C.L.; LOGHIN-GROSSO, N.S.; FROTA-PESSOA, O. The human Y chromosomes: its routine identification and variability. Rev. Bras. de Pesquisas Med. Biol. 10(3): 159-173, 1977.
12. BYRD, R.J.; ASKEW, D.E.; Mc DONOUGH, P.G. Cytogenetic findings in fifty-five couples with recurrent fetal wastage. Fertil and Steril. 28(3): 246-250, 1977.

13. CAMACHO, A.M.; WILLIAMS, D.L.; MONTALVO, J.M. Alterations of testicular histology and chromosomes in patients with constitutional sexual precocity treated with medroxyprogesterone acetate. J. Clin. Endocr. 34: 279-286, 1972.
14. CASPERSSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G.E.; KUDYNOWSKI, J.; MODEST, E.J.; SIMONSSON, E.; WAGH, U.; ZECH, L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exp. Cell Res. 49: 219-222, 1967.
15. CASPERSSON, T.; GHARTON, G.; LIDSTEN, J.; ZECH, L. Identification of the Philadelphia chromosome as number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. Exp. Cell Res. 63: 238 - 239, 1970.
16. CASPERSSON, T.; HULTEN, M.; LINDSTEN, J.; ZECH, L. Distinction between extra G-like chromosomes by quinacrine mustard fluorescence analysis. Exp. Cell Res. 63: 240-243, 1970.
17. CASPERSSON, T.; SIMONSSON, E.; ZECH, L. UV-absorption and quinacrine mustard fluorescence patterns for chromosome aberration study in Chinese hamster. Exp. Cell Res. 63: 243-244, 1970.
18. CASPERSSON, T.; ZECH, L.; MODEST, E.J.; FOLEY, G.E.; WAGH, U.; SIMONSSON, E. DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. Exp. Cell Res. 58: 141-152, 1969.
19. CHEHVAL, M.J.; MEHAN, D.J.; VOLK, S.L.R. Meiotic figures in the testicular biopsy of subfertile males. Fertil. and Steril. 28(3): 253-256, 1977.
20. CHEN, T.R. & RUDDLE, F.H. Karyotype analysis utilizing differentially stained constitutive heterochromatin of human and murine chromosomes. Chromosoma (Berl) 34: 51-72, 1971.
21. COHEN, M.M. & SHAW, M.W. Two XY siblings with gonadal dysgenesis and a female phenotype. New Engl. J. Med. 272(21): 1083-1088, 1965.
22. COMINGS, D.E. Chromosome organization. In: DONALD, B. Aspects of genetics in paediatrics. Scientific proceedings of the 3rd. unigate workshop. London, Fellowship of Postgraduate Medicine, 1976, p. 17-22.

23. CROSSEN, P.E. & MORGAN, W.F. Analysis of human lymphocyte cell time in culture measured by sister chromatid differential staining. Exp. Cell Res. 104: 453-457, 1977.
24. DANIELS, D.M. & SIMON, J.L. Down's syndrome, hypothyroidism, and diabetes mellitus. J. Pediat. 72(5): 697-699, 1968.
25. DAVIDSON, W.M. & SMITH, D.R. A morphological sex difference in the polymorphonuclear neutrophil leucocytes. Brit. Med. J. 2: 6-7, 1954.
26. DEWHURST, C.J. The aetiology and management of intersexuality. Clin. Endocrinol. 4: 625-642, 1975.
27. DUTRILLAUX, B. & COVIC, M. Étude de facteurs influençant la dénaturation thermique ménagée des chromosomes. Exp. Cell Res. 85: 143-153, 1974.
28. DUTRILLAUX, B. & LEJEUNE, J. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C.R. Acad. Sc. Paris, 272: 2638-2640, 1971.
29. DUTRILLAUX, B. New techniques in the study of human chromosomes. In: MOTULSKY, A.G. & LENZ, W. Birth Defects Proceedings of the 4th. International Conference. Excerpta Medica, 1974.
30. DUTRILLAUX, B. Nouveau système de marquage chromosomique: les bandes T. Chromosoma 41: 395-402, 1973.
31. ENGEL, E.; NORTHCUTT, R.C.; BUNTING, K.W. Diabetes and hypothyroidism with thyroid autoantibodies in a patient with a long arm X-isochromosome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 29: 130-132, 1969.
32. FERGUSON-SMITH, M.A. Abnormal gonadal differentiation in XY females and XX males. Birth Defects: Orig. Art. Ser. 7(6): 204-209, 1971.
33. FERGUSON-SMITH, M.A.; BOYD, E.; FERGUSON-SMITH, M.E.; PRITHARD, J.G.; YUSUF, A.F.M.; GRAY, B. Isochromosome for long arm of Y chromosome in patient with Turner's syndrome and sex chromosome mosaicism (45,X/46,XYq1). J. Med. Genet. 6: 422-425, 1969.
34. FERGUSON-SMITH, M.A. X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism and of XX Klinefelter's syndrome. Lancet 2: 475-476, 1966

