



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Rita Machado Simões

**A CITOGENÉTICA NO DIAGNÓSTICO PÓS-  
NATAL DA ETIOLOGIA DAS  
PERTURBAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO DA  
CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

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

Setembro de 2023





Rita Machado Simões

**A CITOGENÉTICA NO DIAGNÓSTICO PÓS-  
NATAL DA ETIOLOGIA DAS  
PERTURBAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO DA  
CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

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

Setembro de 2023



## **Agradecimentos**

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste estágio, o meu sincero agradecimento.

À Professora Doutora Eunice Maria Ruas de Campos Matoso, minha orientadora, um agradecimento especial pela oportunidade de integrar a equipa do Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico de Coimbra, por todos os ensinamentos e orientação ao longo do estágio. Agradeço o incentivo, apoio, atenção e tempo dedicados a mim e ao meu trabalho e por todos os conselhos dados, que contribuíram para a minha formação.

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, minha orientadora, agradeço todo o conhecimento transmitido ao longo destes últimos dois anos, assim como a partilha de experiências.

À Dra. Alexandra Estevinho, um agradecimento especial pela disponibilidade, companhia e apoio incansável prestados no Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico de Coimbra.

A todos os meus colegas de mestrado, em especial à Margarida Serrano e à Ana Luísa Fontes, quero agradecer pela companhia e bons momentos passados.

Um agradecimento final à minha família, em especial os meus pais, que tornaram possível a realização do mestrado noutra cidade e sempre me apoiaram no meu percurso académico e à minha irmã, que sempre se mostrou disponível para me ajudar, ao longo desta etapa.



# Índice

Índice de figuras, tabelas e gráficos.....	IX
Lista de abreviaturas .....	XI
Resumo .....	XIII
Abstract.....	XV
Capítulo I – Introdução.....	1
1.1 Enquadramento do estágio curricular .....	3
1.2 Objetivos .....	3
1.3 A Citogenética Clássica e a Citogenética Molecular no Diagnóstico Pós-natal	4
1.3.1 Citogenética convencional – perspetiva histórica .....	4
1.3.2 Citogenética molecular – FISH .....	8
1.3.3 Outras metodologias no diagnóstico.....	9
1.4 Anomalias cromossómicas.....	11
1.4.1 Alterações Cromossómicas Numéricas .....	11
1.4.2 Alterações Cromossómicas Estruturais .....	16
1.5 <i>Guidelines</i> europeias para análise citogenética em diagnóstico pós-natal.....	24
Capítulo II – Patologias do desenvolvimento da criança e do adolescente .....	25
2.1 Perturbações do crescimento.....	27
2.1.1 Baixa estatura .....	27
2.1.2 Crescimento excessivo .....	28
2.2 Ambiguidade genital.....	29
2.3 Mosaicismo .....	30
2.4 Síndromes de instabilidade cromossómica .....	31
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	35
3.1 Grupo de estudo .....	37
3.2 Citogenética Convencional .....	37
3.2.1 Colheita e identificação de amostras .....	37
3.2.2 Estabelecimento de culturas .....	37
3.2.3 Sincronização do ciclo celular.....	37
3.2.4 Manipulação .....	38
3.2.5 Fixação.....	38

3.2.6	Espalhamento (preparação das lâminas histológicas) .....	38
3.2.7	Bandagem .....	39
3.2.8	Análise cromossômica ao microscópio ótico .....	41
3.3	<i>Fluorescence in situ hybridization (FISH)</i> .....	42
Capítulo IV – Resultados e Discussão.....		43
4.1	Caso Clínico 1.....	46
4.2	Caso Clínico 2.....	49
4.3	Caso Clínico 3.....	51
4.4	Caso Clínico 4.....	54
4.5	Caso Clínico 5.....	56
4.6	Caso Clínico 6.....	58
4.7	Caso Clínico 7.....	60
4.8	Caso Clínico 8.....	62
Capítulo V – Considerações finais .....		67
Capítulo VI – Referências .....		71

## Índice de figuras, tabelas e gráficos

**Figura 1** – Ideograma do cromossoma 1 em cinco resoluções diferentes, de acordo com a bandagem G.

**Figura 2** – Ilustração das possíveis segregações de cromossomas envolvidos numa translocação, durante a meiose.

**Figura 3** – Esquema representativo do emparelhamento, recombinação e segregação dos cromossomas na meiose, quando um dos cromossomas apresenta uma **A** – inversão pericêntrica; quando apresenta uma **B** – inversão paracêntrica.

**Figura 4** – Metafase obtida após cultura sincronizada de linfócitos de sangue periférico, com bandagem CBG, de um indivíduo do sexo masculino com o complemento 46,XY.

**Figura 5** – Cariograma representativo de um cariótipo, sem alterações, de uma a) mulher (46,XX) e de um b) homem (46,XY), usando a bandagem GTL.

**Figura 6** – Cariograma com bandas GTL, representativo do caso clínico 1 (46,XX).

**Figura 7** – Representação gráfica da região de hibridização da sonda *UBE3A/D15S10*, que engloba grande parte do gene *UBE3A*, e da sonda controlo 15qter (CytoCell®).

**Figura 8** – Metafase, do caso clínico 1, observada ao microscópio de fluorescência, após análise por FISH.

**Figura 9** – Cariogramas, com bandas GTL, representativos das duas linhas celulares. **A** – Linha celular com o cariótipo 47,XXX, identificado em 26 metafases. **B** – Linha celular com o cariótipo 45,X, identificado em quatro metafases.

**Figura 10** – Metafases, com bandas GTL, observadas ao microscópio ótico, onde é possível distinguir configurações de múltiplos braços longos **A** – do cromossoma 1 e **B** – do cromossoma 16.

**Figura 11** – Cariograma, com bandas GTL, representativo do caso clínico 4, com a presença de um cromossoma X extra, correspondente ao cariótipo 47,XXY.

**Figura 12** – Cariograma, com bandas GTL, representativo do caso clínico 5.

**Figura 13** – Cariograma, com bandas GTL, representativo do caso clínico 6, com o cariótipo 47,XX,+psu idic(15)(pter-q12::q12-pter).

**Figura 14** – Representação gráfica da estrutura dos cromossomas 15, provenientes dos progenitores, e do marcador isodicêntrico do cromossoma 15, de origem materna.

**Figura 15** – Cariograma, com bandas GTL, representativo do caso clínico 7, com o cariótipo 46,X,i(X)(q10).

**Figura 16** – Cariogramas, com bandas GTL, representativos das duas linhas celulares encontradas na análise de metafases. **A** – Linha celular com o cromossoma Y de estrutura ambígua, identificado em 46 metafases. **B** – Linha celular com o cariótipo 45,X, identificado em 12 metafases.

**Figura 17** – Metafase representativa de uma das linhas celulares, do caso clínico 8, com coloração CBG, onde se destaca o cromossoma Y com dois centrómeros e sem região Yqh (seta vermelha).

**Figura 18** – Representação gráfica da região de hibridização da sonda LSP *SRY*, que engloba o gene *SRY*, e da sonda controlo CCPX, da CytoTest®.

**Figura 19** – Metafase da linha celular com o cromossoma idic(Y), observada ao microscópio de fluorescência, após análise por FISH do caso clínico 8.

**Figura 20** – Metafase da linha celular 45,X, após análise por FISH, do caso clínico 8.

**Tabela 1** – Resumo dos casos analisados, com a respetiva indicação clínica e seus resultados.

**Gráfico 1** – Distribuição das idades dos utentes analisados, por faixa etária, em percentagem.

## **Lista de abreviaturas**

**a-CGH** – *Microarray-based Comparative Genomic Hybridization*

**ADPM** – Atraso do desenvolvimento psicomotor

**A-T** – *Ataxia Telangiectasia*

**ATM** – *Ataxia-Telangiectasia Mutated*

**BAC** – *Bacterial Artificial Chromosome*

**BS** – *Bloom Syndrome*

**CGD** – *Constitutional Growth Disorder*

**CHUC** – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

**CNV** – *Copy Number Variation*

**DNA** – *Deoxyribonucleic acid*

**DPN** – Diagnóstico pré-natal

**DSBs** – *Double-Strand DNA Breaks*

**FA** – *Fanconi Anemia*

**FISH** – *Fluorescence in Situ Hybridization*

**FSS** – *Familiar Short Stature*

**GHD** – *Growth Hormone Disorder*

**HR** – *Heterochromatin Repulsion*

**ICF** – *Immunodeficiency, Centromeric region instability, Facial anomalies syndrome*

**ISCN** – *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

**LCG-FMUC** – Laboratório de Citogenética e Genómica, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Coimbra.

**Mb** – Megabase

**MLPA** – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

**MS-MLPA** – *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

**NAHR** – *Non-allelic homologous recombination*

**NBS** – *Nijmegen Breakage Syndrome*

**NGS** – *Next Generation Sequencing*

**NOR** – *Nucleolus Organizer Region*

**PAC** – *P1 Artificial Chromosome*

**PCD** – *Premature Centromere Division*

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**Rpm** – Rotações por minuto

**rRNA** – *Ribosomal ribonucleic acid*

**SCEs** – *Sister chromatid exchange*

**SHOX** – *short-stature homebox*

**SRY** – *Sex-Determining Region Y*

**WES** – *Whole Exome Sequencing*

**WGS** – *Whole Genome Sequencing*

## Resumo

Em 1900, Sutton desenvolveu a teoria cromossómica da hereditariedade, combinando as componentes de citologia e genética, numa disciplina que denominou de citogenética. Tjio e Levan otimizaram as técnicas de cultura e manipulação celular, publicando em 1956, o número correto de 46 cromossomas do complemento humano.

Com os avanços nas metodologias, em particular das técnicas de bandagem, foi possível a identificação de regiões cromossómicas, bandas e sub-bandas, o que contribuiu para uma melhor caracterização da estrutura e morfologia dos cromossomas. Estes avanços, conseqüentemente, permitiram a deteção de alterações genéticas causais para certas patologias, dentro do limite de resolução de 3-5Mb.

A citogenética molecular, com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), capaz de identificar alterações submicroscópicas, veio colmatar algumas das limitações da citogenética convencional, aumentando em 10% a taxa de deteção de anomalias cromossómicas.

As alterações cromossómicas podem ser divididas em dois grandes grupos, numéricas e estruturais, podendo envolver tanto os autossomas, como os cromossomas sexuais. Se a alteração se der no evento meiótico, a anomalia considera-se constitucional, estando presente em todas as células do indivíduo, enquanto se surgir num evento pós-zigótico, a anomalia dá origem a um mosaico constitucional.

O teste citogenético a crianças e adolescentes é requerido consoante manifestações clínicas, que induzam suspeita de doença cromossómica, assim como amenorreia primária/secundária, perturbações no crescimento (baixa estatura, crescimento excessivo), ambiguidade sexual, fenótipo anormal ou dismorfismos, anomalias congénitas, atraso do desenvolvimento ou défice intelectual, suspeita de síndrome de deleção/ duplicação ou características clínicas indicativas de síndrome associada a alteração cromossómica.

Das análises citogenéticas realizadas no Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico de Coimbra, no ano letivo 2022/2023, foram selecionados oito casos clínicos, com alterações cromossómicas representativas do grupo em estudo.

Apesar de, atualmente, outras metodologias mais automatizadas e com maior poder de resolução estarem implementadas no diagnóstico, a citogenética convencional continua a

ser um teste de diagnóstico fundamental, não só no diagnóstico pré-natal, como no diagnóstico pós-natal.

**Palavras-chave:** citogenética, diagnóstico pós-natal, cromossomopatias, alterações cromossômicas, cariótipo

## Abstract

In 1900, Sutton developed the chromosomal theory of inheritance, combining the components of cytology and genetics, in a discipline he named cytogenetics. Tjio and Levan optimized cell culture and cell manipulation techniques, publishing in 1956 the correct number of 46 chromosomes of the human complement.

With advances in methodologies, in particular banding techniques, it was possible to identify chromosomal regions, bands and sub-bands, which contributed to a better characterization of the structure and morphology of chromosomes. These advances, consequently, allowed the detection of causal genetic variants for certain pathologies, within the resolution limit of 3-5Mb.

Molecular cytogenetics, with fluorescent *in situ* hybridization (FISH), capable of identifying submicroscopic changes, has overcome some of the limitations of conventional cytogenetics, increasing by 10% the detection rate of chromosomal abnormalities.

Chromosomal abnormalities can be divided into two major groups, numerical and structural, and may involve both autosomes and sex chromosomes. If the change occurs in the meiotic event, the anomaly is considered constitutional, being present in all the cells of the individual, while if it arises in a post-zygotic event, the anomaly originates a constitutional mosaic.

Cytogenetic testing of children and adolescents is requested depending on clinical manifestations that induce suspicion of chromosomal disease, such as primary/secondary amenorrhea, growth disorders (short stature, excessive growth), sexual ambiguity, abnormal phenotype or dysmorphisms, congenital anomalies, developmental delay or intellectual deficit, suspected deletion/duplication syndrome, or clinical features indicative of syndromes associated with chromosomal abnormalities.

From the cytogenetic analysis carried out at the Cytogenetics Laboratory of the Pediatric Hospital of Coimbra, in the academic year 2022/2023, eight clinical cases, with chromosome abnormalities representative of the study group, were selected.

Although other methodologies, more automated and with greater power of resolution, are implemented in the diagnosis, conventional cytogenetics continues to be a fundamental diagnostic test, not only in the prenatal diagnosis, but also in the postnatal diagnosis.

**Keywords:** cytogenetics, postnatal diagnosis, chromosomal disorders, chromosome abnormalities, karyotype.

## **Capítulo I – Introdução**



## 1.1 Enquadramento do estágio curricular

No ano letivo de 2022/2023, foi realizado o estágio curricular inserido no Mestrado em Genética Clínica Laboratorial, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, integrado na equipa do Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico de Coimbra. Este laboratório está sob responsabilidade da Professora Doutora Eunice Matoso e é parte integrante do Serviço de Genética Médica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Neste laboratório são realizadas todas as análises de citogenética convencional em contexto pós-natal, a partir de sangue periférico, requisitadas pelas diversas consultas da instituição. Durante o ano letivo, de setembro a maio, foram acompanhadas as metodologias realizadas, desde a citogenética clássica à citogenética molecular (FISH).

## 1.2 Objetivos

A integração na equipa do Laboratório de Citogenética permitiu o acompanhamento de todos os procedimentos laboratoriais, desde a receção de amostras, análise e interpretação dos resultados à elaboração do relatório final. Estabeleceram-se como principais objetivos:

- Após observação, integrar progressivamente a prática laboratorial, seguindo os protocolos estabelecidos;
- Realizar todas as etapas experimentais, sob supervisão técnica, cumprindo as boas normas da qualidade;
- Realizar a análise dos resultados e a sua interpretação;
- Interpretar os resultados obtidos, correlacionando com a indicação clínica dos utentes;
- Adquirir competências básicas na elaboração do relatório final, respeitando as regras do “*International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN([2020](#)))”.
- Elaborar um relatório de estágio final, englobando o trabalho realizado, desde os conceitos teóricos à exemplificação e discussão de casos clínicos no âmbito da “Etiologia Das Perturbações Do Desenvolvimento Da Criança e Do Adolescente”.

## 1.3 A Citogenética Clássica e a Citogenética Molecular no Diagnóstico Pós-natal

### 1.3.1 Citogenética convencional – perspectiva histórica

Originado a partir do grego “corpo corado”, o termo cromossoma foi introduzido, em 1888, por Waldeyer, após as primeiras ilustrações de cromossomas humanos, publicadas pelo citologista e professor Walther Flemming. Em 1900, Sutton desenvolveu a teoria cromossômica da hereditariedade, combinando as componentes de citologia e genética, numa disciplina que denominou de citogenética. A genética médica surgiu com as primeiras associações de doenças a traços mendelianos, em 1902 ([Ferguson-Smith 2008](#)). O primeiro objetivo dos citogeneticistas, passou por identificar corretamente o complemento cromossômico humano. Através do estudo de cromossomas meióticos, Painter reportou, repetidamente, a existência de 48 cromossomas humanos (o dobro dos cromossomas que observava nos gametas), apesar de outros estudos discordantes. Esta observação foi assumida como “confirmada”, nas décadas que se seguiram, pela comunidade científica. Painter propôs ainda na década de 1920, que seriam os cromossomas X e Y, os responsáveis pela determinação do sexo biológico no ser humano ([Painter 1923](#), [Steven L. Gersen 2013](#), [Ferguson-Smith 2015](#)).

Apesar de todos os avanços nas técnicas e na instrumentação, a dificuldade em visualizar e identificar os cromossomas no núcleo persistia. Um erro no procedimento laboratorial proporcionou um grande ponto de viragem na citogenética. Hsu reportou, numa adenda ao seu artigo, que as culturas celulares foram submetidas a uma solução hipotónica, em vez da solução salina isotónica, como estava estabelecido no protocolo ([HSU 1952](#)). Este erro permitiu a observação de metafases com boa dispersão, resultado da entrada da água por osmose, deixando-as num estado túrgido e permitindo a contagem correta do número de cromossomas do complemento humano de 46. A introdução da colchicina, bloqueando o ciclo celular em metafase, permitiu adicionalmente melhorar o índice mitótico e o número de células em metafase ([Steven L. Gersen 2013](#)).

Tjio e Levan otimizaram as técnicas de cultura e manipulação celular publicando, em 1956, que o número correto do complemento cromossômico humano é 46, contrariamente ao consenso que havia na comunidade, há 3 décadas ([TJIO and LEVAN 1956](#)).

Por esta altura era já do conhecimento da comunidade científica que algumas síndromes estariam associadas a anomalias cromossómicas. A análise de pacientes com síndrome de Down, conduzida por Martha Gautier e Turpin, detetou a presença de um cromossoma 21 extra, indicando a existência de trissomia 21 ([Lejeune 1959](#), [Polani 1997](#)). Seguiu-se a descrição e publicação de outras aneuploidias, nomeadamente envolvendo os cromossomas sexuais, responsáveis por síndromes como a Síndrome de Turner, em mulheres com a monossomia do cromossoma X (45,X) e a Síndrome de Klinefelter, em homens, com a presença de um cromossoma X extra (47,XXY). Ambas as descobertas permitiram concluir que a função de determinação do sexo estava atribuída ao cromossoma Y. Estas observações foram possíveis devido a um fenómeno descrito há uma década: os corpúsculos de Barr ([Polani 1997](#), [Steven L. Gersen 2013](#)). Enquanto estudava células de gato, Murray Barr observou um pequeno corpúsculo corado, nos núcleos em interfase. Após constatar que era um fenómeno exclusivo às células femininas, chegou à conclusão de que esse corpúsculo existia devido à inativação de um dos cromossomas X ([Barr and Bertram 1949](#)). Em 1961, Lyon sugeriu a hipótese do mecanismo de inativação e dosagem do cromossoma X, em mamíferos ([Lyon 2003](#)).

A primeira associação dos cromossomas ao cancro foi feita por Nowell e Hungerford, em 1960, quando reportaram a existência de um cromossoma de tamanho estranhamente pequeno, em pacientes com leucemia mieloide crónica ([Nowell 1962](#)). O cromossoma Filadélfia, como se viria a designar, correspondia a um derivativo da translocação recíproca que envolvia os braços longos dos cromossomos 9 e 22, resultando no gene de fusão *BCR-ABL* expresso, nas células malignas ([Koretzky 2007](#)).

Com os avanços nas metodologias, em particular das técnicas de bandagem, foi possível a identificação de regiões cromossómicas, bandas e sub-bandas, o que contribuiu para uma melhor caracterização da estrutura e morfologia dos cromossomas ([Steven L. Gersen 2013](#)). Estes avanços foram acompanhados com a introdução de um sistema de nomenclatura internacional, com a primeira publicação em 1960, que incluía as principais decisões tomadas em conferências da comunidade científica da área da citogenética humana ([1960](#)).

O genoma humano, totalizando dois metros de DNA, está organizado em 46 cromossomas (23 pares de homólogos), sendo 44 deles autossomas, e um par de

cromossomas sexuais denominados de X e Y. Na gametogénese ocorre a meiose, originando células haploides, com 23 cromossomas (n) ([Izatt 2012](#), [Gardner and Amor 2018](#)). Os cromossomas distinguem-se pelo seu tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas. Estão distribuídos por 7 grupos de A a G, os autossomas denominados do par 1 ao 22, os gonadossomas X e o Y.

A imagem do complemento cromossómico organizado denomina-se cariógrama. A escrita pela nomenclatura do complemento denomina-se cariótipo ([ISCN 2020](#)).

A cromatina pode ser classificada em eucromatina (cromatina não condensada) e heterocromatina (cromatina condensada). A eucromatina é composta por genes ativamente transcritos, apresentando uma coloração clara na bandagem G. A heterocromatina pode ser constitutiva ou facultativa. A heterocromatina constitutiva é repetitiva e não codificante, podendo variar a sua extensão, estando presente nas regiões dos braços longos dos cromossomas 1q, 9q, 16q e Yq. A heterocromatina facultativa corresponde à inativação aleatória de um dos cromossomas X das mulheres, pelo que se pensa ter a função de regulação génica ([Steven L. Gersen 2013](#)).

