

CARIÓTIPO

FISH

ARRAY CGH

Mirian Yumie Nishi

Pesquisadora Científica

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42

Hospital das Clínicas da FMUSP

E-mail minishi@usp.br

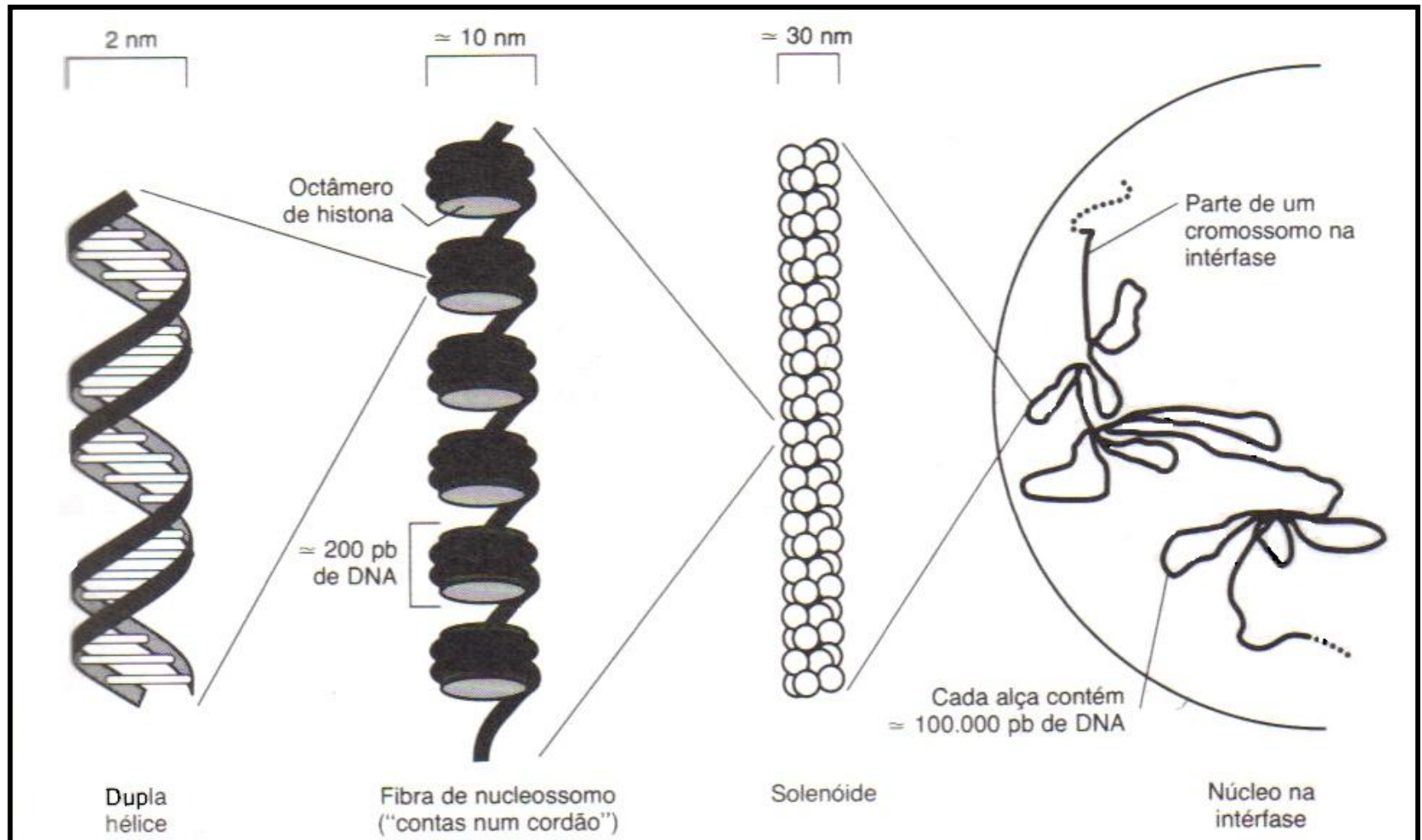
CITOGENÉTICA

- **Análise dos cromossomos (n° , estrutura):
determinação do cariótipo**

CARIÓTIPO

- **Constituição cromossômica do indivíduo**
- **$2n = 46$ cromossomos (Tijo e Levan, 1956)**