35. FERRARO, M.; ARCHIDIACONO, N.; PELLICCIA, F.; ROCHI, A.; CAPOA, A. Secondary constrictions an nucleolus organizer regions in man. Exp. Cell Res. 104: 428-430, 1977
36. FERRIER, P.E.; FERRIER, S.A.; KELLEY, V.C. Sex chromosome mosaicism in disorders of sexual differentiation: Incidence in various tissues. The J. Ped. 76(5): 739-744, 1970.
37. FIALKOW, P.J.; UCHIDA, I.A.; HECHT, F.; MOTULSKY, A.G. Increased frequency of the thyroid autoantibodies in mothers of patients with Down's syndrome. Lancet 2: 368-870, 1965.
38. FRACCARO, M. & LINDSTEIN, J. A child with 49 chromosomes. Lancet 2: 1303, 1960.
39. FRACCARO, M.; MARASCHIO, P.; PASQUALI, F.; TIEPOLO, L.; ZUFFARDI, O. Male infertility and 13/14 translocation. Lancet 1: 488, 1973.
40. GERMAN, J.L. DNA synthesis in human chromosomes. Trans. N. Y. Sci. 24: 395-407, 1962.
41. GILBERT, C.W.; MULDAL, S.; LAJTHA, L.G.; ROWLEY, J. Time-sequence of human chromosome duplication. Nature 195(4844): 869-873, 1962.
42. GROUCHY, J. Human chromosomes and their anomalies. In: DONALD, B. Aspects of genetics in paediatrics. Scientific proceedings of the 3rd. unigate workshop, London, Fellowship of Postgraduate Medicine, 1976, p. 5-13.
43. GROUCHY, J. & TURLEAU, C. Atlas des maladies chromosomiques. - Paris, Expansion Scientifique, 1977, 355 p.
44. GRUMBACH, M.M. & WYK, J.J.V. Disorders of sex differentiation. In- WILLIAMS, R.H. Textbook of endocrinology. 4. ed., Philadelphia, Saunders, 1974. cap. 8. p. 423-501.
45. HAYATA, I.; OSHIMURA, M.; MARINELLO, M.J.; BANNERMAN, R.M.; SANDBERG, A.A. Non-disjunction of an unusual X chromosome. J. Med. Gen. 13: 320-334, 1976
46. JACOBS, P.A.; BRUNTON, M.; MELVILLE, M.M.; BRITTAIN, R.P.; McCLEMONT, W.F. Aggressive behaviour, mental subnormality and the XYY male. Nature 208: 1351-1352, 1965.

47. JACOBS, P.A. Chromosome abnormalities and fertility in man. In: BEATTY, R.A. & GLUECKSOHN-WAELSCH, S. Proceedings on the International Symposium on the Genetics of the Spermatozoon. Edinburgh, Bogthrykkeriet Forum, 1972. p. 346-358.
48. JACOBS, P.A.; FRACKIEWICZ, A.; LAW, P. Incidence and mutation rates of structural rearrangements of the autossomes in man. Am. Hum. Genet., London, 35: 301-311, 1972
49. JIRÁSEK, J.E. Testicular dysgenesis syndromes. Birth Defects: Orig. Art. Ser. 7(6): 159-165, 1971.
50. JONES, H.W.; FERGUSON-SMITH, M.A.; HELLER, R.H. The pathology and cytogenetics of gonadal agenesis. Am. J. Obst. Gynecol. 87(5): 578-598, 1963.
51. JONES, H.W.; PARK, I.J. A classification of special problems in sex differentiation. Birth Defects: Orig. Art. Ser. 7(6): 113-121, 1971.
52. JONES, T.M.; AMAROSE, A.P.; LEBOWITZ, M. Testicular chromosomal mosaicism and infertility. J. Clin. Endocrinol. Metab. 42: 888-896, 1976.
53. KEMMANN, E.; GENTILE, G.; DOUGLAS, A.; JONES, J.R. Gonadal karyotyping in women with and without ovarian activity. Am. J. Obstet. Gynecol. 127(2): 126-129, 1972.
54. KERR, M. & RASHAD, M.N. Chromosome studies on spontaneous abortions. Am. J. Obst. Gynecol. 94(3): 322-339, 1966
55. KLASTERSKA, I. & NATARAJAN, A.T. A modified C-band technic for staining of diffuse diplotene chromosomes. Stain. Technol. 51(3): 209-211, 1976.
56. KOIVISTO, M.; ADERBLOM, H.K.; REMES, M.; De LA CHAPELLE, A. Primary hypothyroidism, growth hormone deficiency, and congenital malformations in a child with the karyotype 46,XY,del(1)(q25q32). Acta Paediatr. Scand. 65:513-518, 1976.
57. LABHART, A. Testis. In:-. Clinical endocrinology, New York, Springer Verlag, 1974. cap. 9. p. 443-510.
58. LA MAZA, L.M. & SANCHEZ, O. Simultaneous G and C banding of human chromosomes. J. Med. Genet. 13: 235-236, 1976.