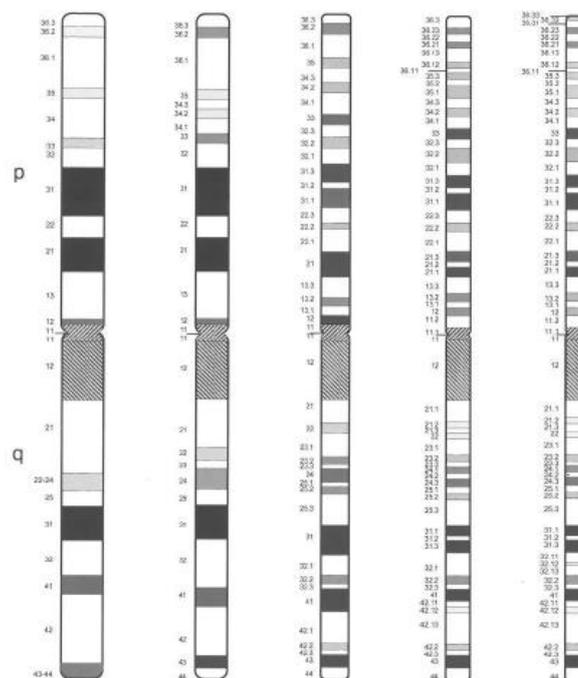
Os cromossomas subdividem-se em dois segmentos, pelo seu centrómero ou constrição primária: um denominado de “p”, que geralmente corresponde ao braço curto, quando o cromossoma é submetacêntrico e outro denominado de “q” que geralmente corresponde ao braço longo. É ao centrómero e ao seu cinetocoro que se ligam os microtúbulos do fuso acromático, responsáveis pela segregação dos cromossomas homólogos na anafase I e das cromátides irmãs na anafase II da meiose, assim como na anafase da mitose. De acordo com a posição do centrómero, os cromossomas são denominados de “metacêntricos”, “submetacêntricos” e “acrocêntricos” ([Steven L. Gersen 2013](#), [Jackson, Marks et al. 2018](#)).

Nas extremidades, de ambos os braços, encontram-se as regiões denominadas de telómeros, constituídos por repetições da sequência “TTAGGG”, que se formam devido à atividade enzimática da proteína telomerase. Esta região repetitiva está presente em várias espécies, sugerindo conservação evolutiva e funcional. Os telómeros dão estabilidade à cromatina, impedindo a fusão entre telómeros, protegendo os cromossomas no final da replicação. Erros genéticos e epigenéticos na telomerase, ou em proteínas associadas aos telómeros, podem levar a alterações nas dimensões, danos e/ou fusão dos telómeros, assim como instabilidade genómica ([Lu, Zhang et al. 2013](#)).

As regiões organizadoras do nucléolo (NOR) estão localizadas nos satélites dos cromossomas acrocêntricos. Estas regiões, compostas por genes que codificam para o rRNA, são também responsáveis pela formação do nucléolo em células em interfase ([Steven L. Gersen 2013](#)).

O cariograma é constituído pelos 23 pares de cromossomas, ordenados de 1 a 22, seguidos dos cromossomas sexuais, todos com os braços curtos orientados para cima.

A representação do padrão de bandas característico de cada par cromossómico para um determinado nível de resolução é designada por ideograma, representado na Figura 1 ([ISCN 2020](#)).



**Figura 1** – Ideograma do cromossoma 1 em cinco resoluções diferentes, de acordo com a bandagem G. Da esquerda para a direita encontram-se as resoluções de 300, 400, 550, 700 e 850 bandas. Adaptado do [ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature \(2020\)](#), S.Karger AG.

O padrão de bandas é construído a partir de uma sequência alternada, com diferente coloração, intensidade variável, criando uma combinação única para cada par de homólogos. Num cromossoma podem identificar-se regiões, bandas e sub-bandas. Na descrição do cariótipo, o geneticista clínico laboratorial deverá sempre indicar o complemento cromossómico, incluindo os cromossomas sexuais e se o indivíduo

apresenta alguma anomalia genética, seguindo as regras sugeridas pelo ISCN ([ISCN 2020](#)).

A citogenética apresenta, como qualquer metodologia, limitações nomeadamente ao nível da resolução, que pode atingir o limiar das 3-5 Mb, dependendo, no entanto, da(s) região(ões) do rearranjo envolvido. A interpretação do padrão de bandas, a qualidade das metafases, assim como o tecido utilizado, são condicionantes decisivas e requerem um profissional especializado e com anos de formação ([Gozzetti and Le Beau 2000](#), [Kearney 2001](#), [de Ravel, Devriendt et al. 2007](#)). Esta metodologia continua a ser fundamental, particularmente no diagnóstico de alterações estruturais equilibradas, mosaicismo e na caracterização da origem de alterações estruturais desequilibradas ([Kearney 2001](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

### 1.3.2 Citogenética molecular – FISH

A citogenética molecular, com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), capaz de identificar alterações submicroscópicas, veio colmatar algumas das limitações da citogenética convencional, aumentando em 10% a taxa de deteção de anomalias cromossómicas ([de Ravel, Devriendt et al. 2007](#), [Steven L. Gersen 2013](#)). Para além da alta especificidade e resolução, esta técnica também tem como grande vantagem a possibilidade de análise de células em interfase ([Gozzetti and Le Beau 2000](#)).

A técnica FISH usa sondas marcadas, direta ou indiretamente por fluorescência, que hibridizam nas sequências de DNA alvo *in situ*. A marcação direta ocorre quando o fluorocromo se encontra ligado aos nucleótidos da sequência da sonda, enquanto a indireta consiste na incorporação de um hapteno, como molécula intermediária, que é revelado por imunofluorescência ([Riegel 2014](#)). Dependendo do alvo de estudo, vários tipos de sondas podem ser utilizados na técnica de FISH. As sondas centroméricas,  $\alpha$  -satélite, são usadas para estudo de aneuploidias, enquanto as sondas *chromosome painting* hibridizam com um cromossoma inteiro, sendo úteis na classificação da origem de cromossomas marcadores. Já as sondas de sequência única de DNA variam em tamanho e são úteis na deteção de alterações estruturais. Dentro destas, destacam-se as sondas subteloméricas, essenciais no estudo de rearranjos envolvendo essas regiões ([Gozzetti and Le Beau 2000](#)). As sondas são aplicadas em células em interfase ou metafase. É usada

na detecção de síndromes de microdeleção conhecidas, incluindo deleções nas regiões subteloméricas dos cromossomas ([de Ravel, Devriendt et al. 2007](#)).

Estas disciplinas, de citogenética convencional e citogenética molecular, fornecem informação essencial e muitas vezes complementar, para o diagnóstico, assim como no prognóstico e monitorização de uma grande variedade de tumores ([Gozzetti and Le Beau 2000](#), [Kannan and Zilfalil 2009](#)).

### 1.3.3 Outras metodologias no diagnóstico

Apesar da técnica FISH ter um maior poder de resolução, tem também a limitação de ser uma técnica direcionada. O nascimento da área da genómica e a evolução das técnicas de sequenciação de nova geração e da genética molecular, permitiram uma análise “*whole genome*” como a citogenética convencional, mas de muito maior resolução ([Riegel 2014](#)).

#### 1.3.3.1 *Array-CGH*

A técnica de *array-CGH* permite o estudo da variação no número de cópias do DNA, numa determinada amostra. Esta técnica baseia-se na marcação diferencial da amostra de DNA a analisar e a amostra de DNA de referência, que posteriormente irão competir pela co-hibridização com os fragmentos de DNA (BAC/PAC, ou oligonucleótidos) localizados na lâmina de array. Esta hibridização é detetada pelo uso de dois fluorocromos diferentes, que irão demonstrar uma alteração na sua intensidade de sinal, se existirem regiões com deleção ou duplicação de material genético ([Yatsenko, Shaw et al. 2009](#), [Cheung and Bi 2018](#)). O *array-CGH* apresenta uma vasta cobertura de todo o genoma, podendo os seus painéis ser direcionados a um grupo de genes. Esta análise extensiva permite a determinação precisa dos limites dos CNVs nas amostras analisadas. Apesar das vantagens, esta técnica não deteta alterações estruturais equilibradas, alterações de ploidia ou mosaicos inferiores a 10-20% ([Ballif, Rorem et al. 2006](#)). A detecção de variantes com significado clínico desconhecido, assim como as variantes provavelmente patogénicas, dificultam a interpretação de resultados, sendo necessário o recurso a bases de dados de referência, assim como VarSome, DECIPHER, Database of Genomic Variants e ClinVar ([Tzetis, Kitsiou-Tzeli et al. 2012](#)).

### 1.3.3.2 *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*

A técnica do MLPA surgiu recentemente com o objetivo de detetar duplicações/deleções de genes, assim como permitir a validação dos resultados da análise de *array*-CGH, na análise de CNVs. Esta técnica consiste num *multiplex* de PCR, com várias sondas diferentes. As sondas são compostas por duas partes, ambas compostas por uma sequência complementar à sequência de DNA alvo e uma sequência universal onde se ligam os *primers*, que permitem a amplificação da sonda. A amplificação da sonda apenas ocorre se as duas partes da sonda se ligarem, fenómeno que apenas se dá se ambas as partes hibridizarem, de forma adjacente, com a sequência de DNA alvo. Cada sonda contém ainda uma sequência *stuffer*, que varia em tamanho consoante a sequência de DNA alvo, o que vai permitir a diferenciação dos fragmentos amplificados. O processo da técnica de MLPA pode ser dividido em 5 etapas: a) desnaturação do DNA e hibridização das sondas, b) reação de ligação das duas partes da sonda, c) amplificação dos fragmentos por PCR, d) diferenciação dos fragmentos amplificados por eletroforese, e) análise de resultados. Polimorfismos que não afetam a função génica impedem a amplificação dos fragmentos correspondentes a essas regiões, pelo que as deleções detetadas deverão ser confirmadas por outras técnicas. Por ser possível fazer a análise com até 40 sondas em simultâneo a um baixo custo, esta técnica tem sido cada vez mais usada no diagnóstico de doenças genéticas ([Stuppia, Antonucci et al. 2012](#), [Fu, Shi et al. 2022](#)).

### 1.3.3.3 *Next Generation Sequencing (NGS)*

A NGS é conhecida como sequenciação massiva em paralelo, esta tecnologia de alta resolução engloba várias técnicas de sequenciação, que analisam milhões de fragmentos de sequências de DNA em simultâneo ([Muzzey, Evans et al. 2015](#)). A metodologia desta técnica consiste nos seguintes passos: extração de DNA, preparação da biblioteca, enriquecimento da biblioteca e sequenciação. Atualmente, no mercado estão disponíveis diferentes tipos de plataformas de NGS, que diferem em preço de instalação, capacidade de sequenciação, comprimento de leitura, entre outros, pelo que deve ser avaliada a necessidade de cada função, consoante o laboratório em questão e o tipo de análises de interesse. Em contexto clínico laboratorial, as técnicas de NGS permitem a deteção de variantes genéticas herdadas ou adquiridas. No caso de variantes herdadas, recorre-se a

um painel de genes específico, quando há suspeita clínica da síndrome ou fenótipo correspondente a esse painel. Por outro lado, quando não há suspeita clínica da origem da patologia ou o estudo direcionado é inconclusivo, poderão ser usadas as técnicas de “*whole genome sequencing*” (WGS), que estuda o genoma completo ou “*whole exome sequencing*” (WES), que estuda apenas o exoma, assim como sequenciação de DNA mitocondrial ([Yohe and Thyagarajan 2017](#)). É frequente na análise por WES, o estudo de tanto o probando como ambos os pais, o chamado “*trio testing*”, de forma a facilitar a interpretação dos resultados de variantes genéticas. Para além destas aplicações, as técnicas de NGS são também utilizadas para a análise de DNA *cell-free*, em testagem pré-natal, assim como na análise de DNA tumoral em circulação (biópsia líquida), que poderá permitir o diagnóstico, prognóstico e tratamento de diversos tumores ([Yohe and Thyagarajan 2017](#)). Algumas limitações impedem a técnica de NGS de ser a técnica principal no diagnóstico de doenças genéticas: o elevado custo de execução na rotina laboratorial, a dificuldade na interpretação de resultados (variantes de significado clínico desconhecido, novas ou raras), a dificuldade na sequenciação de regiões repetitivas, zonas ricas em guanina e citosina e regiões homólogas e, finalmente, a dificuldade em detetar alterações cromossómicas estruturais e variação no número de cópias ([Yohe and Thyagarajan 2017](#), [Yin, Butler et al. 2021](#)).

## **1.4 Anomalias cromossómicas**

As alterações cromossómicas podem ser divididas em dois grandes grupos, numéricas e estruturais, podendo envolver tanto os autossomas, como os cromossomas sexuais. Se a alteração se der no evento meiótico, a anomalia considera-se constitucional, estando presente em todas as células do indivíduo, enquanto se surgir num evento pós zigótico, a anomalia dá origem a um mosaico constitucional ([Gardner and Amor 2018](#)).

### **1.4.1 Alterações Cromossómicas Numéricas**

Quando o número de cromossomas é diferente de  $2n= 46$ , estamos na presença de uma alteração cromossómica numérica. As alterações numéricas surgem a partir de um erro de não-disjunção, quer na meiose I, como na meiose II. Estas alterações são denominadas de aneuploidias, quando envolvem uma variação no número de cópias de um determinado

cromossoma, quer pela presença de uma ou mais cópias extra ou pela ausência de uma cópia, dividindo-se em aneuploidias autossômicas e aneuploidias sexuais. Já as euploidias são caracterizadas por múltiplos exatos do complemento cromossômico normal, no caso da triploidia (3n) e da tetraploidia (4n). Apenas as aneuploidias dos cromossomas sexuais, as aneuploidias autossômicas, nomeadamente as trissomias 13, 18 e 21 são viáveis. Por esta razão, as restantes aneuploidias e euploidias são apenas detetáveis em técnicas de diagnóstico pré-natal ([Steven L. Gersen 2013](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

#### **1.4.1.1 Aneuploidias autossômicas**

##### **i) Trissomia 21 [47,+21]**

A trissomia 21, ou síndrome de Down, é a anomalia cromossômica mais comum, com uma incidência de 1 em cada 700 nascimentos, em que a idade materna avançada é um fator de risco. O fenótipo apresentado é caracterizado por défice intelectual, hipotonia muscular, dismorfismo facial característico, assim como defeitos em diversos sistemas de órgãos (ORPHA:870) ([Gardner and Amor 2018](#)). É o estado trissômico autossômico com maior esperança de vida, que poderá ser explicado pela quantidade reduzida de genes no cromossoma 21. Esta síndrome pode ter diversas formas citogenéticas, desde a forma mais comum 47,+21, mosaicos, assim como 47,+21/46,N ou 45,-21/46,N/47,+21, isocromossoma 21, 46,i(21q), translocação roberstoniana, em que num terço dos casos a alteração é familiar, e translocações recíprocas, em que é fecundada a configuração desequilibrada (apesar de ser um dos tipos mais raros de síndrome de Down) ([Gardner and Amor 2018](#)).

##### **ii) Trissomia 13 [47,+13] e trissomia 18 [47,+18]**

A trissomia 13, também conhecida como síndrome de Patau, apresenta uma incidência de 1 em 12,000 nascimentos, sendo a idade materna um fator importante no risco associado. É caracterizada por um fenótipo grave de malformações cerebrais, dismorfismos faciais, anomalias oculares, malformações viscerais, polidactilia pós axial e atraso psicomotor severo (ORPHA:3378) ([Steven L. Gersen 2013](#), [Gardner and Amor 2018](#)). Já a trissomia 18, ou Síndrome de Edwards, apresenta uma incidência de 1 em 6,000 nascimentos, com

maior frequência em mulheres, em que a idade materna avançada também aumenta o risco de incidência. O quadro clínico apresentado inclui atraso no crescimento, dolicocefalia, anomalias nos membros e malformações viscerais (ORPHA:3378) ([Steven L. Gersen 2013](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

Em ambas as trissomias, a esperança de vida destas crianças é reduzida, com poucas a passar o primeiro ano de vida. Foram reportados casos de mosaïcismo em ambas as síndromes, com fenótipos de severidade variável, tendo sido identificados casos de mulheres com trissomia 18 com longevidade prolongada ([Steven L. Gersen 2013](#)).

#### **1.4.1.2 Aneuploidias sexuais**

##### **i) Síndrome de Turner**

A síndrome de Turner é uma doença caracterizada por baixa estatura, puberdade tardia, infertilidade e falência ovárica prematura, podendo afetar muitos outros sistemas ([Gravholt, Viuff et al. 2019](#)). Esta síndrome é causada pela ausência parcial ou total de um cromossoma X e afeta cerca de 1 em cada 2000 mulheres ([Ranke and Saenger 2001](#), [Gravholt, Viuff et al. 2019](#)). Em cerca de 50% dos casos, a mulher apresenta um cariótipo com perda completa de um cromossoma X, ou seja um cariótipo de 45,X, enquanto nos casos restantes estão incluídos mosaicos (45,X/46,XX, por exemplo), a presença de um isocromossoma do braço curto ou do braço longo, um cromossoma X em anel ou ainda a presença de material do cromossoma Y (mulheres 45X/46,XY, por exemplo) ([Gravholt, Viuff et al. 2019](#)).

Desde que surgiu o diagnóstico pré-natal, vários países na Europa registaram a interrupção da gravidez medicamente assistida em 76-84% dos casos de síndrome de Turner detetados, o que levanta algumas questões de ética, visto que o fenótipo desta síndrome pode ser considerado ligeiro, quando não está associado a malformações graves ([Gravholt, Viuff et al. 2019](#)).

Numa primeira análise, a ausência de um cromossoma X, nas mulheres, não deveria causar nenhum impacto no fenótipo, devido à inativação do cromossoma X, que ocorre em todas as células. No entanto, alguns genes desse cromossoma escapam a essa inativação, como é o caso do gene *SHOX* (*short-stature homeobox*), localizado na região

Xp22.2, que poderá explicar a baixa estatura, que mulheres com a síndrome de Turner apresentam ([Ranke and Saenger 2001](#), [Morgan 2007](#)).

Meninas com baixa estatura podem ser referenciadas para estudo do cariótipo, por suspeita de síndrome de Turner, já que outras características fenotípicas podem ser muito subtis ([Morgan 2007](#)).

## ii) Síndrome de Klinefelter

A síndrome de Klinefelter, considerada a principal causa genética de infertilidade masculina, é o distúrbio associado aos cromossomas sexuais mais comum nos homens, responsável por um quadro clínico, que vai desde gónadas muito pequenas e firmes, a ginecomastia e alta estatura (com pernas longas e tronco curto) ([Lanfranco, Kamischke et al. 2004](#), [Kanakis and Nieschlag 2018](#)). Esta doença é caracterizada pela presença de uma cópia extra do cromossoma X, formando o complemento de 47,XXY, o cariótipo mais comum (80-90% dos casos), assim como, em caso de mosaicismo, o cariótipo 46,XY/47,XXY (entre outros mosaicos). Pode ainda haver a presença de um cromossoma X anormal (com duplicação de informação genética) ([Kanakis and Nieschlag 2018](#)).

Nas células de um indivíduo com a síndrome, um dos cromossomas X é inativado, como acontece com as células de mulheres saudáveis, como provado pela observação de um corpúsculo de Barr, em células 47,XXY ([Bonomi, Rochira et al. 2017](#)). Porém, pensa-se que as consequências de uma cópia extra do cromossoma X possam estar ligadas aos genes que escapam a essa inativação do cromossoma X, como é o caso o gene *SHOX*, já referido na síndrome de Turner. Neste caso, ter três cópias ativas deste gene, resulta na alta estatura apresentada pelos indivíduos ([Bonomi, Rochira et al. 2017](#), [Kanakis and Nieschlag 2018](#)).

Apenas 10% dos casos são obtidos por diagnóstico pré-natal, sendo que indicações clínicas como atraso no desenvolvimento, problemas de comportamento, puberdade tardia, ginecomastia, hipogonadismo ou infertilidade, levantam a necessidade de análise cromossómica, por suspeita do síndrome de Klinefelter ([Kanakis and Nieschlag 2018](#)). Cerca de 75% dos homens com síndrome de Klinefelter não são diagnosticados, devido a vários fatores ([Lanfranco, Kamischke et al. 2004](#), [Bonomi, Rochira et al. 2017](#)):

- Heterogeneidade da apresentação clínica, que pode não levantar suspeita da síndrome de Klinefelter, em quadros mais ligeiros;

- Quadro clínico não identificado em consulta;
- Estigma dos indivíduos em relação a problemas de fertilidade, que os impedem de consultar um médico.

### **iii) Síndrome do Triplo X**

Contrariamente à síndrome de Turner, na síndrome do triplo X, a mulher apresenta uma cópia extra do cromossoma X (47,XXX). Esta anomalia cromossômica é a mais comum nas mulheres, porém, estima-se que apenas 10% dos indivíduos sejam diagnosticados, devido à existência de um fenótipo, muitas vezes ligeiro ou imperceptível ([Tartaglia, Howell et al. 2010](#)). Em regime pós-natal, são referenciadas para estudo genético as mulheres que evidenciem atraso no desenvolvimento, QI mais baixo que o normal, problemas na aprendizagem, distúrbios do comportamento, hipotonia, escoliose (principalmente na idade da adolescência) ou, ainda, falência ovárica prematura. As características físicas mais prevalentes incluem alta estatura, dobras epicânticas, hipotonia e clinodactilia ([Otter, Schrandner-Stumpel et al. 2010](#), [Tartaglia, Howell et al. 2010](#)).