Estrutura do Cromossomo



Técnica de Obtenção de Cromossomos

Cultura de Células

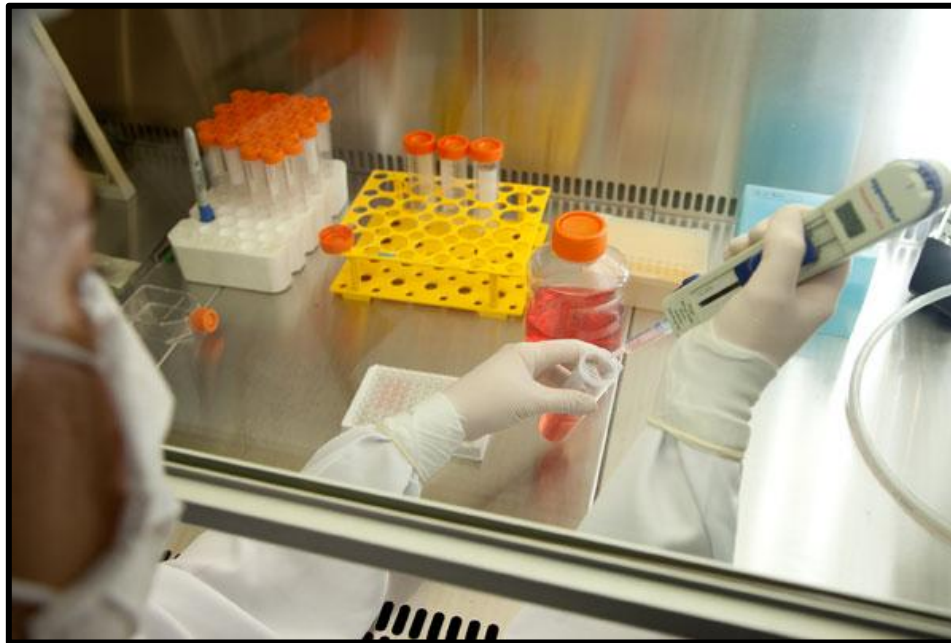
- **Coleta de Sangue periférico:**
Tubo ou seringa estéril com heparina



- **Linfócitos de sangue periférico**

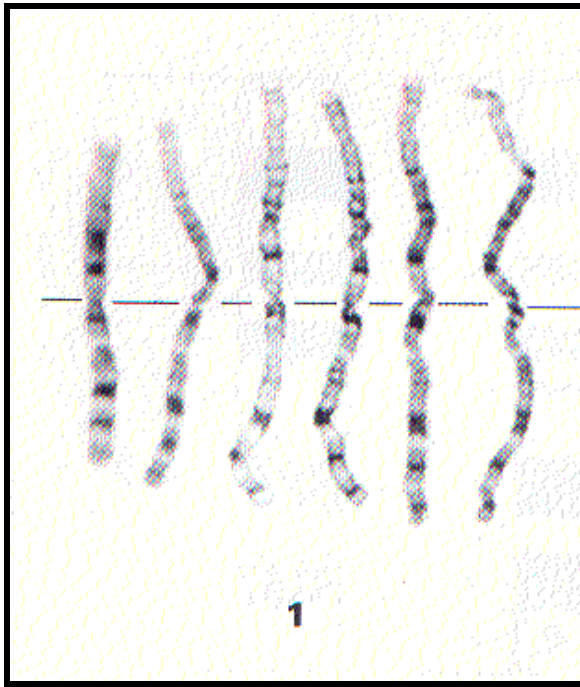
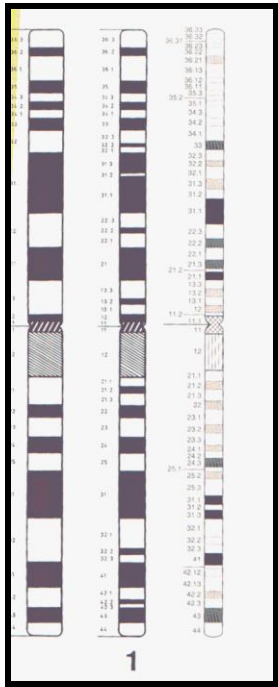
Cultura de células 72 h (RPMI, SFB, PHA-P)