59. LARSON, S.L. & TITUS, J.L. Chromosomes and abortions. Mayo Clin. Proc. 45(1): 60-72, 1970.
60. LATT, S.A.; WILLARD, H.F.; GERAL, P.S. BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication in human lymphocytes with supernumerary or structurally abnormal X chromosomes. - Chromosoma (Berl.) 57: 135-153, 1976.
61. LEVINSON, G.; ZÁRATE, A.; GUZMAN-TOLEDANO, R.; CANALES, E.S.; JIMENEZ, M. An XX female with sexual infantilism, absent gonads, and lack of Müllerian ducts. J. Med. Genet. 13(1): 68-69, 1976.
62. LITMAN, N.N. Down's syndrome, hypothyroidism, and diabetes mellitus. J. Pediat. 73(5): 789, 1968.
63. LITTLEFIELD, L.G.; LEWER, W.E.; MULLER, F.L.; GOH, K.O. Chromosome-breakage studies in lymphocytes from normal women, pregnant women, and women taking oral contraceptives. Am. J. Obstet. Gynecol. 121: 976-980, 1975.
64. LITTLEFIELD, L.G. & MAILHES, J.E. Comparison of chromosome breakages in lymphocytes and fibroblasts from control women and women taking oral contraceptives. Fertil. and Steril. 26(8): 828-832, 1975.
65. MATSUI, S-I & SASAKI, M. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. Nature 246: 148-150, 1973.
66. Mc DONOUGH, P.G.; BYRD, J.R.; THI THO, P.; MAHESH, V.B. Phenotypic and cytogenetic findings in eighty-two patients with ovarian failure-changing trends. Fertil. and Steril. 28(6): 638-641, 1977.
67. Mc DONOUGH, P.G. & THO, P.T. Twins discordant for 46,XX gonadal dysgenesis. Fertil. and Steril. 28(3): 251-252, 1977.
68. Mc QUARRIE, H.G.; SCOTT, C.D.; ELLSWORTH, H.S.; HARRIS, J.W.; STONE, R.A. Cytogenetic studies on women using oral contraceptives and their progeny. Am J. Obstet. Gynecol. 108(4): 659-665, 1970.
69. MOORE, K.L. & BARR, M.L. Nuclear morphology, according to sex, in human tissues. Acta Anat. 21(3): 14-208, 1954.

70. MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res. 20: 613 - 616, 1960.
71. MORILLO-CUCCI, G. & GERMAN, J. Abnormal Y chromosome and monosomy 45,X: a concept derived from the study of true patients. Birth Defects: Orig. Art. Ser. 7(6): 210-214, 1971.
72. MOSHANG, T.; VALLET, L.V.; CINTRON, C.; BONGIOVANNI, A.M.; EBERLEIN, W.R. Gonadal function in mosaic XO/XY or XX/XY Turner's syndrome. The J. Ped. 30(3): 460-464, 1972.
73. MOTTA, P.A. Aberrações cromossômicas. In:-. Genética médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. cap. p. 137-152.
74. MURDOCH, J.C.; RATCLIFFE, W.A.; Mc LARTY, D.G.; RODGER, J.C.; RATCLIFFE, J.G. Thyroid function in adults with Down's syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44: 453-458, 1977.
75. NEU, R.L. Cytogenetic techniques and terminology In: GARDNER, L.I. Endocrine and genetic diseases of childhood and adolescence. 2. ed., Philadelphia, Saunders, 1975. cap. 9. p. 675-692.
76. NEU, R.L. & GARDNER, L.I. Abnormalities of the sex chromosomes In: GARDNER, L.I. Endocrine and genetic diseases of childhood and adolescence. 2. ed., Philadelphia, Saunders, 1975. cap. 9. p. 793-814.
77. NOONAN, J.A.; EHMKE, D.A. Associated noncardiac malformation in children with congenital heart disease. J. Pediat. 63: 469, 1963.
78. OLAMBIWONNU, N.O.; EBIN, A.J.; FRASIER, S.D. Primary hypothyroidism associated with ring chromosome 18. The J. Ped. 80(5): 833-835, 1972.
79. PALMER, C.G.; MORRIS, J.L.; THOMPSON, B.H.; NANCE, W.E. Fertility and 13/14 translocation. Lancet 1: 728, 1973.
80. PAPP, Z.; GARDÓ, S.; DOLHAY, B. Chromosome study of couples with repeated spontaneous abortions. Fertil. and Steril. 25(8): 713-717, 1974.

81. PARDUE, M.C. & GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science 168: 1356-1358, 1958.
82. Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics. Birth Defects: Orig. Art. Ser. 8: 7, 1972. The National Foundation, New York.
83. PATAU, K. Chromosome identification and the Denver report. - Lancet 1: 933-934, 1961.
84. PEARSON, P.L. & BOBROW, M. Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. Nature 226: 78-80, 1970.
85. PENROSE, L.S. & DELHANTY, J.D.A. Triploid cell cultures from a macerated fetus. Lancet 1: 1261-1262, 1961.
86. PERGMENT, E.; PIETRA, G.C.; KADOTANI, T.; SATO, H. BERLOW, S.B. A ring chromosome no 16 in an infant with primary hypoparathyroidism. The J. Ped. 76(5): 745-751, 1970.
87. PERRY, P. & WOLFF, W. New giemsa method for the differential staining of sister chromatides. Nature 251: 156-158, 1974.
88. PLYMATE, S.R.; BENNER, W.J.; PAULSEN, C.A. The association of D-group chromosomal translocation and defective spermatogenesis. Fertil and Steril 27(2): 139-144, 1976.
89. POLAND, B.J. & LOWRY, R.B. The use of spontaneous abortuses and still births in genetic counseling. Am. J. obtet. gynecol: 118: 322-326, 1974.
90. PRADER, A. Disorders of sexual differentiation (Intersexuality). In: LABHART, A. Clinical endocrinology, New York, Springer-Verlag, 1974. cap. 12. p. 708-737.
91. QUACK, B. & NOEL, B. The XY chromosome pair in mouse and human spermatocytes, visualised by silver staining. Nature 267: 431-433, 1977.
92. QUINET, A.D. Amenorréia. In: QUINET, A.A. & RODRIGUES, J. Endocrinologia ginecológica. Rio de Janeiro, Pesquisa, 1973. cap. 11. p. 143-168.
93. RAO, M.M. & RAO, D.M. Cytogenetic studies in primary infertility. Fertil and Steril 28(2): 209-210.

94. RIOS, R.I. Genética molecular. In: MOTTA, P.A. Genética médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. cap. 2. p. 17-55.
95. ROCHA, H. & MIRANDA, M. Mecanismos genéticos moleculares da morfogênese e diferenciação. In: MOTTA, P.A. Genética médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. cap. 3. p. 56-86
96. SALISBURY, G.W.; HART, R.G.; LODGE, J.R. The spermatozoan genome and fertility. Am. J. Obstet. Gynecol. 128(3):342-350, 1977.
97. SCHELLHAS, H.F.; TRUJILLO, J.M.; RUTLEDGE, F.N.; CORK, A. Germ cell tumors associated with XY gonadal dysgenesis. Am. J. Obstet. Gynecol. 109(8): 1197-1203, 1971.
98. SCHMIDT, M.E.; MILLER, W.V.; PEENEN, M.J.V.; LUCAS, F.V. Changes in sex chromatin pattern during the menstrual cycle. Am. J. Obstet. Gynecol. 94(3): 422-424, 1966.
99. SCHMIDT, R.; NITOWSKY, H.M.; DAR, H. Cytogenetic studies in reproductive loss. JAMA 236(4): 369-373, 1976.
100. SCULLY, R.E. Gonadoglastoma—a review of 74 cases. Cancer 25(6): 1340-1356, 1970.
101. SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2: 971-972, 1971.
102. SHAPIRO, L.R.; GRAVES, Z.R.; HIRSCHHORN, K. Oral contraceptive and in vivo cytogenetic studies. Obstet. Gynecol. 39: 190-192, 1972.
103. SIMPSON, J.L. Diagnosis and management of the infant with genital ambiguity. Am. J. Obstet. Gynecol. 128(2): 137 - 145, 1977.
104. SIMPSON, J.L. Gonadal dysgenesis abnormalities of the human sex chromosomes: current status of phenotypic-karyotypic correlation. Birth Defects: Orig. Art. Ser. 11(4): 23-57, 1975.
105. SIMPSON, J.L. & MARTIN, A.O. Cytogenetic nomenclature. Am. J. Obstet. Gynecol. 128(2): 167-172, 1977.
106. SMITH, D.W. Recognizable patterns of human malformation. Philadelphia, Saunders, 1976. 504 p.