### **iv) Síndrome de Jacobs**

A síndrome de Jacobs, ou síndrome 47,XYY é caracterizada pela presença de uma cópia extra do cromossoma Y, nos homens. Indivíduos com esta condição podem apresentar alta estatura, tamanho testicular aumentado, clinodactilia, hipertelorismo, tremores leves, atraso no desenvolvimento, dificuldades na aprendizagem, problemas comportamentais e de fertilidade ([Bardsley, Kowal et al. 2013](#), [Kim, Khadilkar et al. 2013](#)). Devido a este painel diverso de características fenotípicas, o diagnóstico poderá ser complicado de atingir. Homens com esta síndrome apresentam níveis mais altos de testosterona, que em nada se relacionam com um possível acréscimo de comportamentos agressivos apresentados, contrariamente ao que os primeiros estudos sobre esta doença indicavam ([Bardsley, Kowal et al. 2013](#), [Kim, Khadilkar et al. 2013](#)).

## 1.4.2 Alterações Cromossômicas Estruturais

Derivadas de erros nos processos de recombinação, reparação e replicação do DNA, as alterações cromossômicas estruturais são responsáveis por um vasto leque de doenças genéticas. A causa mais comum de anomalias cromossômicas estruturais é a recombinação homóloga não alélica (NAHR), que ocorre em zonas muito repetitivas ([Burssted, Zamariolli et al. 2022](#)). O número de rearranjos possíveis é quase infinito, no entanto nem todos os rearranjos são patológicos, como é o caso da inversão do cromossoma 9, que é bastante comum e apresenta um perfil polimórfico ([Steven L. Gersen 2013](#)).

As alterações cromossômicas estruturais dividem-se em equilibradas e desequilibradas. As alterações dizem-se equilibradas, quando não há perda nem ganho de material genético, sendo os seus portadores geralmente fenotipicamente normais, enquanto nas alterações desequilibradas há perda ou ganho de informação genética, que leva a um efeito de dosagem no paciente, causando patologias ([Robert Nussbaum 2015](#)). É importante perceber a origem deste tipo de alterações, que poderão ser herdadas dos progenitores ou poderão ocorrer *de novo* ([Steven L. Gersen 2013](#)). Contrariamente às aneuploidias, a maioria das alterações cromossômicas estruturais são herdadas dos progenitores e não *de novo*. Por essa razão, apesar de não terem geralmente impacto clínico no portador, indivíduos com alterações cromossômicas equilibradas deverão procurar aconselhamento genético para planeamento familiar, visto que estes rearranjos estão geralmente associados a um risco acrescido de formação de gâmetas desequilibrados. ([Benet, Oliver-Bonet et al. 2005](#), [Steven L. Gersen 2013](#)).

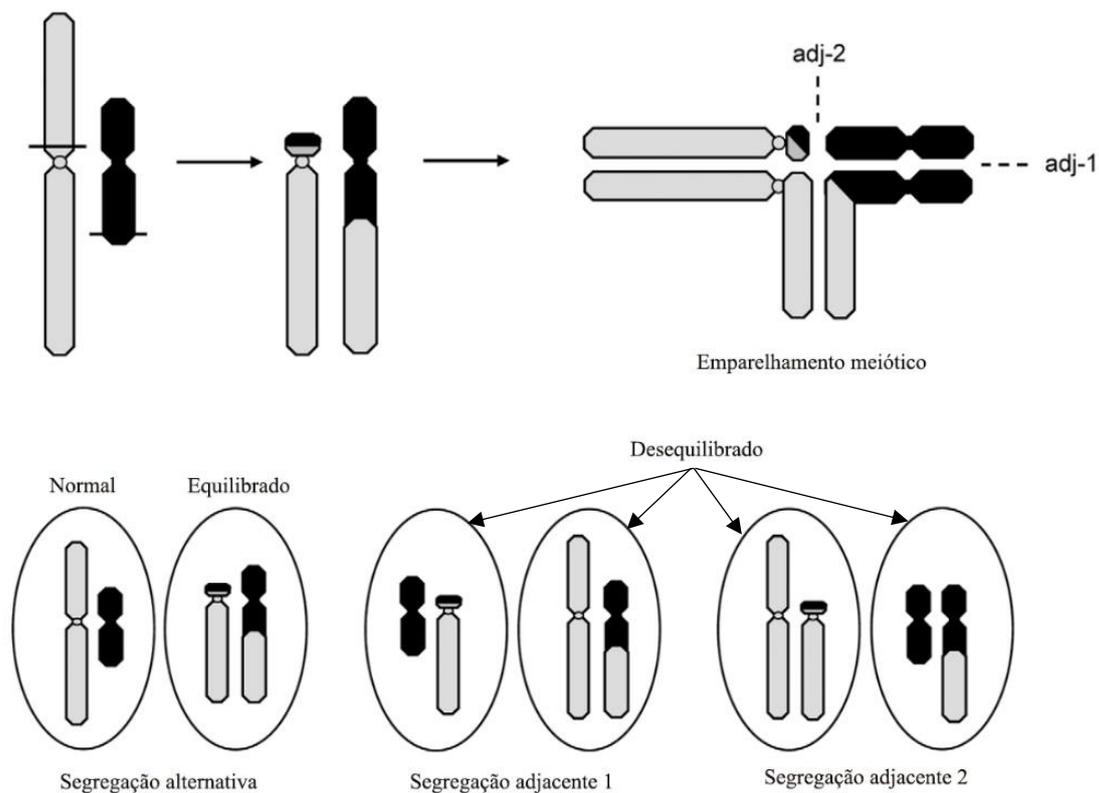
### 1.4.2.1 Alterações Cromossômicas Estruturais Equilibradas

Afetando cerca de 1 em 500 indivíduos, este tipo de alteração está geralmente associado a um fenótipo normal. No entanto, quando os pontos de quebra nos cromossomas envolvidos envolvem perda de sequência ou interrompem um gene com consequências críticas, nomeadamente quando se altera a zona reguladora da expressão de um gene, este tipo de rearranjo poderá provocar uma patologia no portador ([Robert Nussbaum 2015](#), [Wilch and Morton 2018](#)). Este grupo de alterações é constituído por translocações recíprocas e robertsonianas, inversões e inserções.

### i) Translocação (recíproca, robertsoniana)

As translocações podem resultar de trocas de segmentos cromossômicos entre dois cromossomas não homólogos, denominando-se recíprocas. Poderão ainda ser não recíprocas, envolvendo apenas os cromossomas acrocêntricos, com quebra nas regiões pericentroméricas e fusão dos braços longos, denominando-se robertsonianas.

As translocações recíprocas ocorrem quando há troca recíproca dos segmentos cromossômicos. Geralmente não provocam alterações no fenótipo do portador, mas resultam em problemas na formação de gâmetas do indivíduo, afetando a sua vida reprodutiva. Nas gônadas, da meiose do portador, podem resultar três tipos de segregações, a partir da formação quadrivalente: a segregação adjacente 1, a adjacente 2 ou a segregação alternativa (Figura 2).



**Figura 2** – Ilustração das possíveis segregações de cromossomas envolvidos numa translocação, durante a meiose. O tracejado representa os pontos de quebra da segregação. Adaptado de ([Qing, Xia et al. 2012](#)).

Das segregações adjacentes, resultarão sempre gâmetas desequilibrados, com material genético a mais ou a menos, enquanto na segregação alternada resultarão 50% de gâmetas normais e 50% de gâmetas portadores equilibrados. Os cromossomas com rearranjos são denominados cromossomas derivados, que são denominados consoante o centrómero que possuem. Podem ocorrer ainda as segregações 3:1 e 4:0, raramente viáveis ([Robert Nussbaum 2015](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

As translocações robertsonianas ocorrem quando dois cromossomas acrocêntricos se fundem na região do centrómero, perdendo os braços curtos, resultando num cariótipo de apenas 45 cromossomas. Apesar da perda de ambos os braços curtos, isso não se traduz num efeito deletério, visto que os braços curtos dos cromossomas acrocêntricos são constituídos por RNA ribossómico e DNA satélite, material altamente repetitivo no genoma. Podem envolver qualquer cromossoma acrocêntrico, sendo que 95% das translocações robertsonianas são entre cromossomas não homólogos, em que a translocação mais comum se dá entre os cromossomas 13 e 14 (75%) seguida da translocação entre os cromossomas 14 e 21 (10%) ([Steven L. Gersen 2013](#), [Robert Nussbaum 2015](#)). A formação mais comum de translocações robertsonianas resulta num cromossoma dicêntrico, em que um dos centrómeros poderá ficar suprimido. Este tipo de translocação apresenta as mesmas opções de segregação da translocação recíproca, porém gâmetas não equilibrados são sempre completamente aneuploides ([Gardner and Amor 2018](#)).

Estudos indicam que os portadores de translocações recíprocas são mais frequentemente homens, enquanto no caso das translocações robertsonianas, estes têm origem mais frequente na oogénese das mulheres ([Wilch and Morton 2018](#)).

## **ii) Inversão**

Inversões são rearranjos cromossómico formados quando há duas quebras no mesmo cromossoma, seguido de uma rotação de 180° do segmento por elas delimitado. Dependendo da localização dessas quebras, as inversões podem ser classificadas como pericêntricas (quando o centrómero se encontra incluído no segmento envolvido), com uma frequência de 0.12-0.7% ou paracêntricas (quando o segmento resulta de quebras

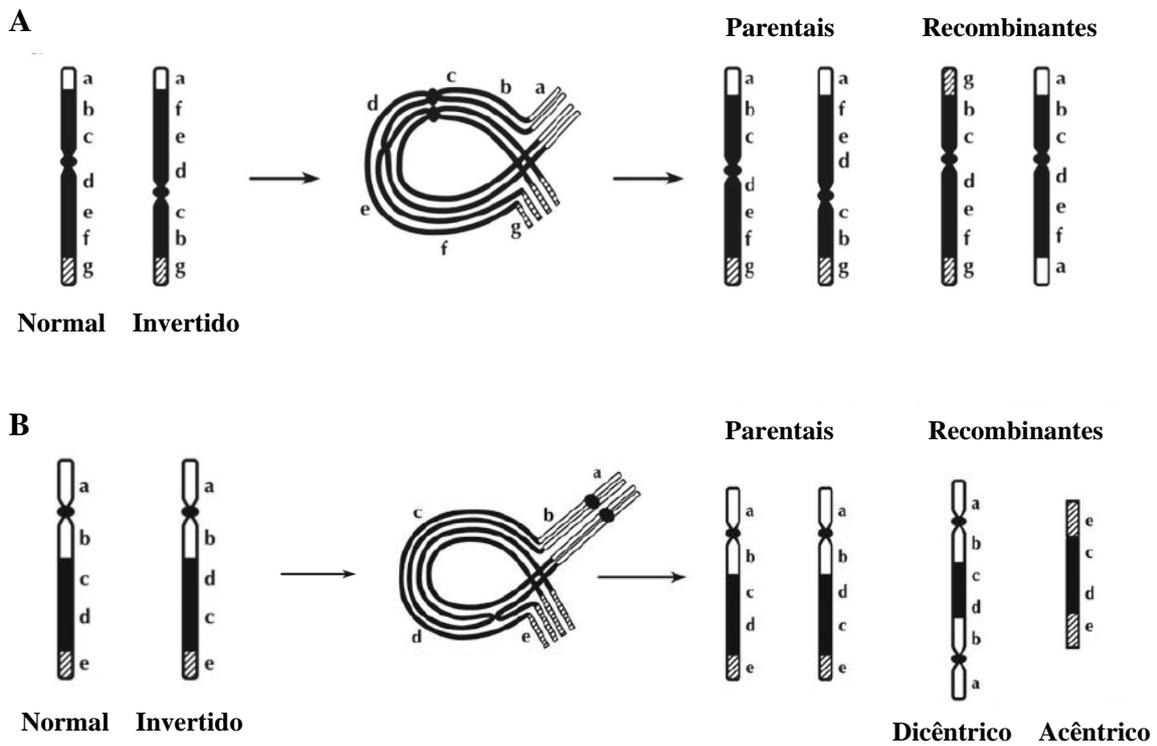
apenas no braço curto ou no braço longo), com uma frequência de 0.1-0.5% ([Gardner and Amor 2018](#)).

Nas inversões pericêntricas, a posição do centrómero fica alterada, originando diferentes dimensões de ambos os braços do cromossoma (Figura 3A). Algumas inversões pericêntricas observadas não têm impacto clínico, visto que envolvem as regiões heterocromáticas dos cromossomas, como é o caso dos cromossomas 1, 9 e 16. Devido à alteração na estrutura do cromossoma e, principalmente, devido à alteração da posição do centrómero, o alinhamento dos cromossomas homólogos, em preparação para o processo de *crossing-over*, é dado de uma forma adaptada, em que a porção cromossômica que não emparelha com o cromossoma normal forma um *loop*. Os cromossomas recombinantes, resultantes do *crossing-over* entre homólogos com inversões, irão conter material duplicado ou em deleção. Se a inversão foi de pequenas dimensões, este alinhamento alternativo poderá não se dar e a porção invertida não emparelha, formando um “balão”. Neste caso, a recombinação não se dá na região invertida e, por essa razão, não se formam cromossomas recombinantes anormais. Ao analisar os cromossomas resultantes da recombinação de cromossomas com inversões, conclui-se que inversões de maiores dimensões provocam deleções/duplicações de menor dimensão, no processo de *crossing-over*, enquanto nas inversões de menores dimensões se dava o contrário.

Por outro lado, inversões de maiores dimensões levantam maior preocupação, visto que os cromossomas recombinantes, com micro deleções ou duplicações, têm maior probabilidade de serem compatíveis com a vida e dar origem a descendência com patologias. Pequenas inversões estão associadas a abortos espontâneos, devido à formação de cromossomas recombinantes com grandes duplicações/deleções ([Robert Nussbaum 2015](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

Durante o fenômeno de emparelhamento e recombinação de cromossomas que sofreram inversão paracêntrica, os gâmetas resultantes podem ter cromossomas não recombinantes (normais ou com a inversão), cromossomas acêntricos ou cromossomas dicêntricos (Figura 3B). Cromossomas acêntricos são inviáveis na meiose, visto que não têm ponto de âncora para serem puxados pelo fuso mitótico. Já os cromossomas dicêntricos são considerados instáveis, devido às forças opostas exercidas nos cromossomas, em direção aos polos, justificado pela existência de dois centrómeros a que o fuso mitótico se liga.

Se eventualmente um dos centrómeros sofrer inativação, será possível a descendência ser portadora de um cromossoma dicêntrico ([Steven L. Gersen 2013](#)).



**Figura 3** – Esquema representativo do emparelhamento, recombinação e segregação dos cromossomas na meiose, quando um dos cromossomas apresenta uma **A** – inversão pericêntrica; quando apresenta uma **B** – inversão paracêntrica.

Adaptado de ([Steven L. Gersen 2013](#)).

### iii) Inserção

A inserção consiste na translocação de um segmento cromossômico de um cromossoma, para a região intersticial de outro cromossoma homólogo (inserção intracromossômica) ou não homólogo (inserção intercromossômica). O segmento inserido poderá sofrer também inversão, no momento de fusão com o novo cromossoma. Visto que estes rearranjos requerem três quebras cromossômicas para ocorrerem, são considerados rearranjos complexos. O fenótipo resultante para a descendência varia consoante o tamanho do segmento, assim como os genes envolvidos e a orientação da inserção ([Steven L. Gersen 2013](#), [Gu, Szafranski et al. 2016](#)). Durante o emparelhamento dos homólogos, a região inserida poderá formar uma bolsa (frequente em inserções de maiores

dimensões), não emparelhando com nenhuma região do homólogo, ou poderá efetuar um emparelhamento desalinhado, que leva a rearranjos, no momento do *crossing-over*. Gâmetas resultantes da meiose de um portador de uma inserção incluem, em proporções iguais: cromossomas normais, cromossomas com a inserção equilibrada, cromossomas com trissomia parcial e cromossomas com monossomia parcial (para o segmento cromossômico em questão) ([Gardner and Amor 2018](#)).

#### **1.4.2.2 Alterações Cromossômicas Estruturais Desequilibradas**

##### **i) Deleções**

Deleções envolvem a perda de uma porção do cromossoma, levando a uma insuficiência da expressão dos genes envolvidos (haploinsuficiência). Deleções detetadas pela citogenética, ou seja, entre 3-5Mb têm uma incidência de 1 em cada 7000 nascimentos, porém microdeleções são muito mais frequentes. Estas alterações podem ocorrer na região terminal do cromossoma – deleção terminal – ou ao longo do cromossoma – deleção intersticial. Poderá ter origem numa quebra cromossômica, em que o segmento acêntrico se perdeu em mitoses consecutivas ([Robert Nussbaum 2015](#)). Há relatos de deleções que não têm impacto fenotípico, quer por envolverem zonas pobres em genes ou por se tratar de regiões com informação repetitiva e redundante, como é o caso das regiões NOR, porém, em geral, estas mutações causam patologias graves nos pacientes. Alterações de maiores dimensões estão associadas a malformações mais severas. Para além da dimensão da deleção, também os genes envolvidos contribuem para a diferente severidade do fenótipo ([Gardner and Amor 2018](#)).

##### **ii) Duplicações**

Em regra, duplicações têm menor impacto fenotípico, relativamente a deleções. Estas dão origem a uma trissomia parcial, devido à duplicação de material genético. Poderá estar associado a outras alterações, como deleções ou inversões e surgir a partir da mesma cromátide, da cromátide irmã ou até mesmo de um cromossoma diferente. Por vezes fenótipos de duplicações traduzem-se no fenótipo contrário àquele provocado por deleções do mesmo segmento, como é o caso da duplicação/deleção do gene *MMP23*, na

região 1p36. Este tipo de alteração pode ter origem em erros de meiose, assim como podem surgir da recombinação de cromossomas com inversões ([Gardner and Amor 2018](#)).

### iii) Cromossomas em anel

Os cromossomas em anel resultam de quebras nas regiões distais, em ambos os braços de um cromossoma, seguidos de fusão dos pontas, formando uma estrutura circular, em forma de anel. Esta anomalia provoca deleções terminais de material genético, levando a monossomias parciais, ou trissomias parciais, no caso de se apresentar como supranumerário. Os cromossomas em anel mais frequentes são dos cromossomas 13 e 18, apesar de já terem sido reportados anéis de todos os cromossomas. Estes cromossomas são caracterizados por serem instáveis, aquando da divisão celular. A instabilidade, causada pela sua configuração estrutural, faz com que as trocas cromossómicas que ocorrem naturalmente entre todos os cromossomas, resultem em perdas ou ganhos de informação genética. Alguns rearranjos cromossómicos são tão graves, que levam à morte da célula, resultando em graves atrasos no crescimento e desenvolvimento do portador ([Steven L. Gersen 2013](#)).

Estudos reportaram a existência de anéis cromossómicos formados por fusão telomérica, em que não há perda de informação genética. No entanto, portadores destes cromossomas frequentemente apresentam uma síndrome de anel cromossómico, caracterizada por atraso severo no crescimento, acompanhado de distúrbios intelectuais ligeiros a moderados. Este quadro clínico é causado pela instabilidade do anel cromossómico, sendo que tipicamente, anéis de cromossomas de maiores dimensões levam a um fenótipo mais severo ([Steven L. Gersen 2013](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

Algumas células perdem o anel cromossómico, originando mosaicismo dinâmico. O fenótipo de um portador de anel cromossómico irá depender da presença/ausência deste mosaicismo dinâmico e da sua percentagem, da quantidade de informação genética perdida (ou duplicada, no caso de um anel supranumerário), dos genes envolvidos e da instabilidade apresentada ([Steven L. Gersen 2013](#)).

A epilepsia é a característica fenotípica mais comum e relevante em portadores do cromossoma 20 em anel, condição que se apresenta em duas formas principais: de fusão telomérica pós-zigótica (mosaico) ou então com deleções terminais, em ambos os braços,

originadas aquando da meiose. A epilepsia manifesta-se em idades mais jovens, no caso da forma completa de cromossoma em anel, em que todas as células o possuem. Estes pacientes demonstram um padrão característico de episódios epiléticos, pelo que devem ser referidos para análise citogenética quando isso é detetado. Cromossomas em anel dos cromossomas 14 e 17 também incluem a epilepsia como um dos sintomas, apesar de não ser tão comum ou tão severo ([Singh, Gardner et al. 2002](#), [Mulley and Mefford 2011](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

#### **iv) Isocromossomas**

Um isocromossoma é um cromossoma com duas cópias idênticas do mesmo braço cromossómico. Quando se encontra como supranumerário causa tetrassomia do segmento duplicado, enquanto indivíduos com 46 cromossomas irão ter trissomia do braço duplicado e monossomia do braço ausente ([Steven L. Gersen 2013](#)). Geralmente, quanto mais pequeno o isocromossoma, maior será a sobrevivência, visto que haverá um desequilíbrio menor. É também por essa razão que a maioria dos casos reportados são de isocromossomas de braços curtos. O isocromossoma do braço longo do cromossoma X é a forma mais frequente de anomalia estrutural que causa uma variante da síndrome de Turner ([Steven L. Gersen 2013](#), [Robert Nussbaum 2015](#)). Já foram reportados casos de isocromossomas complementares, em que um dos isocromossomas contém os braços curtos e o outro os braços longos. Este fenómeno dá origem a dissomia uniparental, que poderá trazer problemas fenotípicos para o portador, no caso de envolver cromossomas com genes ligados a *imprinting* materno ou paterno e traduz-se também em problemas reprodutivos, já que é muito pouco provável ter descendência sem anomalias genéticas ([Gardner and Amor 2018](#)). Um dos mecanismos propostos para a formação dos isocromossomas descreve que resultam da separação transversal do cromossoma pelo centrómero, em vez da separação longitudinal esperada, seguida da replicação dessa cromátide. Estudos moleculares demonstraram, porém, que a quebra cromossómica muitas vezes ocorre em regiões adjacentes ao centrómero, resultando num cromossoma isodicêntrico ([Steven L. Gersen 2013](#)).