**Bloqueio da divisão celular em metáfase
(colchicina)**



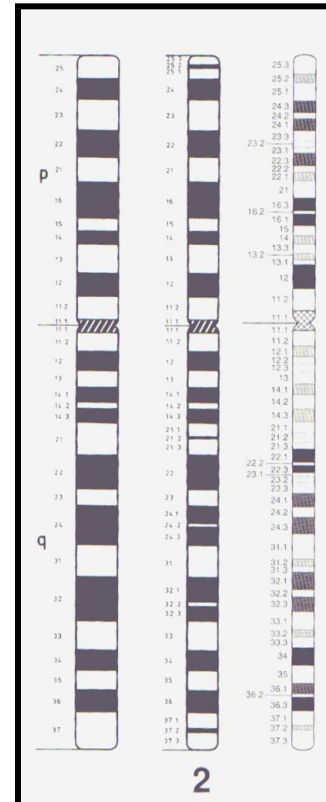
BANDAMENTO CROMOSSÔMICO

Histórico: início dos anos 70 - banda Q

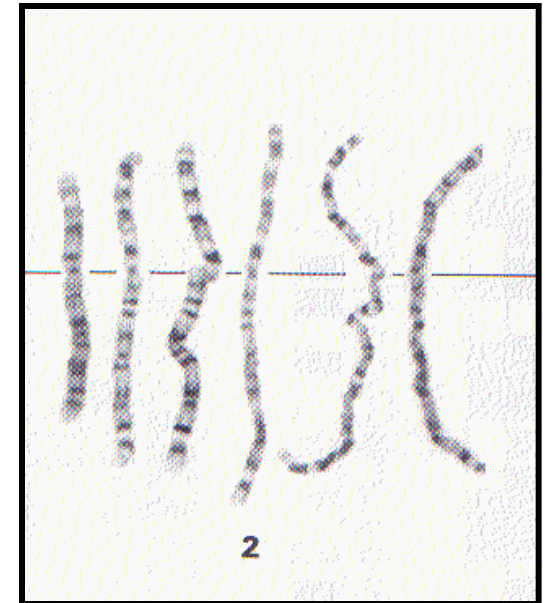


CROMOSSOMO 1

**Padrão de bandas
claras e escuras que
permitiu a
identificação de cada
cromossomo**



CROMOSSOMO 2

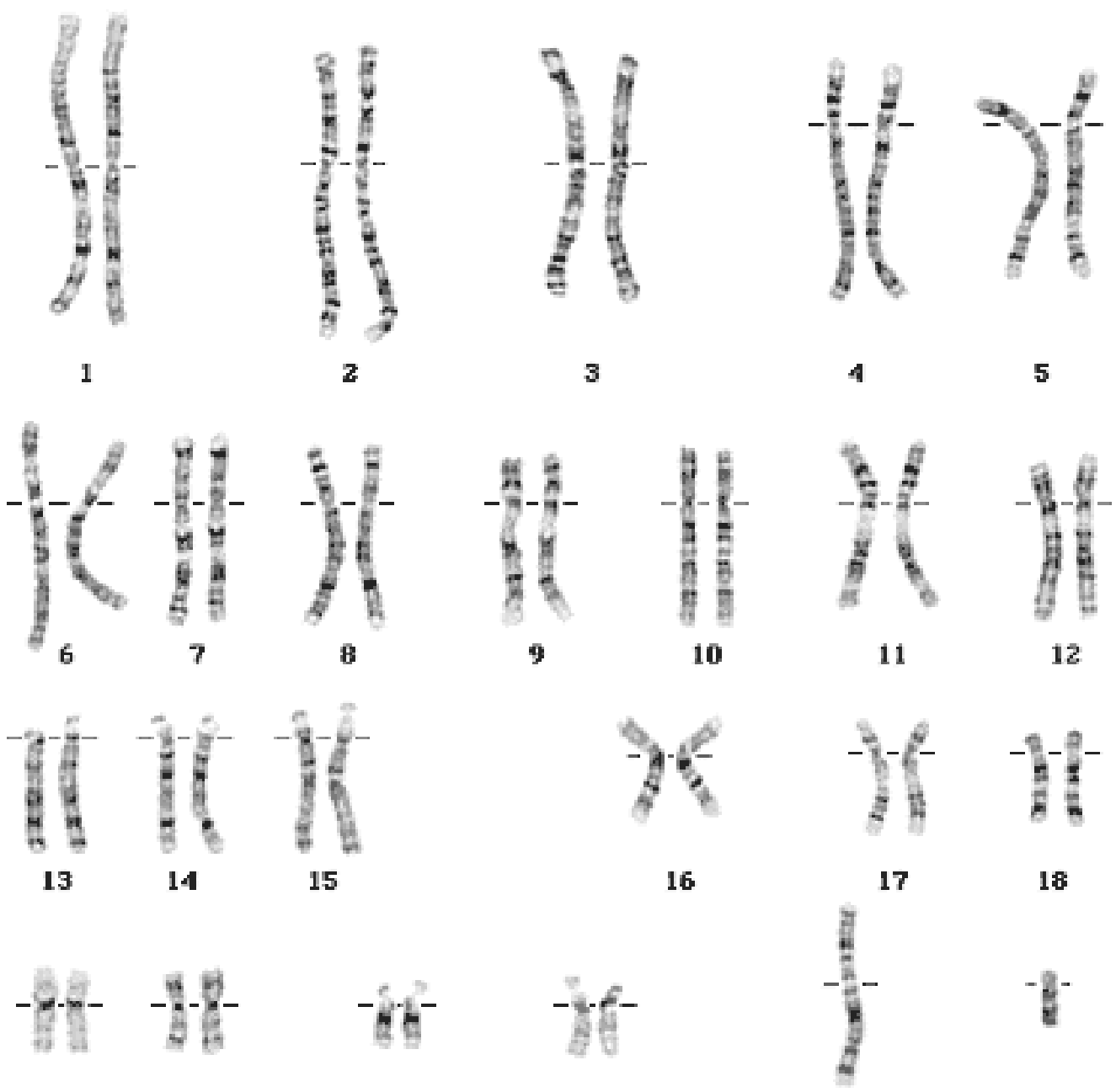


BGTG

550 Bandas