107. SPARKES, R.S. & MOTULSKY, A. The Turner syndrome with isochromosome X and Hashimoto's thyroiditis. Am. Int. Med. 67(1): 132-144, 1967.
108. SPEROFF, L.; GLASS, R.H.; KASE, N.G. Amenorrhea. In: -. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Baltimore. Williams & Wilkins, 1973. cap. 6. p. 71-111.
109. STENCHEVER, M.; PARKS, K.; DAINES, T.; ALLEN, M.A.; STENCHEVER, M.R. Cytogenetics of habitual abortion and other reproductive wastage. Am. J. Obstet. Gynecol. 127(2): 143-150, 1977.
110. SUMMER, A.T.; EVANS, H.J.; BUCKLAND, R. New techniques for distinguishing between human chromosomes. Nature (New Biol.) 232: 31-32, 1971.
111. TAYLOR, J.H. Asynchronous duplication of chromosomes in cultured red cells of chinese hamster. J. Biophys. Biochem. Cytol 7: 455-464, 1960.
112. TEPLITZ, R.L. Laboratory contributions to human cytogenetics. JAMA 236(4): 376-378, 1976.
113. THERMAN, E. & SARTO, G.E. Large translocation t(3q-;4p+) as probable cause for semisterility. Fertil. and Steril. 27(7): 784-788, 1976.
114. THERMAN, E.; SARTO, G.E.; PATAU, K. Center for Barr body condensation on the proximal part of the human Xq: a hypothesis. Chromosoma (Berl.) 44: 361-366, 1974.
115. TITUS, J.C. & PIERRE, R.V. Análise cromossômica em medicina clínica. In: KIELY, J.M. Clínica médica da América do Norte. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, jul. 1970, p. 1003-1021.
116. TOWNSEND, J.F.; CASE, M.S.; LUCAS, F.V. The sex chromatin count in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 108(4): 585-587, 1970.
117. VENTRUTO, V.; CALI, A.; FARINA, L.; BIAGIO, B.; RICCIARDI, I.; SEBASTIO, I. A case of hypogonadotropic hypogonadism with anosmias. (Kallman's Syndrome) in a male, with familial incidence of a small metacentric chromosome (47,XY,mat?). J. Med. Genet. 13(1): 71-75, 1976.

118. VILLEE, D. Ambiguous genitalia in the newborn: abnormalities of sexual differentiation. In. - Human endocrinology. Philadelphia, 1975. cap. 8. p. 175-192.
119. WATSON, J.D. & CRICK, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171: 737-738, 1953.
120. WILLIAMS, J.D.; SUMMITT, R.L.; CAMACHO, A.M. Hypothyroidism in children with the Down syndrome: Report of three cases. - Birth Defects. Orig. Art. Ser. 7(6): 43-47, 1971.
121. WREN, P.J.; EVANS, D.A.P.; VETTERS, J.M.; CHEW, A. Autoimmune antibodies in mongol families. Lancet 2: 186-188, 1967.
122. ZECH, L. Investigation of metaphase chromosomes with DNA - Binding fluorochromes. Exp. Cell. Res. 58: 463, 1969.

**TCC
UFSC
TO
0058**

Ex.1

N.Cham. TCC UFSC TO 0058

Autor: Pereira, Eliana Te

Título: Novas Técnicas Citogenéticas de



972815984

Ac. 254203

Ex.1 UFSC BSCCSM