## 1.5 *Guidelines* europeias para análise citogenética em diagnóstico pós-natal

Segundo as *guidelines* europeias, seria indicado realizar um diagnóstico pós-natal, por cariótipo constitucional, nas seguintes situações ([Silva, de Leeuw et al. 2019](#)):

- Historial familiar relevante de:

- Rearranjos cromossómicos;
- Défice intelectual de possível origem cromossómica (em que não é possível estudar o indivíduo afetado);
- Abortos espontâneos, fetos malformados ou nados mortos de etiologia desconhecida;

- Paciente com:

- Amenorreia primária/secundária ou menopausa prematura;
- Azoospermia ou oligospermia severa;
- Crescimento anormal (baixa estatura, crescimento excessivo, micro e macrocefalia);
- Ambiguidade sexual;
- Fenótipo anormal ou dismorfismos;
- Anomalias congénitas;
- Atraso do desenvolvimento ou défice intelectual;
- Suspeita de síndrome de deleção ou duplicação;
- Características clínicas indicativas de síndrome de instabilidade cromossómica;

- Casais com:

- Anomalia cromossómica ou variante rara detetada num diagnóstico pré-natal;
- Abortos espontâneos de repetição (três ou mais), nados mortos ou mortes neonatais, onde não é possível estudar o indivíduo afetado;
- Filho com uma anomalia cromossómica ou variante rara;
- Infertilidade de origem desconhecida.

## **Capítulo II – Patologias do desenvolvimento da criança e do adolescente**



## 2.1 Perturbações do crescimento

O crescimento está dividido em 3 períodos: desde o nascimento até aos 24 meses, onde é totalmente dependente da nutrição; dos 2 aos 9 anos de idade, onde este é maioritariamente influenciado pela hormona de crescimento; e finalmente dos 10 aos 19 anos de idade, em que a puberdade e as hormonas sexuais têm um grande papel. A altura de um dado individuo é influenciada, tanto pelo seu genoma (fator familiar), sendo um dos traços humanos mais herdados, como apresenta influências ambientais, de certas condições antenatais ou fatores ambientais que rodeiam a criança ao longo do seu crescimento. Anomalias genéticas relacionadas com a estatura tanto podem provocar um sob crescimento, assim como um sobre crescimento ([Argente, Tatton-Brown et al. 2019](#)).

### 2.1.1 Baixa estatura

Baixa estatura na infância é uma das alterações do crescimento que requer acompanhamento clínico e exclusão/confirmação de causa etiológica. A maioria das crianças com baixa estatura são saudáveis, no entanto algumas têm doenças raras e requerem acompanhamento. Baixa estatura é definida como a altura abaixo do 3º percentil da população geral ([Yadav and Dabas 2015](#)). Aproximadamente 5% das crianças indicadas para avaliação de baixa estatura apresentam uma causa patológica ([Barstow and Rerucha 2015](#)). As principais causas da baixa estatura são ([Barstow and Rerucha 2015](#), [Yadav and Dabas 2015](#)):

- Baixa estatura familiar (FSS);
- Atraso no crescimento constitucional (CGD);
- Deficiência da hormona do crescimento (GHD).

A realização de estudo citogenético em meninas com baixa estatura é ainda mais relevante, visto que baixa estatura e puberdade tardia poderão ser os únicos sintomas da síndrome de Turner ([Barstow and Rerucha 2015](#)). As síndromes de Down, Bloom, Nijmegen e Fanconi são outras condições genéticas que podem causar uma baixa estatura e que são identificáveis por realização de cariótipo ([Yadav and Dabas 2015](#), [Grunauer and Jorge 2018](#), [Meler, Sisterna et al. 2020](#)).

### 2.1.2 Crescimento excessivo

O crescimento excessivo resulta de um conjunto de fatores genético, epigenéticos e ambientais que alteram o normal desenvolvimento humano. Indivíduos que sofrem de crescimento excessivo poderão estar também em risco acrescido de predisposição tumoral. Esta patologia pode ser dividida em 3 grupos: crescimento excessivo pré-natal, ou seja, durante o período gestacional; crescimento excessivo pós-natal, caracterizado por um crescimento aumentado na infância e adolescência, causado maioritariamente por distúrbios endócrinos; e crescimento excessivo segmental, caracterizado por crescimento aumentado em determinadas partes do corpo, como por exemplo a cabeça, originando macrocefalia ([Manor and Lalani 2020](#)).

Outras causas para o crescimento excessivo pós-natal poderão ser alta estatura familiar, puberdade precoce, obesidade, assim como um vasto leque de síndromes causadas por alterações em determinados locus. Alterações essas que podem ser detetadas por teste citogenético, quando envolvem translocações ou inversões das regiões críticas das síndromes caracterizadas por crescimento excessivo. Neste grupo de síndromes estão incluídas as síndromes de Soto, Beckwith-Wiedemann, Marfan, entre outras ([Chen 2012](#), [Manor and Lalani 2020](#)).

A alta estatura é uma característica muito comum em algumas aneuploidias sexuais, assim como a Síndrome de Klinefelter e a Síndrome de Jacobs (47, XYY), e todos os cariótipos que apresentam uma ou mais cópias suprenumerárias do cromossoma X e/ou Y (48, XXYY; 47, XXX, por exemplo), todos detetados pela análise da citogenética convencional ([Leung and Robson 1995](#), [Sotos 1997](#)).

A alta estatura é definida por uma altura acima de dois desvios-padrão da média para a população do mesmo sexo, idade e etnia e apesar da percentagem de crianças com alta estatura ser semelhante às crianças com baixa estatura, é muito menos provável crianças com alta estatura serem seguidas medicamente ([Barstow and Rerucha 2015](#)).

Indivíduos com a síndrome do X frágil também apresentam crescimento excessivo, no entanto o teste citogenético não é recomendado para a sua deteção, devido a não detetar cerca de 20% dos homens portadores e mais de 50% das mulheres portadoras ([Sotos 1997](#)).

Finalmente, a trissomia 8p é caracterizada por crianças com membros grandes, com uma testa proeminente e uma face larga, sendo diagnosticada através da análise do cariótipo,

que demonstra uma duplicação do braço curto do cromossoma 8, devido a uma translocação equilibrada num dos progenitores ou devido a uma mutação *de novo* ([Sotos 1997](#)).

## 2.2 Ambiguidade genital

Os distúrbios de desenvolvimento sexual compõem um grupo de condições congénitas, associadas ao desenvolvimento atípico dos genitais internos e externos. Estes indivíduos poderão ser detetados à nascença, pela presença de genitais externos ambíguos, ou apenas mais tarde, devido à sua virilização pós-natal, atraso ou ausência da puberdade ou até infertilidade ([Witchel 2018](#)).

Tipicamente, a presença do gene *SRY*, no cromossoma Y, desencadeia a cascata molecular, que levam ao desenvolvimento do sexo masculino, porém, apesar do sexo genético e da diferenciação gonadal ser determinada pelos cromossomas sexuais, o fenótipo está dependente da influência das secreções hormonais dos testículos ([Frimberger and Gearhart 2005](#), [Witchel 2018](#)).

O sexo genético, determinado pelo cariótipo, é o fator mais importante na classificação de um individuo intersexo, sendo que se dividem em: mulheres pseudo-hermafroditas, com um cariótipo feminino (46,XX) e características masculinas, causadas por um excesso de androgénios no útero e homens pseudo-hermafroditas, com um cariótipo masculino (46,XY) e características femininas, devido à falta de recetores de testosterona ou androgénios.

Já o verdadeiro hermafrodita é aquele individuo que possui tecido testicular e ovárico. A maioria destes indivíduos são 46,XX, apesar de haver casos de 46,XY ou mosaicos 45,X/46,XY ([Frimberger and Gearhart 2005](#)).

A análise de sangue periférico, através do cariótipo convencional, poderá ser útil para identificar os cromossomas X e Y, arranjos cromossómicos equilibrados e grandes rearranjos estruturais. FISH usando sondas específicas para os cromossomas X e Y pode ser realizado para detetar mosaicismo e sondas específicas para o gene *SRY* podem ser usadas para avaliar rearranjos no Yp ([Witchel 2018](#)).

Poderá ajudar no diagnóstico obter tecido gonadal, para obter o seu cariótipo e considerar as opções de mosaicismo ou um caso de quimera. O objetivo da testagem é chegar à causa

da ambiguidade genital, assim como indicar corretamente o sexo do indivíduo ([Stambough, Magistrado et al. 2019](#)).

### 2.3 Mosaicismo

O mosaicismo é definido pela presença de duas ou mais linhas celulares com composições genéticas diferentes, provocado por um fenómeno pós zigótico, em que ocorrem novas alterações espontâneas ([Moog, Felbor et al. 2020](#), [Thorpe, Osei-Owusu et al. 2020](#)).

Há três tipos de mosaicismo: o somático (que apenas ocorre em células somáticas), o mosaicismo gonadal (que ocorre nas células germinativas) e a junção dos dois (gonadal e somático).

É difícil prever as consequências clínicas do mosaicismo, visto que está dependente da altura do evento mutacional, dos tecidos afetados, da percentagem de mosaicismo e da alteração. Quanto mais tarde se der a alteração, mais ligeiros serão os sintomas ([Spinner and Conlin 2014](#)). Em regra, qualquer doença monogénica pode ocorrer sob a forma de mosaico, sendo que está associado a fenótipos mais leves ou assintomáticos ([Moog, Felbor et al. 2020](#)).

Apenas 3 trissomias autossómicas são compatíveis com a vida: síndrome de Down (trissomia 21), síndrome de Patau (trissomia 13) e a síndrome de Edwards (trissomia 18). Todas as outras trissomias são letais a nível embrionário, contudo, quase todas as trissomias e monossomias são viáveis na forma de mosaico. O fenótipo é severo, incluindo crescimento intrauterino tardio, doenças cardíacas congénitas e dismorfismos ([Thorpe, Osei-Owusu et al. 2020](#)).

Visto que estas alterações não são herdadas dos progenitores, não há risco acrescido de fetos, de gravidezes futuras, desenvolverem a mesma condição. A única forma do indivíduo afetado passar a alteração genética, é no caso de o mosaico afetar também as células germinativas ([Moog, Felbor et al. 2020](#)).

Técnicas como o MLPA e o a-CGH não são indicadas para a deteção de mosaicismo de baixa expressão. Por outro lado, a análise citogenética permite a identificação e caracterização de duas ou mais linhas celulares presentes numa amostra, visto que cada célula é analisada individualmente e o seu cariótipo averiguado facilmente ([Spinner and Conlin 2014](#), [Thorpe, Osei-Owusu et al. 2020](#)). A capacidade de deteção vai aumentado à

medida que mais células vão sendo contadas, sendo que a análise de 30 células (o valor estabelecido de contagens em casos de suspeita de mosaicismo), permite a detecção de mosaicismo de até 10%. A detecção de mosaicismo por citogenética convencional está limitada ao único tecido em estudo, pelo que a técnica de FISH poderá colmatar esse problema, ao permitir o estudo de outros tecidos, com células em interfase e com um maior poder de resolução ([Spinner and Conlin 2014](#)).

Novos métodos de diagnóstico como a NGS têm-se mostrado eficazes a detetar casos de mosaicismos de expressão tão baixa quanto 1% ([Moog, Felbor et al. 2020](#), [Cook, Armstrong et al. 2021](#)). Estas técnicas permitem a leitura de múltiplos sinais distintos, ao longo da área de interesse, permitindo a sua avaliação quantitativa. A detecção de mosaicismo é particularmente importante, de forma a ser possível um correto aconselhamento genético às famílias ([Cook, Armstrong et al. 2021](#)).

## **2.4 Síndromes de instabilidade cromossómica**

As síndromes de instabilidade cromossómica são um grupo de doenças herdadas de forma predominantemente recessiva associada a defeitos no sistema de reparação do DNA, levando a instabilidade cromossómica, quebra dos cromossomas e um vasto leque de consequências fenotípicas. Deste grupo de síndromes de instabilidade cromossómica, fazem parte a Anemia Fanconi (FA), a Ataxia Telangiectasia (A-T), também denominada síndrome Louis-Bar, a síndrome de quebras de Nijmegen (NBS) e a síndrome de Bloom (BS) ([Taylor, Rothblum-Oviatt et al. 2019](#)). Outras doenças como síndrome de Roberts e a síndrome ICF também apresentam cromossomas aberrantes em cultura, porém não fazem parte do grupo de síndromes de instabilidade cromossómica. Todas estas condições apresentam um perfil citogenético característico, em alguns casos, apenas quando as células são sujeitas a determinados agentes ou diferentes tipos de meios de cultura ([Gardner and Amor 2018](#)).

As células de pacientes com Ataxia telangiectasia demonstram sensibilidade a radiação ionizante, instabilidade cromossómica, telómeros encurtados, senescência prematura e defeitos na resposta a quebras na cadeia dupla do DNA (DSBs) ([Rothblum-Oviatt, Wright et al. 2016](#), [Amirifar, Ranjouri et al. 2019](#)). Em cultura, os linfócitos T destes pacientes demonstram alterações cromossómicas não aleatórias, envolvendo principalmente os cromossomas 7 e 14. Quebras em 4 bandas cromossómicas específicas (7p14, 7q35,

14q12 e 14q32) causam translocações e inversões nestes cromossomas, a uma frequência de 33 e 50 vezes superior à dos cromossomas de células de indivíduos saudáveis, respetivamente ([Kojis, Gatti et al. 1991](#)). Estas características são evidentes quando as células são expostas a radiação ionizante ou à bleomicina. No entanto, o diagnóstico desta condição é preferencialmente feito através da análise do gene *ATM*, a qual é mais exata ([Gardner and Amor 2018](#)).

A síndrome de Nijmegen (NBS) partilha características com a AT, com os mesmos rearranjos frequentes (inversões e translocações) envolvendo o cromossoma 7 e o cromossoma 14 ([Chrzanowska, Gregorek et al. 2012](#)). É igualmente preferível a análise direta dos genes envolvidos na síndrome de Nijmegen, para ser alcançado um diagnóstico ([Gardner and Amor 2018](#)).

As células de um indivíduo com síndrome de Bloom são caracterizadas por uma elevada taxa de trocas entre as cromátides irmãs (SCEs), que é detetável através da sua marcação diferencial. Apesar de não serem específicas à doença, as células de BS também apresentam outras alterações citogenéticas, como falhas e quebras cromossómicas espontâneas em 15% das metafases, associação telomérica e figuras quadri-radiais, que resultam do processo de recombinação entre cromossomas homólogos que não foi finalizado, em 1 a 5% das metafases ([German, Crippa et al. 1974](#), [German 1993](#), [Arora, Chacon et al. 2014](#), [Ababou 2021](#)).

Apesar de as células FA apresentarem uma frequência mais alta de quebras cromossómicas, relativamente a células normais, não é um fator distintivo para o diagnóstico da doença. Para a obtenção de um diagnóstico é então necessário recorrer ao uso de agentes de *cross-linking*, que provocam quebras nos cromossomas de forma diferencial entre células normais e células FA, sendo os fibroblastos o tecido mais viável para este estudo ([Tischkowitz and Hodgson 2003](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

As células de pacientes com síndrome ICF apresentam anomalias cromossómicas envolvendo as regiões pericêntricas heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 (menos frequente) e 16, devido à hipometilação de sequências dessa região. Estas anomalias consistem em configurações de cromossomas com múltiplos braços e descondensação das regiões indicadas, fenómeno que parece ser muito mais frequente devido a estimulação de crescimento celular, ou seja, em culturas celulares de linfócitos T, pelo

que a análise citogenética é muito importante no diagnóstico desta síndrome ([Smeets, Moog et al. 1994](#), [Wijmenga, Hansen et al. 2000](#)).

Relativamente a pacientes com a síndrome de Roberts, na observação de células, são detetados “inchaços” nas regiões centroméricas, assim como uma repulsão, designada por repulsão heterocromática (HR), originada pela separação prematura dos centrómeros (PCD). O “inchaço” dos centrómeros é mais visível em cromossomas com grandes regiões de heterocromatina, como os cromossomas 1, 9 e 16, enquanto a repulsão heterocromática é mais evidente nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos e no braço longo do cromossoma Y. Estes achados são mais evidentes com a coloração CBG, na bandagem dos cromossomas. A análise citogenética tornou-se então uma técnica de diagnóstico muito usada para esta doença ([Van Den Berg and Francke 1993](#), [Gardner and Amor 2018](#)).



## **Capítulo III – Materiais e Métodos**



### **3.1 Grupo de estudo**

O estágio foi realizado no Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico e envolveu a análise citogenética de amostras de utentes na faixa etária de 0-18, crianças e adolescentes com alterações do desenvolvimento. Os casos clínicos apresentados envolvem resultados representativos de amostras processadas entre o mês de setembro de 2022 até ao mês de maio de 2023.

### **3.2 Citogenética Convencional**

#### **3.2.1 Colheita e identificação de amostras**

Todo os procedimentos realizados seguiram os protocolos experimentais implementados na rotina do Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico de Coimbra. O processo inicia-se após receção da colheita de sangue periférico, em tubo de heparina sódica, acompanhado da requisição na base de dados laboratorial e da indicação clínica. A triagem, no laboratório de citogenética, envolve a verificação dos dados do utente e atribuição de um número interno a cada amostra, com codificação pré-estabelecida. Os tubos de colheita são mantidos a 4°C até ao estabelecimento de culturas celulares.

#### **3.2.2 Estabelecimento de culturas**

Para o estabelecimento de culturas, são preparados dois tubos com 5ml de meio de cultura PB-MAX, Gibco®, por utente, que irão corresponder a duas culturas de linfócitos. A cada tubo de meio são adicionadas 8-10 gotas de sangue da amostra (consoante o tempo de incubação), com pipeta de Pasteur descartável estéril.

Após homogeneização, as culturas são incubadas numa estufa a 37°C, numa inclinação de 45°, de forma a promover as trocas gasosas, durante 48 ou 72h.

#### **3.2.3 Sincronização do ciclo celular**

Decorrido o tempo de incubação, são adicionados 50µl de metotrexato (10 µM) aos tubos de cultura, homogeneizando de seguida. Estes são novamente colocados na estufa a 37°C e ficam a incubar por mais 17h. Este reagente vai bloquear todas as células na fase S,

permitindo a sincronização do ciclo celular. Posteriormente, as amostras são centrifugadas a 1200rpm durante 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante. São adicionados 5ml a cada tubo de um novo meio RPMI, suplementado com soro fetal bovino na proporção de 10% e antibióticos 1% (streptomicina e penicilina). Adiciona-se ainda 50 µl de timidina (1 mM) a cada cultura, seguindo a incubação a 37°C por 5h, o que vai permitir a retoma do ciclo celular de uma forma sincronizada.

### **3.2.4 Manipulação**

A adição de 50µl de colcemida (10 µg/ml) a cada cultura, é seguida de incubação a 37°C por 10 minutos. Este composto inibe a formação do fuso acromático, através da sua ligação à tubulina, pelo que a célula fica bloqueada em metafase.

Segue-se uma centrifugação a 1200rpm durante 10 minutos, o sobrenadante é descartado e o restante segue para o choque hipotónico com 5ml de cloreto de potássio (KCl, 75 mM), incubados a 37°C por 25 minutos, que provoca a entrada de água para as células, resultando num estado de turgescência, que facilita visualização dispersão dos cromossomas nas células.

### **3.2.5 Fixação**

Para a fixação, os tubos são centrifugados a 1200 rpm, durante 10 minutos e o sobrenadante retirado. Este processo é dividido em três momentos de fixação. Na primeira fixação são adicionados, lentamente, 4ml de uma solução (a -20°C) de metanol e ácido acético, numa proporção de 3:1, a cada tubo, sob agitação constante no vórtex, de forma a não formar coágulos. Os tubos seguem para centrifugação e remoção do sobrenadante, para se proceder então à 2ª fixação, em que se adiciona 4ml da solução, desta vez sem agitação, sendo estes posteriormente armazenados a 4°C, durante 20 minutos. Decorrido este tempo, seguem para a 3ª fixação, que é idêntica à 2ª fixação, em que os tubos ficam depois em repouso a 4°C graus até ao espalhamento.

### **3.2.6 Espalhamento (preparação das lâminas histológicas)**

Realiza-se uma nova lavagem das células com fixador fresco, seguida de um ajuste de concentração da amostra. O espalhamento realiza-se numa câmara com as condições de

temperatura e humidade controladas (22°C e 54% de humidade) e consiste em dispensar duas gotas da suspensão de células numa lâmina, de forma distanciada, para que seja possível o eficiente espalhamento das metafases. Ao longo do processo, as lâminas são observadas ao microscópio de contraste de fase, de forma a verificar se o espalhamento foi eficaz, ou se seria necessário um ajuste de concentração. Após o espalhamento, as lâminas são envelhecidas numa estufa a 80°C durante 4h, para bandagem GTL, ou durante 3h para bandagem CBG ou FISH. As lâminas espalhadas para posterior análise por FISH são guardadas a -20°C até ao dia de hibridização.