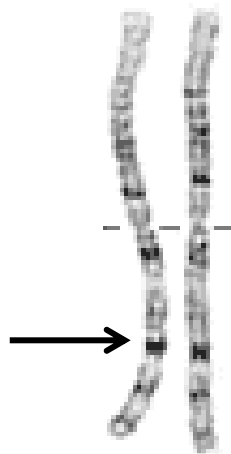
**Identifica
alterações**

± 10 Mb



BGTG

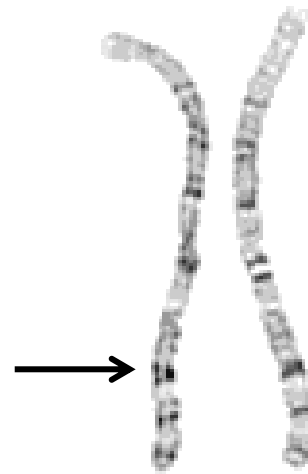
550 Bandas



1

BGTG

650 Bandas



1

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS NUMÉRICAS

1. Aneuploidias: alteração do número de cromossomos

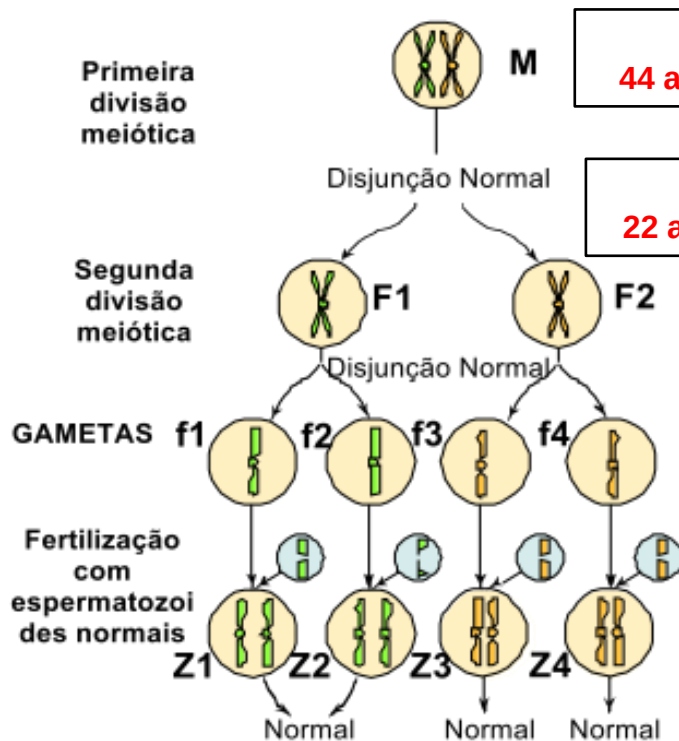
- Monossomias : ex. 45,X**
- Trissomias: ex. 47,XY,+21**
- Tetrassomias,: ex. 48,XXXX**

2. Euploidias: alteração do lote haploide $n=23$

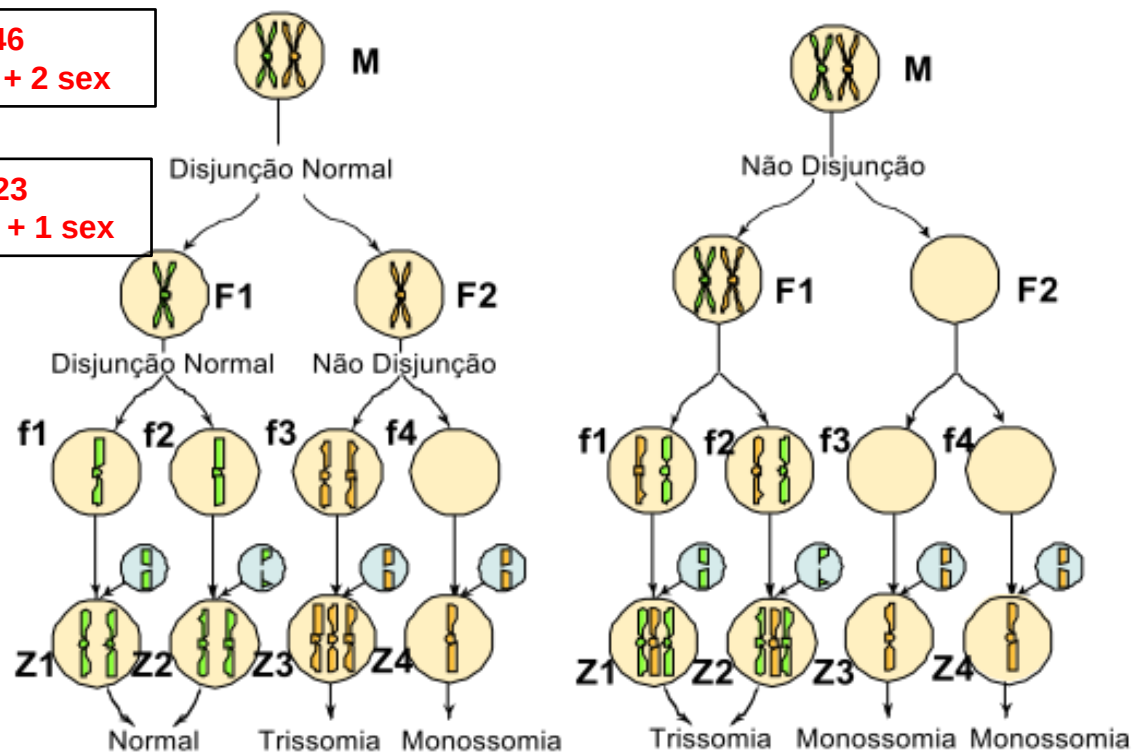
- Triploidia: 69 cromossomos**
- Tetraploidia: 92 cromossomos**