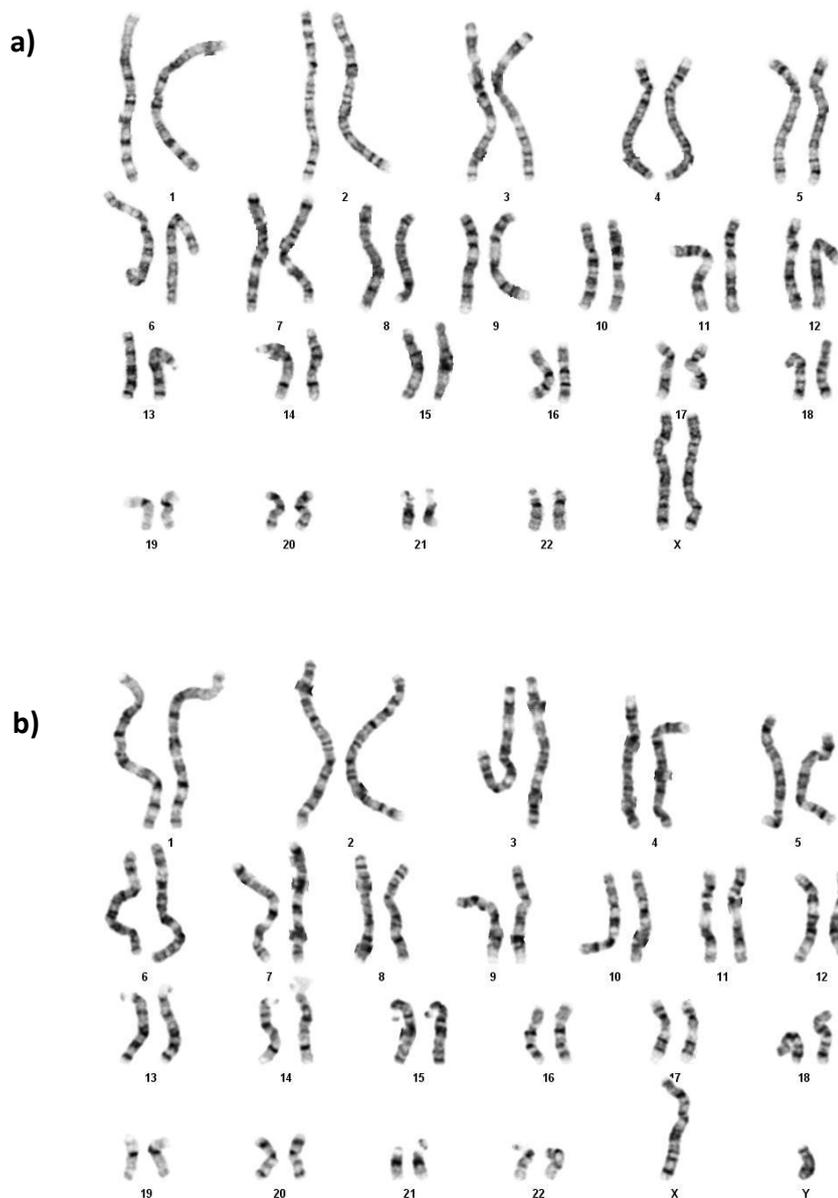
### 3.2.7 Bandagem

Após o espalhamento, a próxima etapa é a bandagem. A técnica de bandagem *standard* é a bandagem GTG (corante Giemsa) ou GTL (corante Leishman), que cora os cromossomas de forma a cada um ter um padrão de bandas escuras, quando se trata de uma região heterocromática (rica em adenina e timina) e claras, quando se trata de uma região eucromática (rica em citosina e guanina).

A coloração CBG (corante Giemsa), é efetuada para estudar as regiões centroméricas e heterocromáticas, incluindo a região distal do Y (Figura 4).



**Figura 4** – Metafase obtida após cultura sincronizada de linfócitos de sangue periférico, com bandagem CBG, de um indivíduo do sexo masculino com o complemento 46,XY. Figura cedida pelo Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico de Coimbra.



**Figura 5** – Cariograma representativo de um cariótipo, sem alterações, de uma a) mulher (46,XX) e de um b) homem (46,XY), usando a bandagem GTL. Figura cedida pelo Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico de Coimbra.

**Bandagem GTL** – é preparado um banho-maria a 37°C, com jarros de Coplin organizados sequencialmente, contendo: tripsina [0,02g/mol], NaCl [0,9%], 2 jarros com tampão Gürr (pH=6,8) e água. Fora do banho encontra-se o corante Leishman (5%), à temperatura ambiente. As preparações são incubadas, durante alguns segundos, no jarro de tripsina, que vai digerir a cromatina, o que vai permitir a entrada de corante nos cromossomas. De seguida, passa por duas lavagens, em NaCl e tampão Gürr, de forma a

parar a ação da tripsina. De seguida são incubadas em corante Giemsa por 8 a 9 minutos, passando novamente por duas lavagens posteriores, em tampão Gürr e por fim água, para retirar o excesso de corante e prevenir precipitações do corante nas lâminas. Após secarem à temperatura ambiente, são observadas ao microscópio ótico (1000x) para avaliar a necessidade de ajustar os tempos de incubação em tripsina e no corante.

**Bandagem CBG** – é preparado um banho a 56°C, onde vai ser colocado o jarro de Coplin com a solução 2xSSC. À temperatura ambiente encontram-se, sequencialmente, os jarros com HCl 1N, água, solução saturada de hidróxido de bário, 2 jarros com água, corante Giemsa 4%, 2 jarros com tampão Gürr (pH=6,8). As lâminas ficam submersas em HCl por 10 minutos, seguido de uma lavagem em água. De seguida, passam pelo hidróxido de bário por alguns segundos (dependendo do tempo de envelhecimento) e novamente duas lavagens em água. A partir daí seguem para a solução 2xSSC, onde ficam por 1 hora, até irem para o corante Giemsa durante 15 minutos, findos os quais, passam por 2 últimas lavagens em tampão Gürr, antes de secarem à temperatura ambiente.

### **3.2.8 Análise cromossómica ao microscópio ótico**

Após obtenção das lâminas preparadas, estas são observadas ao microscópio ótico, com o objetivo de localizar metafases de boa qualidade: bem espalhadas, sem muitas sobreposições, bem isoladas umas das outras e com boa definição e coloração. As metafases selecionadas irão ser capturadas e os seus kariogramas montados através do programa de software informático Cytovision®, de forma que cada par de cromossomas consiga ser analisado de p a q, verificando-se cada região em pelo menos duas metafases. Durante a análise são geralmente avaliadas no mínimo 15 metafases, englobando a contagem do complemento cromossómico, análise estrutural e construção de kariogramas. Em casos de suspeita de mosaicismo, são avaliadas 30 a 50 metafases consoante a indicação clínica.

Finalmente, na elaboração do relatório final, segue-se as regras internacionais e de nomenclatura do ISCN ([ISCN 2020](#)).

### **3.3 *Fluorescence in situ hybridization (FISH)***

Todas as etapas, até ao espalhamento, são semelhantes à citogenética convencional até preparação do material alvo. Após o espalhamento, as lâminas são armazenadas a -20°C. Selecionam-se as lâminas com maior índice de metafases. Se existir citoplasma, o pré-tratamento com pepsina é importante, para digerir e permeabilizar o núcleo à passagem da sonda. Inicia-se com a incubação numa solução de 2xSSC, a 37°C, por 10 minutos. No caso de ser necessário o tratamento de pepsina, após o tratamento em 2xSSC, as lâminas são incubadas por 5-10 minutos, numa solução de pepsina com HCL 1N (0.075mg/500ml), a 37°C. Segue-se 5 minutos em PBS 1x (para lavar), 5 minutos em formaldeído (para fixar) e, novamente, 5 minutos em PBS 1x.

Segue-se a desidratação, com concentração crescente, 70%, 85% e 100% de etanol, 2 minutos sequencialmente. Posteriormente, pipeta-se 1.5-2µl de sonda na zona a hibridizar, sendo depois fixada por uma lamela. A lamela sela-se com cola e a lâmina coloca-se na placa térmica a 74°C, de forma a se dar a desnaturação conjunta da sonda e do DNA alvo, durante 2-3 minutos. Posteriormente, dá-se a hibridização numa câmara húmida, sendo armazenada na estufa a 37°C onde fica a hibridizar *overnight*. Após a hibridização, mergulha-se a lâmina em 2xSSC, de forma a ajudar no amolecimento da cola, para se retirar a lamela. De seguida, mergulha-se a lâmina em 0.4xSSC, a 70°C, por 2 minutos e em 2xSSC TW20, à temperatura ambiente, por 1 minuto. Adicionam-se 8µl de DAPI (contraste), na zona hibridizada, colocando-se novamente uma lamela por cima. A lâmina coloca-se então numa caixa opaca a 4°C, por 30 minutos. Por último, observam-se as lâminas no microscópio de fluorescência e avalia-se a necessidade de lavagens adicionais, para remover hibridizações inespecíficas. Na observação de cada metafase ou interfase identificam-se os sinais da sonda controlo e da sonda em estudo.

## **Capítulo IV – Resultados e Discussão**



Do grupo de amostras selecionadas, de setembro de 2022 a maio de 2023, 85,7% apresentou um cariótipo sem alterações e em nove observaram-se cromossomopatias. Na Tabela 1 estão representados os casos selecionados com alterações cromossômicas, denominados por casos clínicos 1 a 8, que irão ser discutidos.

Nº	Sexo	Idade	Indicação clínica	Resultado
1	F	19m	síndrome de Angelman - array-CGH a indicar deleção 15q11.2q13.1	46,XX ish del(15q11.2q11.2)(UBE3A/D15S10-)
2	F	14m	baixa estatura	mos47,XXX[26]/45,X[4]
3	M	15	baixa estatura, hipogonadismo	46,XY Síndrome ICF
4	M	14	tumor ósseo	47,XXY
5	M	14d	DPN trissomia 21	47,XY,+21
6	F	2	ADPM, microcefalia, epilepsia, distúrbios, autismo, triplicação 15q11.2q12	47,XX, +psu idic(15)(pter-q12::q12-pter)
7	F	11	desaceleração de crescimento, baixa estatura	46,X,i(X)(q10)
8	F	8	suspeita síndrome de Turner	46,X,idic(Y)(q11.2)[18]/45,X[12].ish idic(Y)(SRY++)
9	F	7	baixa estatura	mos 45,X[4]/46,XX[46]
10	M	11	ADPM, defice cognitivo, duplicação cromossoma X em a-CGH	47,XXY
11	F	2	fenótipo trissomia 21	47,XX,+21
12	M	31d	distúrbios, suspeita de trissomia 21	47,XY,+21

**Tabela 1** – Resumo dos casos analisados, com a respetiva indicação clínica e seus resultados.

Legenda:

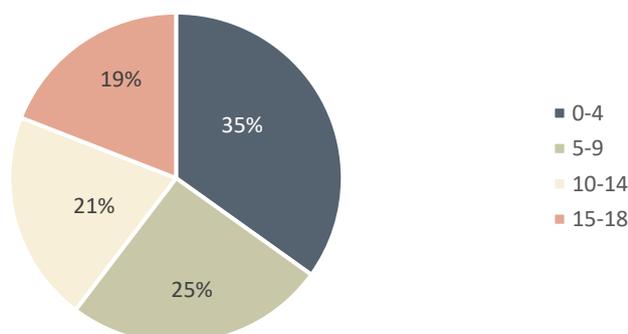
d- Dias

m – Meses

M – Masculino

F – Feminino

Do grupo de casos clínicos selecionados, as idades distribuíram-se de acordo com o representado no Gráfico 1. O grupo com maior representatividade correspondeu à faixa etária dos 0-4 anos, representando 35% do total das amostras e o grupo com menor representatividade foi o da faixa etária dos 15-18 anos, correspondendo a 19% do total. A “baixa estatura” foi a indicação clínica mais representada, com 35 casos, com apenas dois utentes do sexo masculino.

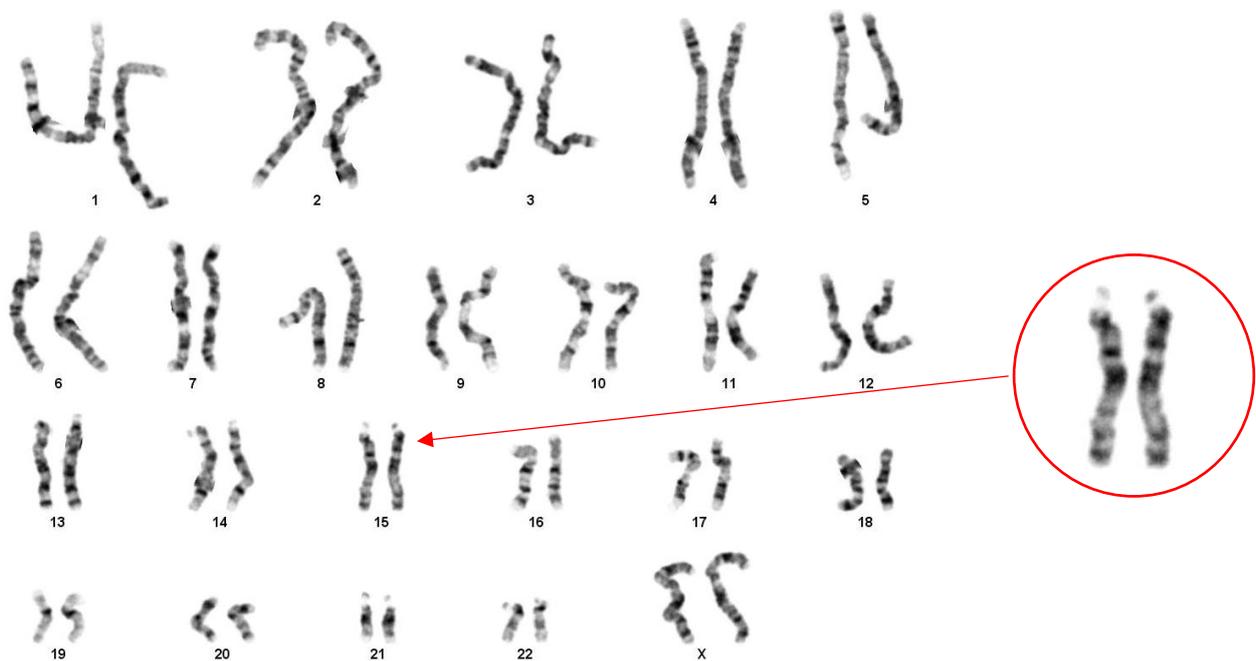


**Gráfico 1** – Distribuição das idades dos utentes analisados, por faixa etária, em percentagem.

## 4.1 Caso Clínico 1

Bebé de 19 meses, do sexo feminino, foi indicada para teste citogenético após o resultado do estudo por *array*-CGH (realizado no Laboratório de Citogenética e Genómica, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC)), que revelou uma deleção no cromossoma 15 na região 15q11.2q13.1.

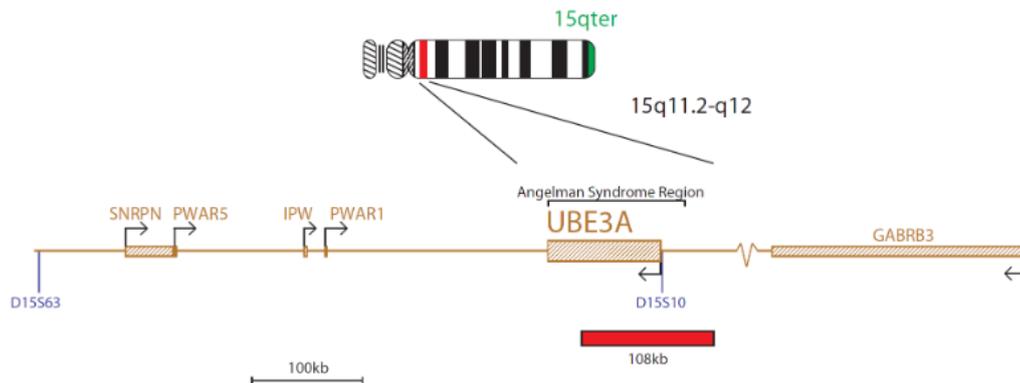
De forma a esclarecer o tipo de rearranjo estrutural na origem da deleção, foi realizado o estudo citogenético. Após a obtenção de metafases, a partir da cultura de linfócitos, estas foram coradas utilizando a bandagem GTL. A sua análise permitiu identificar um complemento cromossómico do sexo feminino, sem alterações cromossómicas microscopicamente visíveis, com o complemento 46, XX (Figura 6).



**Figure 6** – Cariograma com bandas GTL, representativo do caso clínico 1 (46,XX). Não se observam alterações nos cromossomas analisados. Em destaque, encontra-se o par de homólogos 15, sem alterações visíveis.

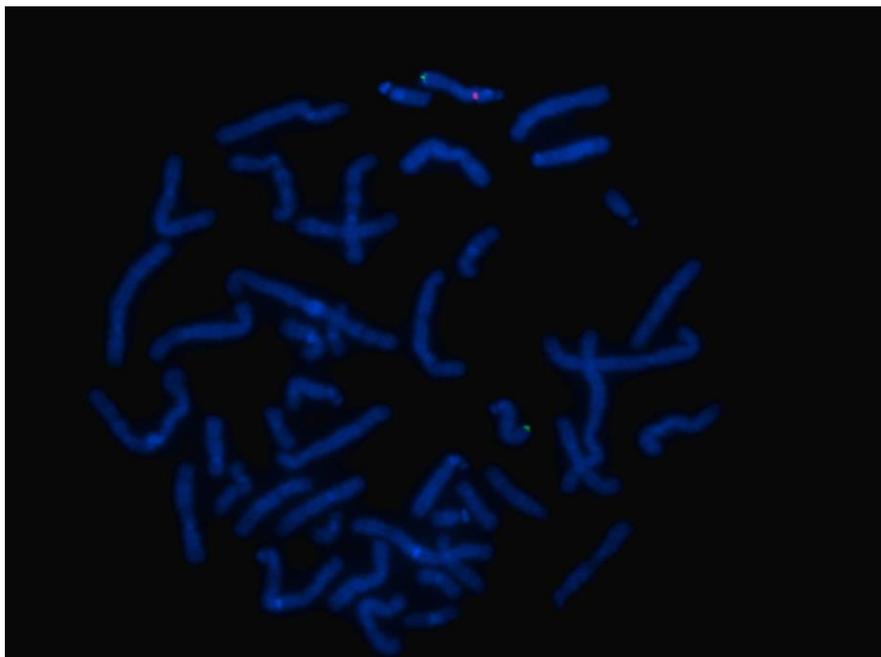
Complementou-se com a técnica de *Fluorescence in situ hybridization* (FISH), já que esta apresenta um poder de resolução superior à citogenética convencional. Foi utilizado um conjunto de sondas da CytoCell®, composto por uma sonda direcionada para o gene em

estudo (*UBE3A/D15S10*, 15q11.2q11.2) e uma sonda controlo (15qter, 15q26.3) no cromossoma 15, representadas a vermelho e verde, respetivamente, na figura 7.



**Figura 7** – Representação gráfica da região de hibridização da sonda *UBE3A/D15S10*, que engloba grande parte do gene *UBE3A*, e da sonda controlo 15qter (CytoCell®). Adaptado de <https://www.ogt.com/media/zhcjnynr/lpu006-v011-00.pdf>.

A análise de metafases por FISH confirmou o diagnóstico realizado anteriormente por *array*-CGH, observando-se apenas um sinal da sonda *UBE3A/D15S10* (Figura 8). Deste modo, verifica-se a deleção intersticial da região 15q11.2q11.2, incluindo o gene *UBE3A*, num dos cromossomas 15, 46,XX,ish del(15)(q11.2q11.2)(*UBE3A/D15S10*-).



**Figura 8** – Metafase, do caso clínico 1, observada ao microscópio de fluorescência, após análise por FISH, onde é possível verificar dois sinais de hibridização da sonda controlo 15qter, marcada a verde, e apenas um sinal da sonda *UBE3A/D15S10*, marcada a vermelho, confirmando a deleção desta região.

Alterações na região 15q11.2q13.1 do cromossoma 15 de origem materna estão associados à síndrome de Angelman. A síndrome de Angelman afeta cerca de 1 em cada 15,000 indivíduos e caracteriza-se por disfunção motora, déficit intelectual severo, dificuldades na fala, convulsões, hiperatividade e doença no espectro do autismo ([Margolis, Sell et al. 2015](#), [Gardner and Amor 2018](#)). A alteração identificada está associada ao fenótipo reportado neste caso.

Na origem desta síndrome poderão estar deleções *de novo* de regiões que envolvam o gene *UBE3A*, que corresponde à causa mais frequente (70-80%) e ao fenótipo mais severo. Adicionalmente, esta síndrome pode estar associada à herança materna de alterações nesse gene (10-20%), a dissomia uniparental (3-5%) ou a defeitos de *imprinting*, que afetam a expressão do gene (3-5%) ([Gardner and Amor 2018](#)).

Sendo os pais fenotipicamente normais, poderão ser portadores de uma alteração estrutural equilibrada. Ambos os progenitores foram sujeitos a estudo citogenético, cuja análise não revelou alterações cromossômicas. Visto que a síndrome de Angelman, em 10-20% dos casos é causada pela herança materna de uma alteração no gene *UBE3A*, adicionalmente, foi realizado o estudo por FISH da mãe da bebé, com a mesma sonda, que também não apresentou alterações. Estes resultados excluem a possibilidade de rearranjos equilibrados dos progenitores terem sido herdados, de forma desequilibrada, pela bebé de 19 meses. Trata-se, portanto, de uma deleção *de novo*. Sendo uma alteração *de novo*, o risco de recorrência é de 1% ([Van Buggenhout and Fryns 2009](#)). Todas estas questões devem ser abordadas e discutidas, no âmbito de consultas de aconselhamento genético.

## 4.2 Caso Clínico 2

Bebé de 14 meses do sexo feminino, com baixa estatura, sem estudos previamente realizados.