Alterações cromossômicas numéricas por não disjunção na meiose

MEIOSE NORMAL

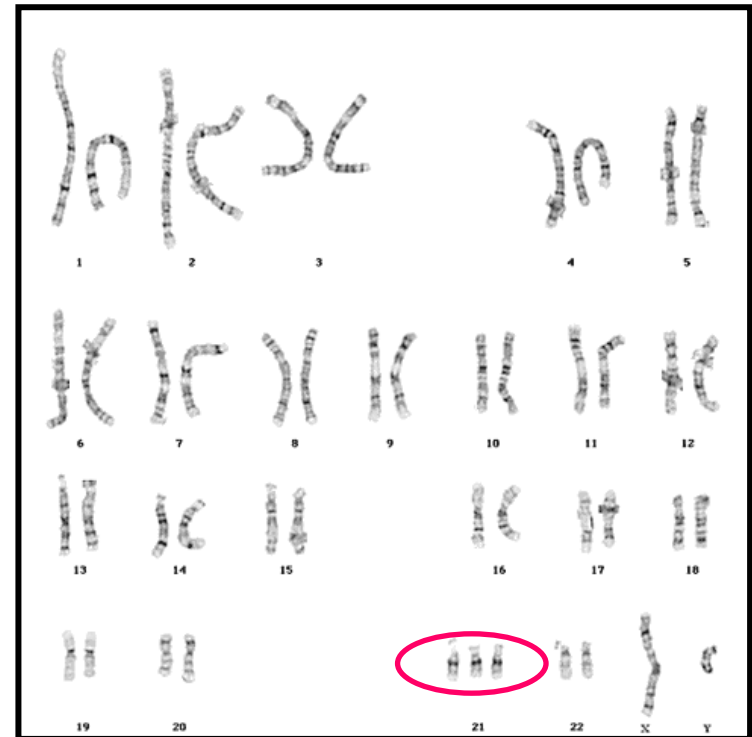
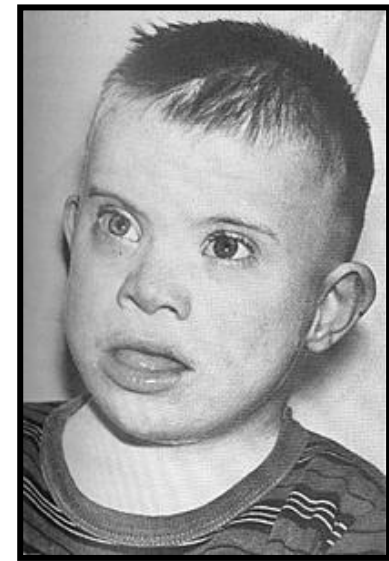


MEIOSE ANORMAL



Síndrome de Down

- Incidência +/-1/700 RN;
- Fenótipo:
 - Baixa estatura relativa;
 - Deficiência mental; Hipotonia;
 - Microcefalia, braquicefalia;
 - Perfil facial achatado;
 - Cabelos finos;
 - Fendas palpebrais oblíquas para cima;
 - Boca permanentemente aberta;
 - Língua protrusa, grande e fissurada;
 - Epicanto;



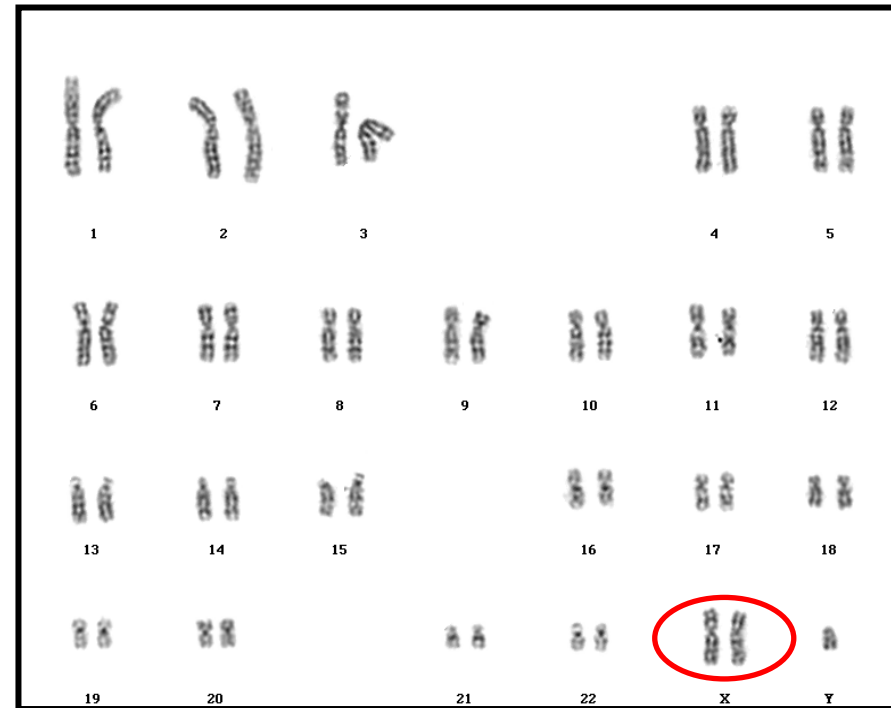
47,XY,+21

Síndrome de Klinefelter

➤ Incidência : +/- 1/1.000 RN masculino

➤ Fenótipo:

- Estatura geralmente elevada;
- Envergadura maior que a estatura;
- Infertilidade;
- Hipogonadismo hipergonadotrófico;
- Distrib de gordura e pelos corpóreos femininos;
- Testículos pequenos com oligospermia/azoospermia;
- Cariótipo mais comum: 47,XXY
- Outros cariótipos: 47,XXY/46,XY;
48,XXXY; 48,XXYY :



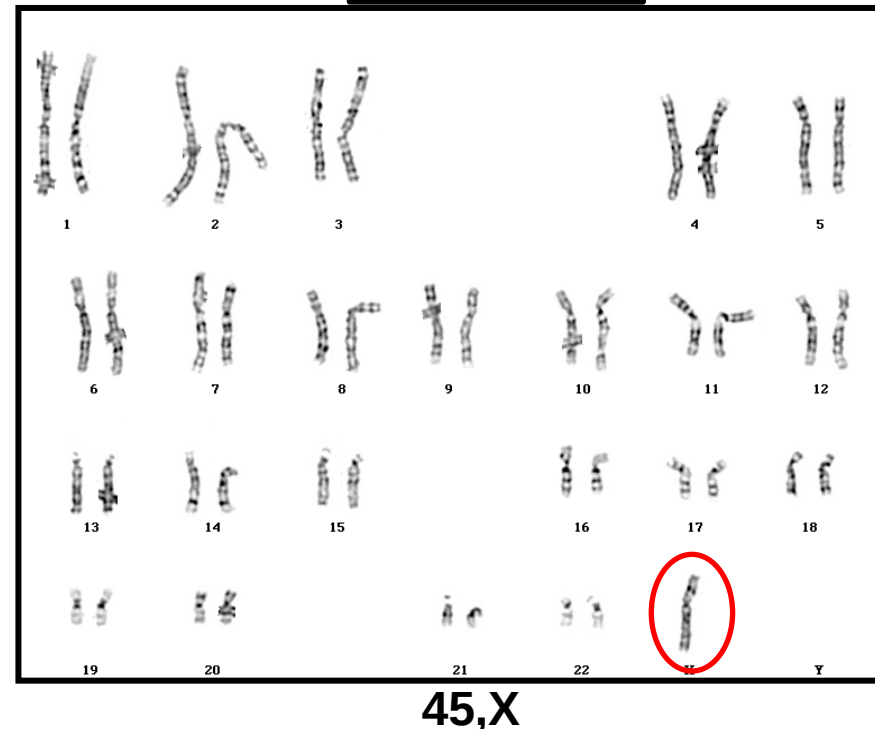
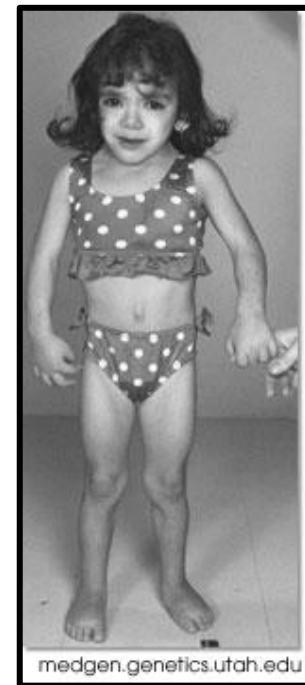
47,XXY

Síndrome de Turner

➤ Incidência de 1/2.500 a 3.000 de mulheres nascidas vivas;

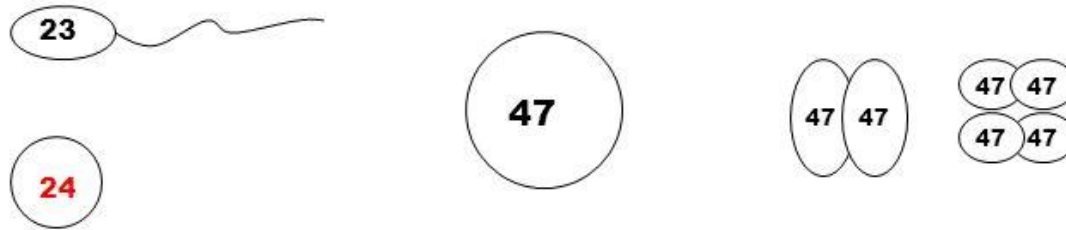
➤ Fenótipo:

- sexo feminino; baixa estatura;
- atraso desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários;
- implantação baixa do cabelo
- micrognatia, pálato em ogiva;
- pescoço curto e/ou alado;
- tórax em escudo, mamilos afastados e invertidos, cúbito valgo;
- linfedema congênito dos pés e mãos
- Cariótipo mais frequente: 45,X (60%)
Outros cariótipos: 45,X/46,XX; 46,X,i(Xq)
45,X/46,X,i(Xq); 46,X,del(Xp), etc