Após estabelecimento de cultura de linfócitos e análise de metafases com bandas GTL, identificaram-se duas linhas celulares distintas. Uma das linhas celulares apresentava uma cópia extra do cromossoma X (47,XXX), enquanto a outra linha celular apresentava uma monossomia do cromossoma X (45,X). Este resultado corresponde a um mosaico da síndrome de Turner, mos 47,XXX[26]/45,X[4] (Figura 9).



**Figura 9** – Cariogramas, com bandas GTL, representativos das duas linhas celulares. **A** – Linha celular com o cariótipo 47,XXX, identificado em 26 metafases. **B** – Linha celular com o cariótipo 45,X, identificado em quatro metafases.

A síndrome de Turner é uma doença que afeta 1 em cada 2000 mulheres, causada pela haploinsuficiência dos genes pertencentes ao cromossoma X, devido à ausência total ou parcial de um dos cromossomas X. Uma das principais características fenotípicas apresentadas é a baixa estatura, sendo concordante com a indicação clínica deste caso. A baixa estatura poderá ser resultado da ausência de uma das cópias do gene *SHOX* (*short stature homeobox*), localizado na região distal do cromossoma Xp22.2. Este gene faz parte do grupo de genes que escapa à inativação do cromossoma X, pelo que a sua ausência tem impacto no fenótipo ([Gravholt, Viuff et al. 2019](#)).

Sendo um caso de mosaicismo, não é possível prever a extensão do fenótipo ao longo da vida desta bebé, visto que se desconhece a distribuição de cada linha celular, nos diferentes tecidos. No entanto, casos de mosaicos da síndrome de Turner apresentam um fenótipo mais ligeiro, comparativamente a mulheres com completa monossomia do X ([Gardner and Amor 2018](#)).

A síndrome de Turner pode resultar de vários mecanismos: completa monossomia do cromossoma X, diversos mosaicos (45,X/46,XX; 47,XXX,46,XX, etc), isocromossoma do braço p ou q do cromossoma X, cromossoma X em anel ou material genético do cromossoma Y ([Gravholt, Viuff et al. 2019](#)). O mosaico 47,XXX/45,X representa apenas 1,5% de todas as mulheres com síndrome de Turner, pelo que é uma ocorrência rara. Este mosaico poderá ter resultado pela não disjunção mitótica, logo após a formação de um zigoto 2n. Se a não disjunção tivesse ocorrido mais tarde no desenvolvimento, haveria uma terceira linha celular, 46,XX ([Gardner and Amor 2018](#), [Mavridi, Ntali et al. 2018](#)).

Já foram reportados casos de gravidezes em mulheres o mosaico 47,XXX/46,XX, porém, é rara a gravidez espontânea, devido à insuficiência ovárica prematura que estas mulheres apresentam ([Mavridi, Ntali et al. 2018](#)).

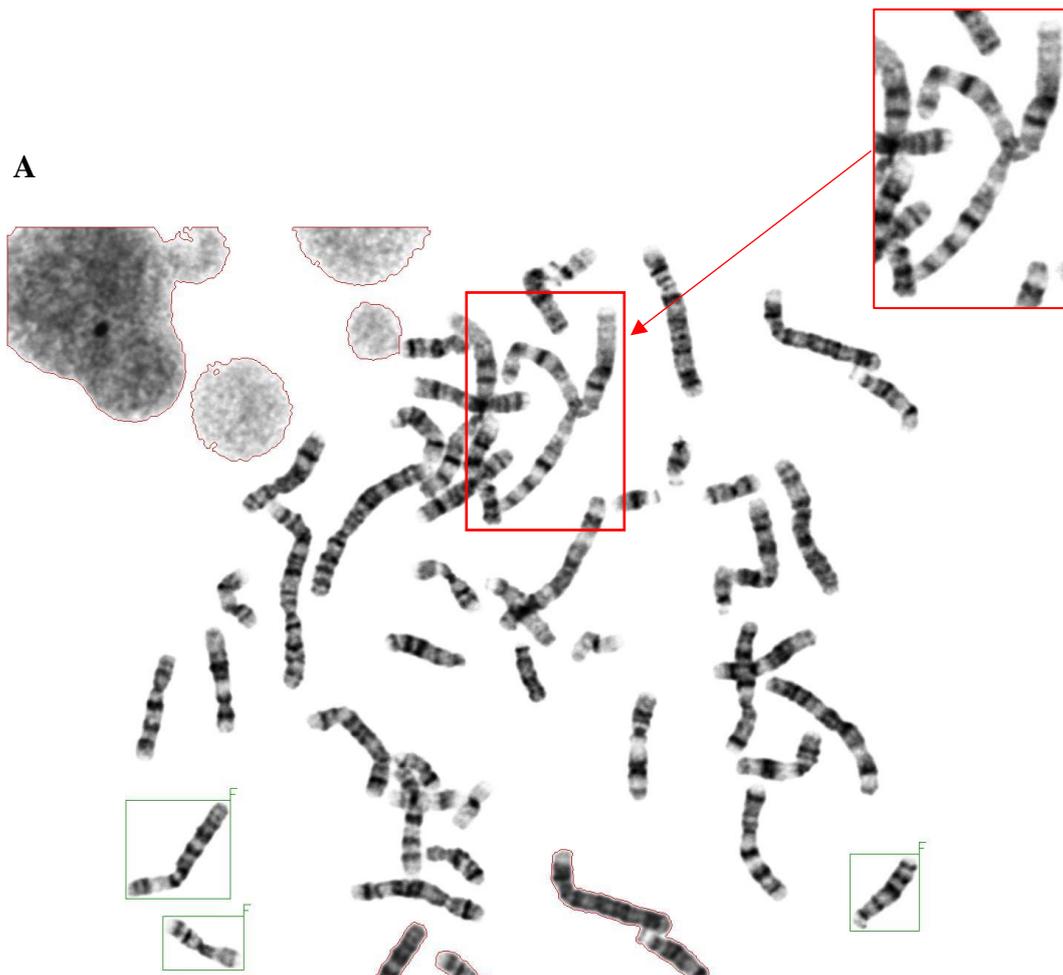
Este resultado, e as suas possíveis expressões fenotípicas futuras, deverão ser discutidas em consulta de aconselhamento genético.

### 4.3 Caso Clínico 3

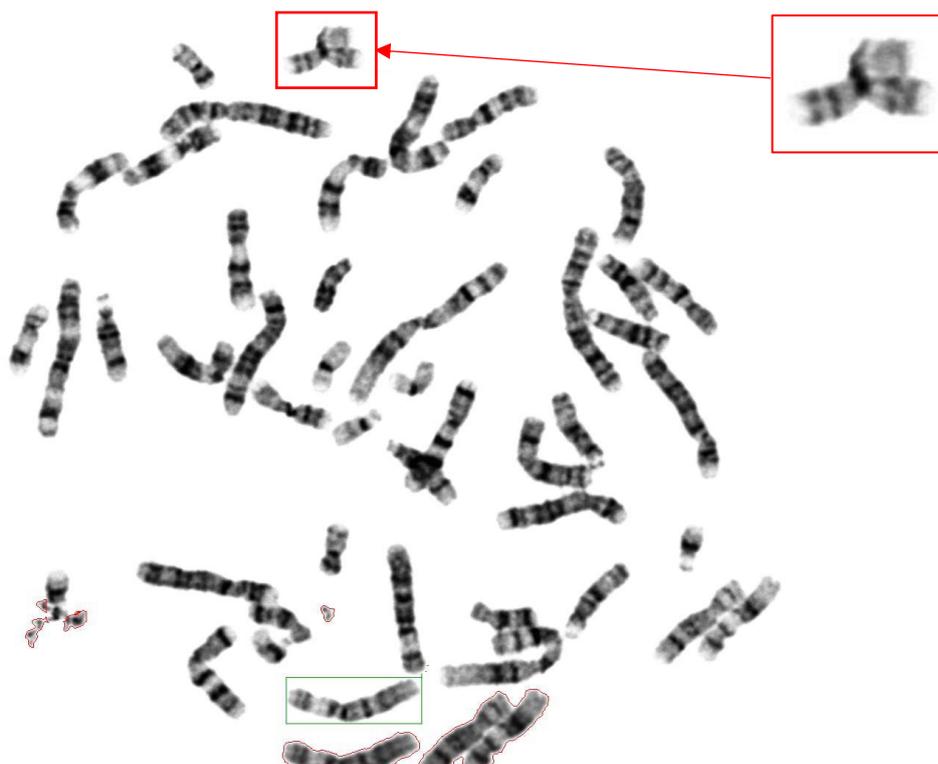
Adolescente de 15 anos, do sexo masculino, que apresenta baixa estatura e hipogonadismo.

Estudo ao exoma, realizado previamente, noutro laboratório externo, com recurso a um painel de genes ligados a imunodeficiências, obteve resultado negativo.

O estudo citogenético, realizado com recurso a cultura de linfócitos e análise das metafases obtidas, indicava um complemento cromossómico, sem alterações, de 46,XY, nas 50 células analisadas. Apesar de apresentar um cariótipo sem alterações, foram observadas aberrações cromossómicas, como se pode observar na Figura 10. Os cromossomas 1 e 16, por vezes, apresentavam configurações com múltiplos braços q. Este fenómeno está associado a uma síndrome caracterizada pela instabilidade cromossómica observada nas metafases, característica da síndrome ICF ([Gardner and Amor 2018](#)).



**B**



**Figure 10** – Metafasas, com bandas GTL, observadas ao microscópio ótico, onde é possível distinguir configurações de múltiplos braços longos **A** – do cromossoma 1 e **B** – do cromossoma 16.

A síndrome de ICF caracteriza-se fenotipicamente por imunodeficiência, atraso no crescimento e desenvolvimento e anomalias faciais. Uma das complicações mais frequentes são as infecções respiratórias recorrentes, que levam à hospitalização dos doentes ([Gardner and Amor 2018](#)). A baixa estatura e hipogonadismo apresentados por este adolescente são concordantes com o fenótipo, descrito bibliograficamente, de atraso no crescimento e desenvolvimento.

A nível citogenético, em cultura de linfócitos, as células apresentam instabilidade centromérica, mais frequentemente nos cromossomas 1e 16, como se verifica no caso em estudo, embora também se possa observar no cromossoma 9. Estes cromossomas possuem uma região pericêntrica composta por heterocromatina, que se torna instável devido à hipometilação dos satélites II e III, essenciais para a estrutura dos cromossomas ([Gardner and Amor 2018](#)).

Está descrito na literatura que o número de aberrações cromossômicas encontradas aumenta conforme o tempo de cultura aumenta e são predominantes em culturas de linfócitos, em comparação com outros tecidos ([Smeets, Moog et al. 1994](#)).

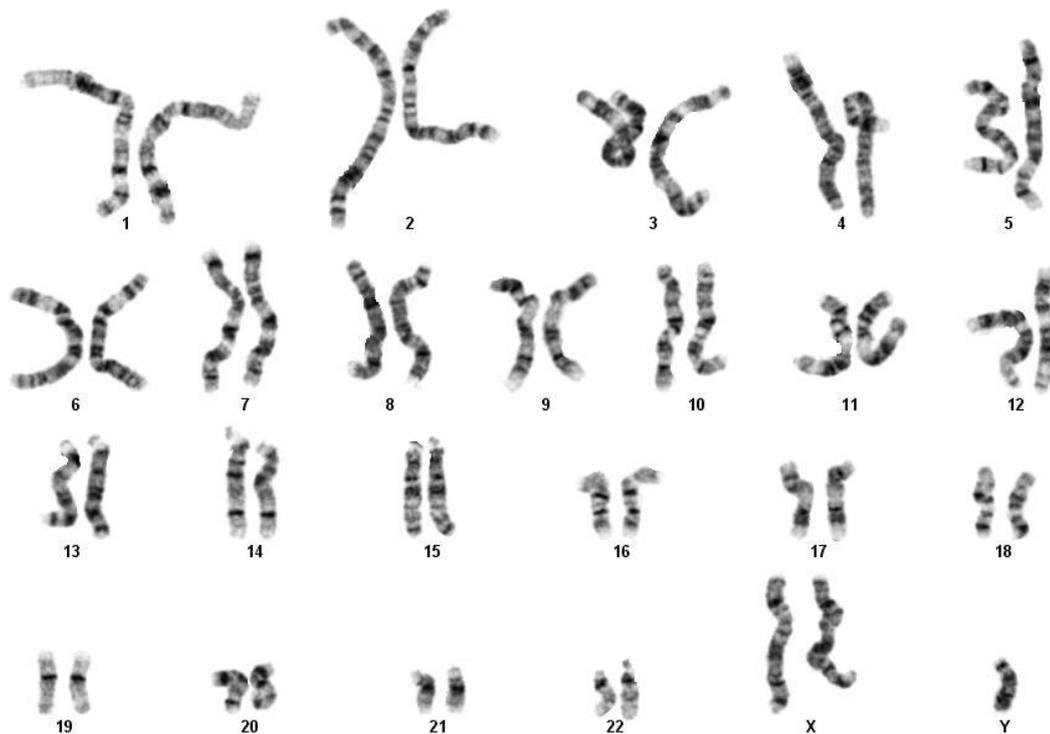
Neste caso clínico, foi possível verificar a importância do teste citogenético no diagnóstico de doenças genéticas, visto que apenas através do estudo dos cromossomas em metafase foi possível identificar uma característica típica da síndrome ICF, desta forma orientando para o diagnóstico correto.

Esta síndrome possui herança autossômica recessiva, onde os genes envolvidos são, predominantemente, a DNA-metiltransferase 3 beta ou o gene *ZBTB24*, pelo que os progenitores deverão seguir para uma consulta de aconselhamento genético ([Gardner and Amor 2018](#)).

#### 4.4 Caso Clínico 4

Adolescente de 14 anos, do sexo masculino, com suspeita da síndrome de Klinefelter, apresenta um tumor ósseo, para o qual já se encontra em tratamento no Hospital Pediátrico do CHUC.

A análise de metafases, obtidas a partir da cultura de linfócitos, permitiu a observação de um cromossoma X extra, em todas as células, levando ao resultado 47,XXY, associado à síndrome de Klinefelter (Figura 11).



**Figura 11** – Cariograma, com bandas GTL, representativo do caso clínico 4, com a presença de um cromossoma X extra, correspondente ao cariótipo 47,XXY.

A síndrome de Klinefelter é a doença cromossômica mais prevalente nos homens, estando presente em 1 a cada 650 recém-nascidos, do sexo masculino. Esta síndrome apresenta várias formas, sendo a mais comum a clássica 47,XXY, presente em 80-90% de todos os casos de síndrome de Klinefelter. Indivíduos com síndrome de Klinefelter expressam um fenótipo que engloba hipogonadismo, infertilidade, alta estatura, ginecomastia e uma

predisposição para cancro das células germinativas e cancro da mama, mais elevada do que a população geral ([Bonomi, Rochira et al. 2017](#), [Kanakis and Nieschlag 2018](#)). A suspeita levou ao estudo citogenético deste utente confirmando o diagnóstico de síndrome de Klinefelter. Apesar de estar descrita na literatura uma predisposição mais elevada para cancro das células germinativas e cancro da mama, a mesma associação não se verifica com tumores ósseos, pelo que esta característica clínica não deverá estar associada ao diagnóstico da síndrome de Klinefelter.

Este adolescente recebeu o seu diagnóstico aos 14 anos de idade, assim como 5% de todos os homens com síndrome de Klinefelter, que acabam por ser diagnosticados antes dos 20 anos de idade, devido a indicações clínicas de atrasos no desenvolvimento, problemas comportamentais, puberdade atrasada ou ginecomastia. Apenas 10% dos casos são detetados em diagnósticos pré-natal, 17% são diagnosticados em idade adulta, devido a problemas de fertilidade ou hipogonadismo, enquanto os restantes casos continuam sem diagnóstico ([Kanakis and Nieschlag 2018](#)).

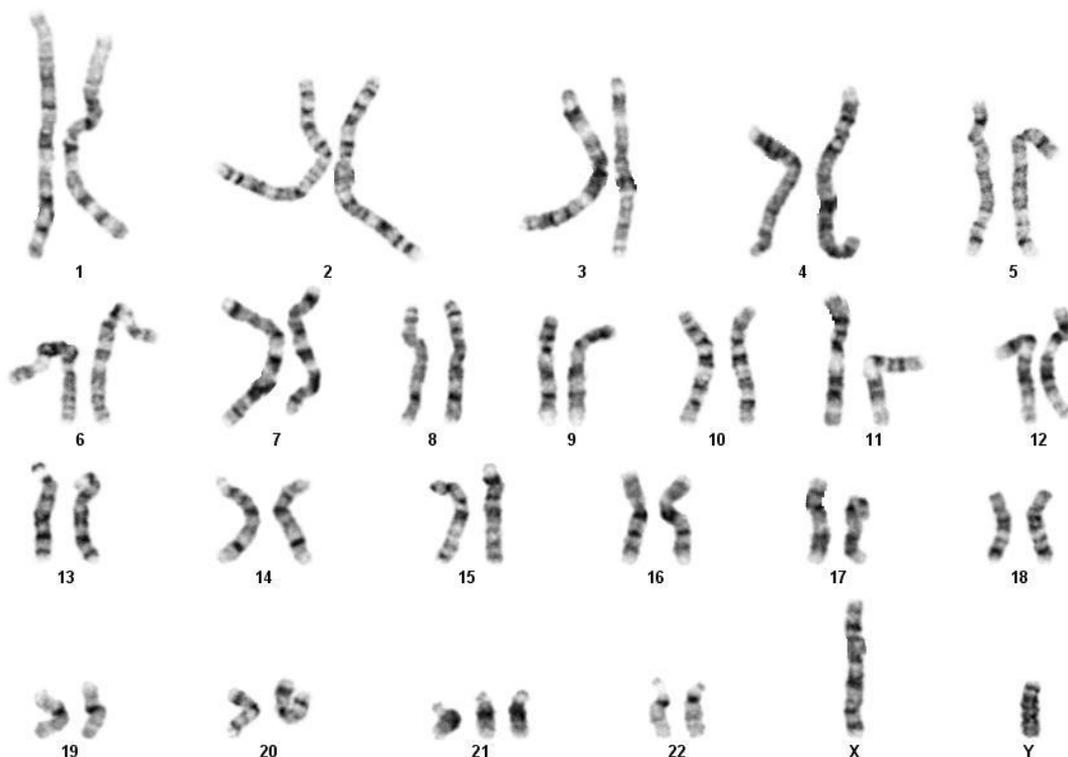
Esta aneuploidia tem origem na não disjunção meiótica dos cromossomas X, quer na primeira ou na segunda divisão, durante a gametogénese. Pensa-se que, o risco de recorrência não será mais elevado do que na população geral ([Visootsak and Graham 2006](#)). Todas as questões referidas deverão ser abordadas em consulta de aconselhamento genético.

## 4.5 Caso Clínico 5

Recém-nascido de 14 dias de vida, do sexo masculino.

Estudo anterior, em contexto de DPN, realizado pelo LCG-FMUC, detetou trissomia 21, uma aneuploidia associada à síndrome de Down.

A análise cromossômica revelou a presença de um cromossoma 21 extra, em todas as metafases observadas (Figura 12), 47,XY,+21.



**Figura 12** – Cariograma, com bandas GTL, representativo do caso clínico 5. Neste cariógrama é possível observar três cópias do cromossoma 21, correspondendo ao cariótipo 47,XY,+21.

Este resultado confirmou o diagnóstico previamente obtido por DPN de trissomia 21.

A síndrome de Down apresenta um quadro de dismorfismos faciais característicos, défice intelectual e diversos sistemas de órgãos afetados. É o estado trissômico que maior longevidade apresenta e pensa-se que a quantidade reduzida de genes no cromossoma 21 poderá justificar esse facto ([Gardner and Amor 2018](#)).

Existem diversas formas de trissomia 21, sendo que a mais comum é a trissomia 21 livre, como é o caso deste recém-nascido. As restantes formas podem ser variados mosaicos  $47,+21/46,N$  ou  $45,-21/46,N/47,+21$ , isocromossomas 21,  $46,i(21q)$  ou ainda resultados de translocações robertsonianas, como  $46,+21, der(14;21)$ , por exemplo ([Gardner and Amor 2018](#)). Através do estudo citogenético, é possível identificar a forma da trissomia 21, no indivíduo, e avaliar o risco de recorrência. A trissomia 21 livre corresponde a uma alteração *de novo*, com origem na não disjunção meiótica dos cromossomas 21, na primeira ou segunda divisão da gametogénese. A esta forma, está associado um risco de recorrência de 1%. Todas estas questões devem ser avaliadas numa consulta de aconselhamento genético, com os progenitores deste recém-nascido.

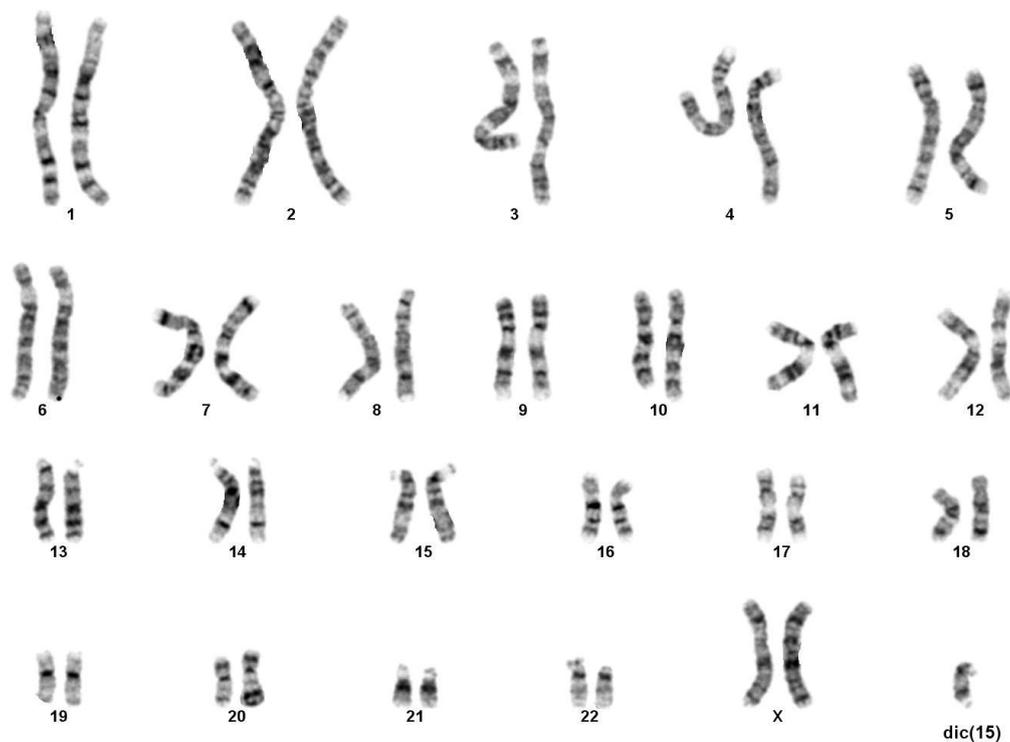
## 4.6 Caso Clínico 6

Criança de 2 anos de idade, do sexo feminino, apresentava um leque de sintomas clínicos, assim como atraso de desenvolvimento psicomotor (ADPM), microcefalia, epilepsia, dismorfismos e autismo.

Um estudo prévio por *array*-CGH, revelou uma triplicação da região 15q11q13, de cerca de 7.6Mb. Adicionalmente foi realizado um estudo por MS-MLPA, que identificou 4 cópias da região, sendo 3 delas de origem materna.

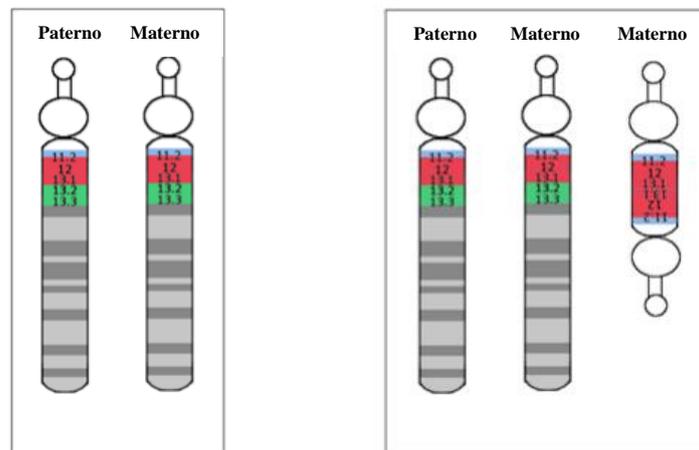
O estudo citogenético foi realizado para pesquisa da alteração estrutural que estaria na origem do desequilíbrio genómico.

A análise de metafases revelou um cromossoma marcador supranumerário, constituído por material genético do cromossoma 15. Trata-se de um marcador pseudo isodictêntrico, como se pode observar na Figura 13 e que estava presente em todas as células analisadas, 47,XX,+psu idic(15)(pter-q12::q12-pter).



**Figura 13** – Cariograma, com bandas GTL, representativo do caso clínico 6, com o cariótipo 47,XX,+psu idic(15)(pter-q12::q12-pter), onde é possível observar o marcador pseudo isodictêntrico supranumerário.

A região que se encontra em triplicação, originando tetrassomia para essa região do cromossoma 15, é a região crítica das síndromes de Prader-Willi e Angelman, de tal forma que o fenótipo varia consoante a origem da alteração cromossômica (materna ou paterna). Os estudos, previamente realizados, confirmaram a origem materna das 2 cópias extra da região do cromossoma 15 (Figura 14).



**Figura 14** – Representação gráfica da estrutura dos cromossomas 15, provenientes dos progenitores, e do marcador isodicêntrico do cromossoma 15, de origem materna. Adaptado de ([Lusk, Vogel-Farley et al. 1993](#)).

O fenótipo causado por esta anomalia cromossômica é composto por atraso no desenvolvimento psicomotor, défice intelectual, epilepsia e perturbações no espectro do autismo ([Gardner and Amor 2018](#)). Todas as indicações clínicas, da criança em estudo, estão de acordo com as características fenotípicas descritas na literatura.

A mãe da criança foi referenciada para estudo citogenético, de forma a averiguar a origem do cromossoma marcador, no entanto o seu cariótipo era normal, confirmando que esta alteração, na criança de 2 anos, é *de novo*.

A análise citogenética foi essencial, neste caso clínico, para entender o mecanismo de origem da tetrassomia e possíveis implicações futuras. Por essa razão, é necessário o acompanhamento com consultas de aconselhamento genético ([Battaglia 2008](#), [Gomes 2010](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

## 4.7 Caso Clínico 7

Criança de 11 anos de idade, do sexo feminino, apresentava desaceleração de crescimento e baixa estatura.

Após cultura de sincronizada de linfócitos e avaliação das metafases, com bandagem GTL, observou-se um isocromossoma do cromossoma X: 46,X,i(X)(q10).

Este isocromossoma, composto por duas cópias do braço longo do cromossoma X e deleção do braço curto, estava presente em todas as metafases analisadas (Figura 15).



**Figura 15** – Cariograma, com bandas GTL, representativo do caso clínico 7, com o cariótipo 46,X,i(X)(q10), onde é possível observar o isocromossoma Xq, destacado pela seta vermelha.

Devido à presença do isocromossoma X, estas células apresentam monossomia para o braço deletado (braço curto) e trissomia para o braço duplicado (braço longo). Associado a este genótipo está a síndrome de Turner, devido à deleção parcial do cromossoma X.

Cerca de 10-12% dos casos de síndrome de Turner são provocados por um isocromossoma do braço longo do cromossoma X ([Güzel Erdal and Balkan 2020](#)).

Como foi referido anteriormente, a baixa estatura é uma característica comum em mulheres com síndrome de Turner, devido à haploinsuficiência da região Xp22.2, que contem o gene *SHOX* ([Ranke and Saenger 2001](#)). O fenótipo desta criança está, portanto, de acordo com o descrito na literatura, visto que apresenta desaceleração de crescimento e baixa estatura.

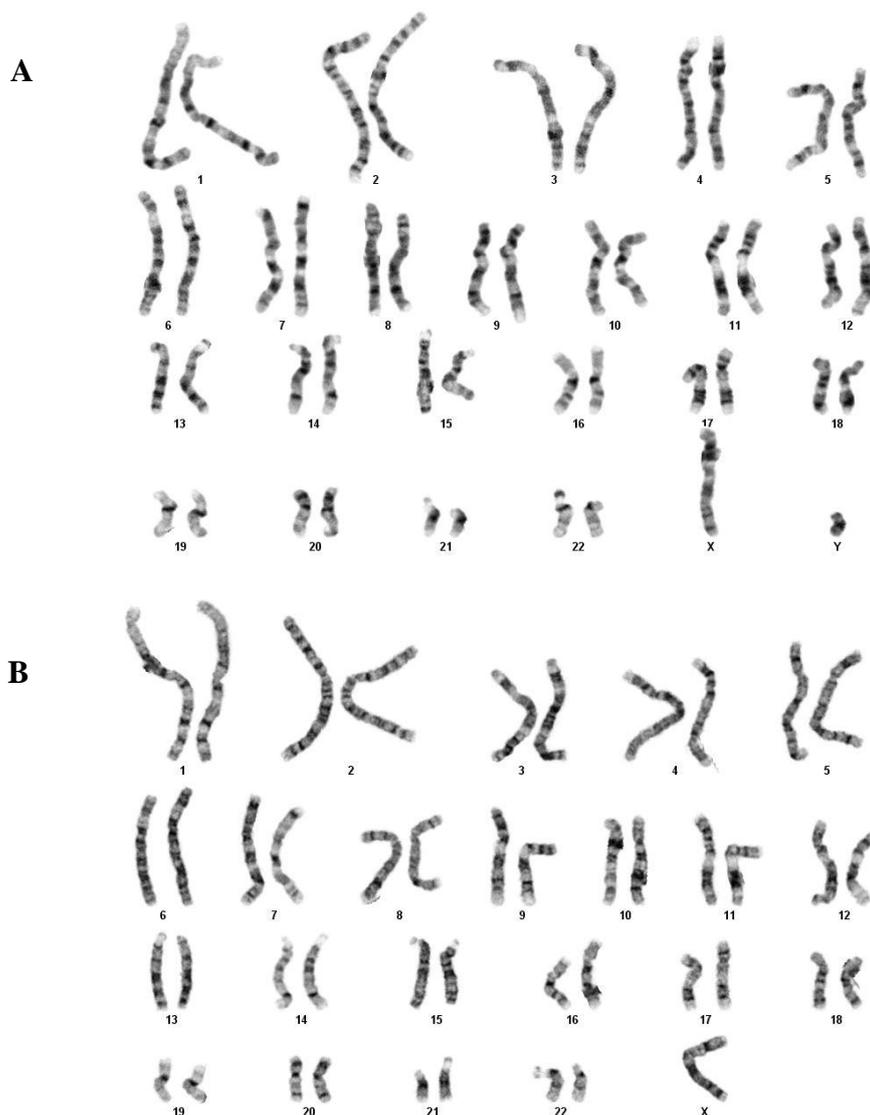
Este tipo de rearranjo cromossómico pode ser provocado por falha na divisão centromérica ou ainda por quebras nas cromátides irmãs e reunião das mesmas, numa região adjacente ao centrómero, sendo uma alteração cromossómica estrutural *de novo* ([Gardner and Amor 2018](#)).

O resultado do estudo citogenético, assim como as suas implicações deverão ser discutidas em consulta de aconselhamento genético.

## 4.8 Caso Clínico 8

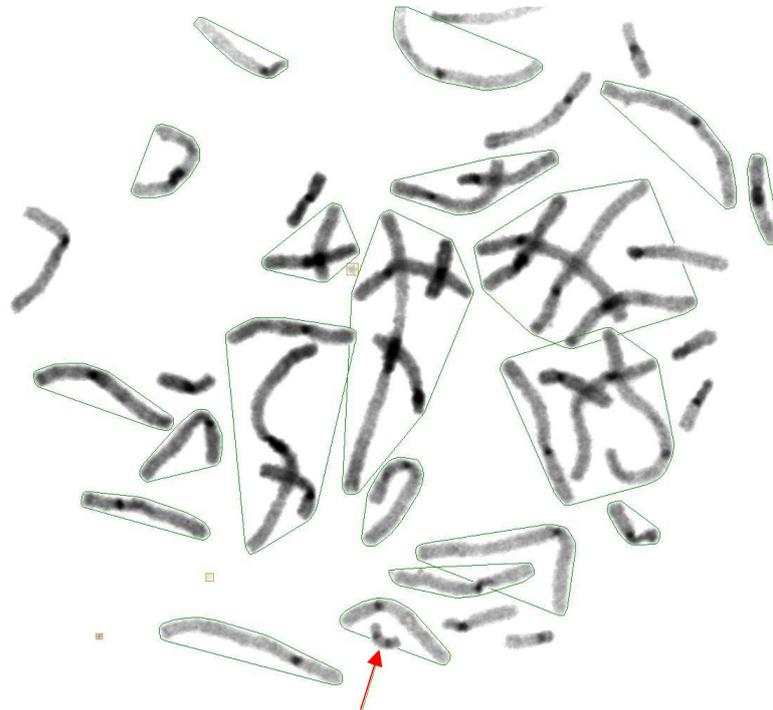
Criança de 8 anos de idade, do sexo feminino, com uma indicação clínica de suspeita de síndrome de Turner, sem estudos previamente realizados.

As metafases analisadas usando a bandagem GTL revelaram a presença de duas linhas celulares distintas. Uma das linhas celulares, com 46 cromossomas, apresentava um cromossoma Y de tamanho reduzido, presente em 18 metafases. A outra linha celular, apresentava monossomia do cromossoma X, em 12 células analisadas (Figura 16).



**Figura 16** – Cariogramas, com bandas GTL, representativos das duas linhas celulares encontradas na análise de metafases. **A** – Linha celular com o cromossoma Y de estrutura ambígua, identificado em 46 metafases. **B** – Linha celular com o cariótipo 45,X, identificado em 12 metafases.

De forma a averiguar o conteúdo genético do cromossoma de estrutura ambígua, foi feita a análise cromossômica, com recurso à bandagem CBG (Figura 17). Este método de bandagem marca a heterocromatina constitutiva, correspondendo às regiões centroméricas e às zonas polimórficas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y.

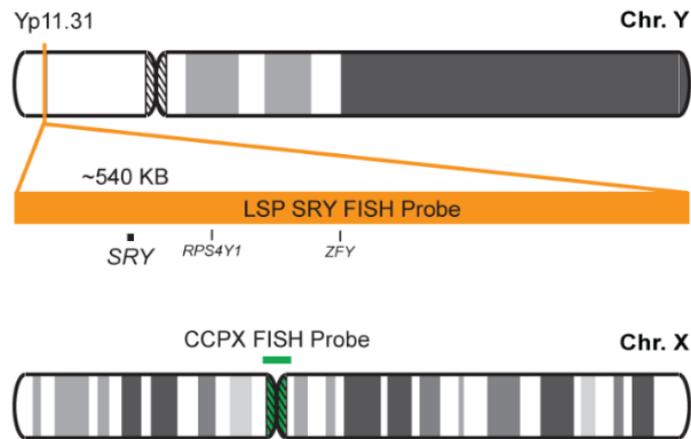


**Figura 17** – Metáfase representativa de uma das linhas celulares, do caso clínico 8, com coloração CBG, onde se destaca o cromossoma Y com dois centrómeros e sem região Yqh (seta vermelha).

A técnica de bandagem CBG confirmou a existência de dois centrómeros, tratando-se, então, de um cromossoma dicêntrico.

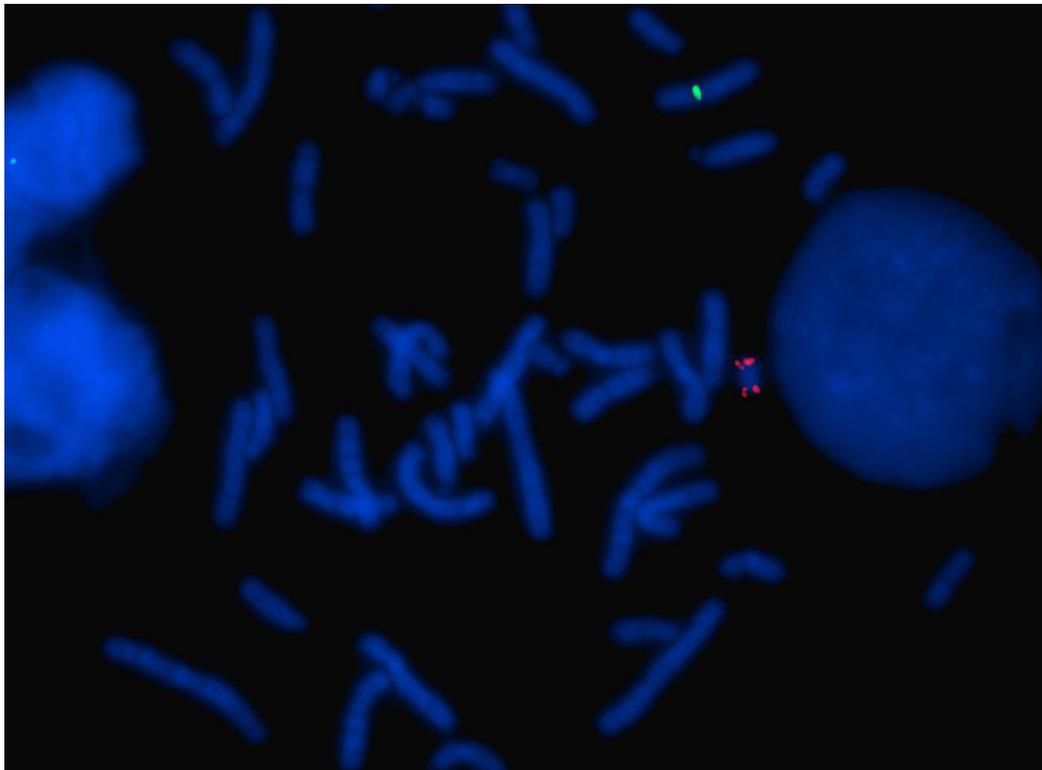
Devido à suspeita de se tratar de um cromossoma Y isodicêntrico, foi realizada a análise por FISH, com recurso a uma sonda controlo, que hibridiza com a região centromérica do cromossoma X (CCPX) e uma sonda que hibridiza com o gene *SRY*, presente no cromossoma Y (LSP *SRY*), de acordo com a Figura 18. Este kit de sondas da CytoTest® foi desenhado para detetar a presença do gene *SRY* e o número de cópias do cromossoma X, simultaneamente.

A análise de metafases de ambas as linhas celulares, por FISH, encontra-se representada nas Figuras 19 e 20.

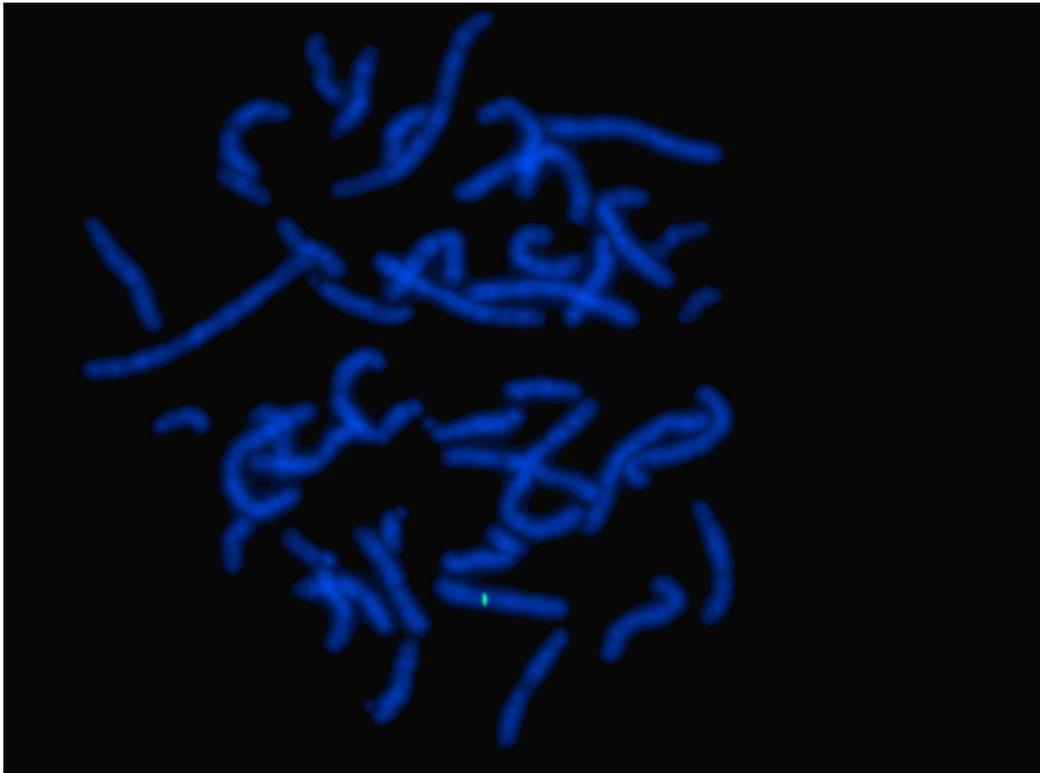


**Figura 18** – Representação gráfica da região de hibridização da sonda LSP *SRY*, que engloba o gene *SRY*, e da sonda controle CCPX, da CytoTest®.

Adaptado de [https://www.cytotest.com/uploadfiles/file/2015-10//SRY\\_CCPX\\_DS\\_V2015\\_03\\_01.pdf](https://www.cytotest.com/uploadfiles/file/2015-10//SRY_CCPX_DS_V2015_03_01.pdf).



**Figura 19** – Metafase da linha celular com o cromossoma idic(Y), observada ao microscópio de fluorescência, após análise por FISH do caso clínico 8. É possível verificar um sinal de hibridização da sonda controle CCPX, marcada a verde, e dois sinais da sonda LSP *SRY*, marcada a vermelho, confirmando a existência de duas cópias do gene *SRY* nesta metafase e apenas uma cópia do cromossoma X.



**Figura 20** – Metafase da linha celular 45,X, após análise por FISH, do caso clínico 8. É possível verificar apenas um sinal de hibridização da sonda controlo CCPX, marcada a verde. Não houve marcação da sonda referente ao gene *SRY*, pelo que é possível confirmar a sua ausência nesta metafase e apenas uma cópia do cromossoma X.

Os resultados obtidos pela análise por FISH confirmaram a presença de um isocromossoma Y, com duas cópias do gene *SRY* e, pela sua estrutura, de todo o braço curto Yp e possivelmente parte do braço longo nessa linha celular.

Concluiu-se que esta criança é portadora de mosaicismos dos cromossomas sexuais, com o cariótipo: mos 46,X, idic(Y)(q11.2)[18]/45,X[12]. ish idic(Y)(*SRY*++).

Esta condição, de mosaicismos dos cromossomas sexuais, que ocorre cerca de 1,7 vezes a cada 10.000 nascimentos, já foi descrita múltiplas vezes na literatura e está associado a três fenótipos diferentes: indivíduos com genitais femininos, associado a síndrome de Turner; indivíduos com genitais masculinos, o mais comum, mas menos estudado; e indivíduos com genitais ambíguos, caracterizados por disgenesia gonadal ([Guzewicz, Howell et al. 2021](#)). Por esta razão, a apresentação fenotípica varia muito entre indivíduos, o que complica o aconselhamento genético pré-natal, devido à imprevisibilidade da expressão fenotípica. Vários estudos indicam que não há correlação entre o fenótipo e o

cariótipo ou nível de mosaicismo ([Chang, Clark et al. 1990](#), [Telvi, Lebbar et al. 1999](#), [Guzewicz, Howell et al. 2021](#)).

Neste caso, a menina de 8 anos apresentava genitais femininos, pelo que a indicação clínica incidiu na suspeita de síndrome de Turner, concordante com o que é descrito na literatura. Associado a casos de mosaico de síndrome de Turner, com material genético do cromossoma Y, está o risco aumentado de gonadoblastoma, pelo que deverá ser avaliada a necessidade de remover as gonadas disgenéticas ([De Arce, Costigan et al. 1992](#), [Telvi, Lebbar et al. 1999](#), [Gardner and Amor 2018](#)).

Este resultado deverá ser discutido e as implicações fenotípicas e reprodutivas deverão ser abordadas em consulta de aconselhamento genético.

## **Capítulo V – Considerações finais**



O estágio curricular, decorrido no ano letivo 2022/2023, no Laboratório de Citogenética do Hospital Pediátrico de Coimbra, permitiu o desenvolvimento de competências a nível da rotina laboratorial e interpretação de resultados na área da citogenética pós-natal.

Foi acompanhado o processo desde a cultura dos linfócitos, de sangue periférico, até à sincronização do ciclo celular e manipulação das células, observação ao microscópio e análise cromossómica.

A citogenética permite a observação dos cromossomas, assim como a identificação de alterações cromossómicas estruturais equilibradas e mosaicismos de baixa expressão, que de outra forma não seriam detetados usando métodos de maior resolução, como o *array*-CGH ou o MLPA. Para além de ser capaz de identificar essas alterações, deteta também outros rearranjos estruturais e numéricos, até ao nível de resolução de 3-5Mb, a um baixo custo.

Apesar da citogenética convencional não ser o teste de primeira linha, nos casos de perturbações do desenvolvimento das crianças e adolescentes, esta técnica demonstra ser indispensável na caracterização da alteração envolvida. Com uma caracterização completa das alterações genéticas que o indivíduo apresenta, é possível avaliar riscos de recorrência, assim como fornecer aconselhamento genético direcionado, para gerações futuras.

Diversas indicações clínicas alertam para a necessidade de realizar um estudo citogenético, em contexto pós-natal: amenorreia primária/secundária, perturbações no crescimento (baixa estatura, crescimento excessivo), ambiguidade sexual, fenótipo anormal ou dismorfismos, anomalias congénitas, atraso do desenvolvimento ou défice intelectual, suspeita de síndrome de deleção/ duplicação ou características clínicas indicativas de síndrome associada a alteração cromossómica.

Dos casos analisados ao longo do ano letivo, a “baixa estatura” foi uma das indicações clínicas mais frequentes. Isto deve-se ao facto de ser uma característica comum em mulheres com síndrome de Turner, pelo que este teste se tornou o teste de primeira linha para diagnóstico da síndrome.

Os casos clínicos discutidos incluíram alterações cromossómicas numéricas (síndrome de Down, Turner e Klinefelter), assim como alterações cromossómicas estruturais (deleções, marcadores isodicêntricos e isocromossomas) e figuras cromossómicas aberrantes, associadas à síndrome ICF. Através do estudo dos casos clínicos apresentados, foi possível perceber a importância da complementaridade das diferentes técnicas de

diagnóstico, permitindo a aplicação dos tratamentos adequados aos utentes, assim como o seu correto seguimento.

Apesar de surgirem técnicas de diagnóstico cada vez mais abrangentes, automatizadas e com maior poder de resolução, a citogenética convencional, assim como a citogenética molecular (FISH) continuam a ter uma importância inegável, tanto no diagnóstico pré-natal, como no diagnóstico pós-natal, em casos de anomalias congénitas, défices intelectuais, suspeitas de mosaicismo e atrasos no desenvolvimento de crianças e adolescentes.

## **Capítulo VI – Referências**



(1960). "A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes." Eugen Rev **52**(2): 87-90.

Ababou, M. (2021). "Bloom syndrome and the underlying causes of genetic instability." Mol Genet Metab **133**(1): 35-48.

Amirifar, P., M. R. Ranjouri, R. Yazdani, H. Abolhassani and A. Aghamohammadi (2019). "Ataxia-telangiectasia: A review of clinical features and molecular pathology." Pediatr Allergy Immunol **30**(3): 277-288.

Argente, J., K. Tatton-Brown, D. Lehwalder and R. Pfaffle (2019). "Genetics of Growth Disorders-Which Patients Require Genetic Testing?" Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 602.

Arora, H., A. H. Chacon, S. Choudhary, M. P. McLeod, L. Meshkov, K. Nouri and J. Izakovic (2014). "Bloom syndrome." Int J Dermatol **53**(7): 798-802.

Ballif, B. C., E. A. Rorem, K. Sundin, M. Lincicum, S. Gaskin, J. Coppinger, C. D. Kashork, L. G. Shaffer and B. A. Bejjani (2006). "Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens." Am J Med Genet A **140**(24): 2757-2767.

Bardsley, M. Z., K. Kowal, C. Levy, A. Gosek, N. Ayari, N. Tartaglia, N. Lahlou, B. Winder, S. Grimes and J. L. Ross (2013). "47,XYX syndrome: clinical phenotype and timing of ascertainment." J Pediatr **163**(4): 1085-1094.

Barr, M. L. and E. G. Bertram (1949). "A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis." Nature **163**(4148): 676-677.

Barstow, C. and C. Rerucha (2015). "Evaluation of Short and Tall Stature in Children." Am Fam Physician **92**(1): 43-50.

Battaglia, A. (2008). "The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q)." Orphanet J Rare Dis **3**: 30.

Benet, J., M. Oliver-Bonet, P. Cifuentes, C. Templado and J. Navarro (2005). "Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review." Cytogenet Genome Res **111**(3-4): 281-290.

Bonomi, M., V. Rochira, D. Pasquali, G. Balercia, E. A. Jannini, A. Ferlin and N. G. Klinefelter Italia (2017). "Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism." J Endocrinol Invest **40**(2): 123-134.

Bursted, B., M. Zamariolli, F. T. Bellucco and M. I. Melaragno (2022). "Mechanisms of structural chromosomal rearrangement formation." Mol Cytogenet **15**(1): 23.

Chang, H. J., R. D. Clark and H. Bachman (1990). "The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases." Am J Hum Genet **46**(1): 156-167.

- Chen, C. P. (2012). "Prenatal findings and the genetic diagnosis of fetal overgrowth disorders: Simpson-Golabi-Behmel syndrome, Sotos syndrome, and Beckwith-Wiedemann syndrome." Taiwan J Obstet Gynecol **51**(2): 186-191.
- Cheung, S. W. and W. Bi (2018). "Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics." Expert Rev Mol Diagn **18**(6): 531-542.
- Chrzanowska, K. H., H. Gregorek, B. Dembowska-Baginska, M. A. Kalina and M. Digweed (2012). "Nijmegen breakage syndrome (NBS)." Orphanet J Rare Dis **7**: 13.
- Cook, C. B., L. Armstrong, C. F. Boerkoel, L. A. Clarke, C. du Souich, M. K. Demos, W. T. Gibson, H. Gill, E. Lopez, M. S. Patel, K. Selby, Z. Abu-Sharar, A. M. Elliott and J. M. Friedman (2021). "Somatic mosaicism detected by genome-wide sequencing in 500 parent-child trios with suspected genetic disease: clinical and genetic counseling implications." Cold Spring Harb Mol Case Stud **7**(6).
- De Arce, M. A., C. Costigan, J. R. Gosden, M. Lawler and P. Humphries (1992). "Further evidence consistent with Yqh as an indicator of risk of gonadal blastoma in Y-bearing mosaic Turner syndrome." Clin Genet **41**(1): 28-32.
- de Ravel, T. J., K. Devriendt, J. P. Fryns and J. R. Vermeesch (2007). "What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH)." Eur J Pediatr **166**(7): 637-643.
- Ferguson-Smith, M. A. (2008). "Cytogenetics and the evolution of medical genetics." Genetics in Medicine **10**(8): 553-559.
- Ferguson-Smith, M. A. (2015). "History and evolution of cytogenetics." Molecular Cytogenetics **8**(1): 19.
- Frimberger, D. and J. P. Gearhart (2005). "Ambiguous genitalia and intersex." Urol Int **75**(4): 291-297.
- Fu, X., Y. Shi, J. Ma, K. Zhang, G. Wang, G. Li, L. Xiao and H. Wang (2022). "Advances of multiplex ligation-dependent probe amplification technology in molecular diagnostics." Biotechniques.
- Gardner, R. J. M. and D. J. Amor (2018). Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling, Oxford University Press.
- German, J. (1993). "Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease." Medicine (Baltimore) **72**(6): 393-406.
- German, J., L. P. Crippa and D. Bloom (1974). "Bloom's syndrome. III. Analysis of the chromosome aberration characteristic of this disorder." Chromosoma **48**(4): 361-366.
- Gomes, S., Almeida, Joana, Ferrão, José, Matoso, Eunice, Carreira, Isabel M., Oliveira, Guiomar (2010). "Patologia do neurodesenvolvimento por anomalia cromossômica da região

crítica do cromossoma 15 (q11-q13) - relação genótipo-fenótipo." Acta Pediatr Port 2010;41(2):92-97.

Gozzetti, A. and M. M. Le Beau (2000). "Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations." Semin Hematol **37**(4): 320-333.

Gravholt, C. H., M. H. Viuff, S. Brun, K. Stochholm and N. H. Andersen (2019). "Turner syndrome: mechanisms and management." Nat Rev Endocrinol **15**(10): 601-614.

Grunauer, M. and A. A. L. Jorge (2018). "Genetic short stature." Growth Horm IGF Res **38**: 29-33.

Gu, S., P. Szafranski, Z. C. Akdemir, B. Yuan, M. L. Cooper, M. A. Magrina, C. A. Bacino, S. R. Lalani, A. M. Breman, J. L. Smith, A. Patel, R. H. Song, W. Bi, S. W. Cheung, C. M. Carvalho, P. Stankiewicz and J. R. Lupski (2016). "Mechanisms for Complex Chromosomal Insertions." PLoS Genet **12**(11): e1006446.

Güzel Erdal, G. and M. Balkan (2020). "Turner Syndrome with Isochromosome Xq." J Pediatr Genet **9**(4): 243-245.

Guzewicz, L., S. Howell, C. E. Crerand, H. Umbaugh, N. J. Nokoff, J. Barker and S. M. Davis (2021). "Clinical phenotype and management of individuals with mosaic monosomy X with Y chromosome material stratified by genital phenotype." Am J Med Genet A **185**(5): 1437-1447.

HSU, T. C. (1952). "MAMMALIAN CHROMOSOMES IN VITRO: I. The Karyotype of Man." Journal of Heredity **43**(4): 167-172.

ISCN (2020). ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020), S.Karger AG.

Izatt, L. (2012). Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling: Fourth Edition. Clin Med (Lond), © 2012 Royal College of Physicians. **12**: 297.

Jackson, M., L. Marks, G. H. W. May and Joanna B. Wilson (2018). "The genetic basis of disease." Essays in Biochemistry **62**(5): 643-723.

Kanakis, G. A. and E. Nieschlag (2018). "Klinefelter syndrome: more than hypogonadism." Metabolism **86**: 135-144.

Kannan, T. P. and B. A. Zilfalil (2009). "Cytogenetics: past, present and future." Malays J Med Sci **16**(2): 4-9.

Kearney, L. (2001). "Molecular cytogenetics." Best Pract Res Clin Haematol **14**(3): 645-669.

Kim, I. W., A. C. Khadilkar, E. Y. Ko and E. S. Sabanegh, Jr. (2013). "47,XYX Syndrome and Male Infertility." Rev Urol **15**(4): 188-196.

Kojis, T. L., R. A. Gatti and R. S. Sparkes (1991). "The cytogenetics of ataxia telangiectasia." Cancer Genet Cytogenet **56**(2): 143-156.

Koretzky, G. A. (2007). "The legacy of the Philadelphia chromosome." J Clin Invest **117**(8): 2030-2032.

Lanfranco, F., A. Kamischke, M. Zitzmann and E. Nieschlag (2004). "Klinefelter's syndrome." Lancet **364**(9430): 273-283.

Lejeune, J., Gautier, M. and Turpin, R (1959). "Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens." Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences (Paris) **248**, **1721-1722**.

Leung, A. K. and W. L. Robson (1995). "Evaluating tall children." Can Fam Physician **41**: 457-458, 461-452, 465-458.

Lu, W., Y. Zhang, D. Liu, Z. Songyang and M. Wan (2013). "Telomeres-structure, function, and regulation." Exp Cell Res **319**(2): 133-141.

Lusk, L., V. Vogel-Farley, C. DiStefano and S. Jeste (1993). Maternal 15q Duplication Syndrome. GeneReviews(®). M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon et al. Seattle (WA), University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2023, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.

Lyon, M. F. (2003). "The Lyon and the LINE hypothesis." Semin Cell Dev Biol **14**(6): 313-318.

Manor, J. and S. R. Lalani (2020). "Overgrowth Syndromes-Evaluation, Diagnosis, and Management." Front Pediatr **8**: 574857.

Margolis, S. S., G. L. Sell, M. A. Zbinden and L. M. Bird (2015). "Angelman Syndrome." Neurotherapeutics **12**(3): 641-650.

Mavridi, A., G. Ntali, M. Theodora, K. Stamatelopoulos and L. Michala (2018). "A Spontaneous Pregnancy in a Patient with Turner Syndrome with 45,X/47,XXX Mosaicism: A Case Report and Review of the Literature." Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology **31**(6): 651-654.

Meler, E., S. Sisterna and A. Borrell (2020). "Genetic syndromes associated with isolated fetal growth restriction." Prenat Diagn **40**(4): 432-446.

Moog, U., U. Felbor, C. Has and B. Zirn (2020). "Disorders Caused by Genetic Mosaicism." Dtsch Arztebl Int **116**(8): 119-125.

Morgan, T. (2007). "Turner syndrome: diagnosis and management." Am Fam Physician **76**(3): 405-410.

Mulley, J. C. and H. C. Mefford (2011). "Epilepsy and the new cytogenetics." Epilepsia **52**(3): 423-432.

Muzzey, D., E. A. Evans and C. Lieber (2015). "Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling." Curr Genet Med Rep **3**(4): 158-165.

- Nowell, C. (1962). "The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia." Blut: Zeitschrift für die Gesamte Blutforschung **8**(2): 65-66.
- Otter, M., C. T. Schrandt-Stumpel and L. M. Curfs (2010). "Triple X syndrome: a review of the literature." Eur J Hum Genet **18**(3): 265-271.
- Painter, T. S. (1923). "Studies in mammalian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man." Journal of Experimental Zoology **37**(3): 291-336.
- Polani, P. E. (1997). "Human and Clinical Cytogenetics: Origins, Evolution and Impact." European Journal of Human Genetics **5**(3): 117-128.
- Qing, L., Y. Xia, Y. Zheng and X. Zeng (2012). "A de novo case of floating chromosomal polymorphisms by translocation in *Quasipaa boulengeri* (Anura, Dicroglossidae)." PLoS One **7**(10): e46163.
- Ranke, M. B. and P. Saenger (2001). "Turner's syndrome." The Lancet **358**(9278): 309-314.
- Riegel, M. (2014). "Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides." Genet Mol Biol **37**(1 Suppl): 194-209.
- Robert Nussbaum, R. M., Huntington Willard (2015). Thompson & Thompson Genetics in Medicine, Elsevier.
- Rothblum-Oviatt, C., J. Wright, M. A. Lefton-Greif, S. A. McGrath-Morrow, T. O. Crawford and H. M. Lederman (2016). "Ataxia telangiectasia: a review." Orphanet J Rare Dis **11**(1): 159.
- Silva, M., N. de Leeuw, K. Mann, H. Schuring-Blom, S. Morgan, D. Giardino, K. Rack and R. Hastings (2019). "European guidelines for constitutional cytogenomic analysis." Eur J Hum Genet **27**(1): 1-16.
- Singh, R., R. J. Gardner, K. M. Crossland, I. E. Scheffer and S. F. Berkovic (2002). "Chromosomal abnormalities and epilepsy: a review for clinicians and gene hunters." Epilepsia **43**(2): 127-140.
- Smeets, D. F., U. Moog, C. M. Weemaes, G. Vaes-Peeters, G. F. Merckx, J. P. Niehof and G. Hamers (1994). "ICF syndrome: a new case and review of the literature." Hum Genet **94**(3): 240-246.
- Sotos, J. F. (1997). "Genetic disorders associated with overgrowth." Clin Pediatr (Phila) **36**(1): 39-49.
- Spinner, N. B. and L. K. Conlin (2014). "Mosaicism and clinical genetics." Am J Med Genet C Semin Med Genet **166C**(4): 397-405.
- Stambough, K., L. Magistrado and G. Perez-Milicua (2019). "Evaluation of ambiguous genitalia." Curr Opin Obstet Gynecol **31**(5): 303-308.

Steven L. Gersen, M. B. K. (2013). The Principles of Clinical Cytogenetics, Springer New York, NY.

Stuppia, L., I. Antonucci, G. Palka and V. Gatta (2012). "Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases." Int J Mol Sci **13**(3): 3245-3276.

Tartaglia, N. R., S. Howell, A. Sutherland, R. Wilson and L. Wilson (2010). "A review of trisomy X (47,XXX)." Orphanet J Rare Dis **5**: 8.

Taylor, A. M. R., C. Rothblum-Oviatt, N. A. Ellis, I. D. Hickson, S. Meyer, T. O. Crawford, A. Smogorzewska, B. Pietrucha, C. Weemaes and G. S. Stewart (2019). "Chromosome instability syndromes." Nat Rev Dis Primers **5**(1): 64.

Telvi, L., A. Lebbar, O. Del Pino, J. P. Barbet and J. L. Chaussain (1999). "45,X/46,XY mosaicism: report of 27 cases." Pediatrics **104**(2 Pt 1): 304-308.

Thorpe, J., I. A. Osei-Owusu, B. E. Avigdor, R. Tupler and J. Pevsner (2020). "Mosaicism in Human Health and Disease." Annu Rev Genet **54**: 487-510.

Tischkowitz, M. D. and S. V. Hodgson (2003). "Fanconi anaemia." J Med Genet **40**(1): 1-10.

TJIO, J. H. and A. LEVAN (1956). "THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN." Hereditas **42**(1-2): 1-6.

Tzetzis, M., S. Kitsiou-Tzeli, H. Frysira, A. Xaidara and E. Kanavakis (2012). "The clinical utility of molecular karyotyping using high-resolution array-comparative genomic hybridization." Expert Rev Mol Diagn **12**(5): 449-457.

Van Buggenhout, G. and J. P. Fryns (2009). "Angelman syndrome (AS, MIM 105830)." Eur J Hum Genet **17**(11): 1367-1373.

Van Den Berg, D. J. and U. Francke (1993). "Roberts syndrome: a review of 100 cases and a new rating system for severity." Am J Med Genet **47**(7): 1104-1123.

Visootsak, J. and J. M. Graham, Jr. (2006). "Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies." Orphanet J Rare Dis **1**: 42.

Wijmenga, C., R. S. Hansen, G. Gimelli, E. J. Bjorck, E. G. Davies, D. Valentine, B. H. Belohradsky, J. J. van Dongen, D. F. Smeets, L. P. van den Heuvel, J. A. Luyten, E. Strengman, C. Weemaes and P. L. Pearson (2000). "Genetic variation in ICF syndrome: evidence for genetic heterogeneity." Hum Mutat **16**(6): 509-517.

Wilch, E. S. and C. C. Morton (2018). "Historical and Clinical Perspectives on Chromosomal Translocations." Adv Exp Med Biol **1044**: 1-14.

Witchel, S. F. (2018). "Disorders of sex development." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **48**: 90-102.

Yadav, S. and A. Dabas (2015). "Approach to short stature." Indian J Pediatr **82**(5): 462-470.

Yatsenko, S. A., C. A. Shaw, Z. Ou, A. N. Pursley, A. Patel, W. Bi, S. W. Cheung, J. R. Lupski, A. C. Chinault and A. L. Beaudet (2009). "Microarray-based comparative genomic hybridization using sex-matched reference DNA provides greater sensitivity for detection of sex chromosome imbalances than array-comparative genomic hybridization with sex-mismatched reference DNA." J Mol Diagn **11**(3): 226-237.

Yin, Y., C. Butler and Q. Zhang (2021). "Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory." Hum Immunol **82**(11): 812-819.

Yohe, S. and B. Thyagarajan (2017). "Review of Clinical Next-Generation Sequencing." Arch Pathol Lab Med **141**(11): 1544-1557.