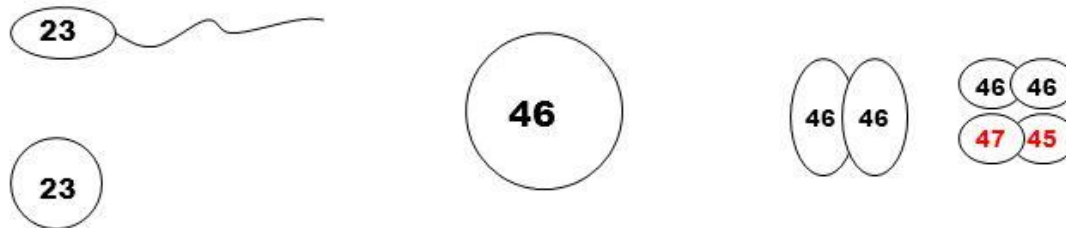
Origem do Mosaicismo

NÃO-DISJUNÇÃO PRÉ-ZIGOTICA



Erro durante a Meiose Zigoto

NÃO-DISJUNÇÃO PÓS-ZIGOTICA

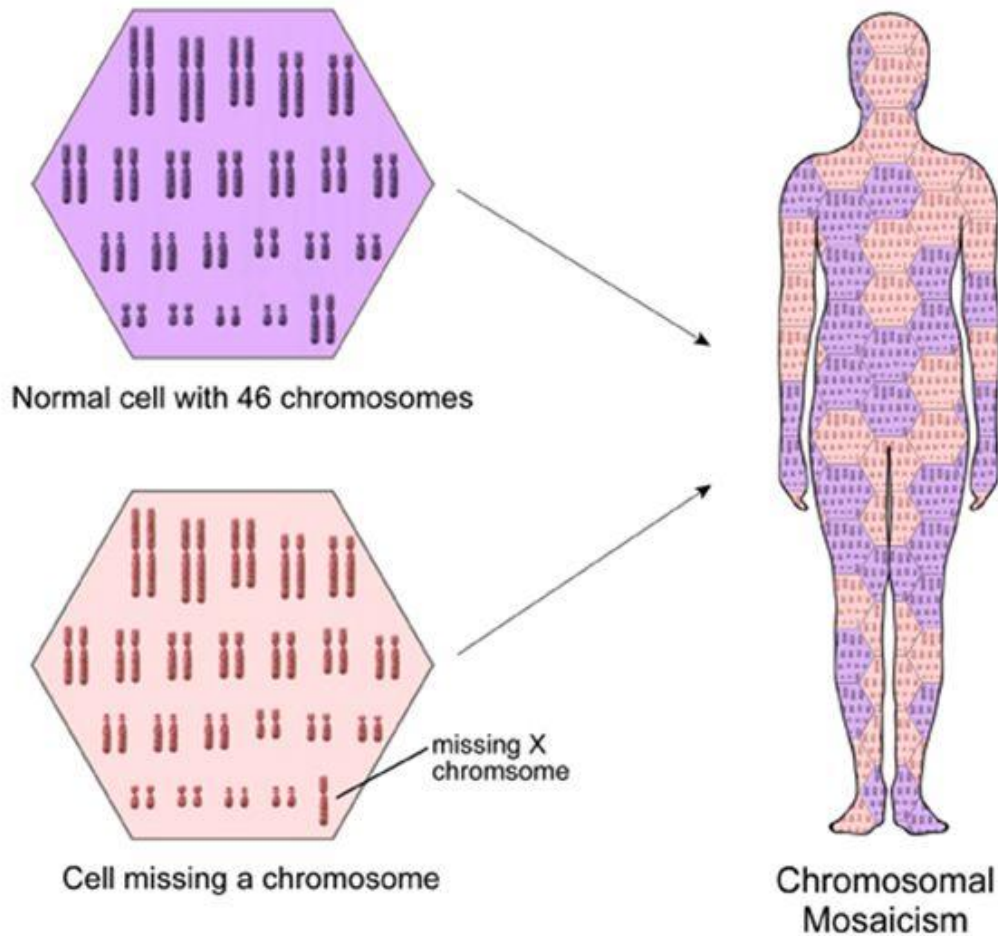


Zigoto

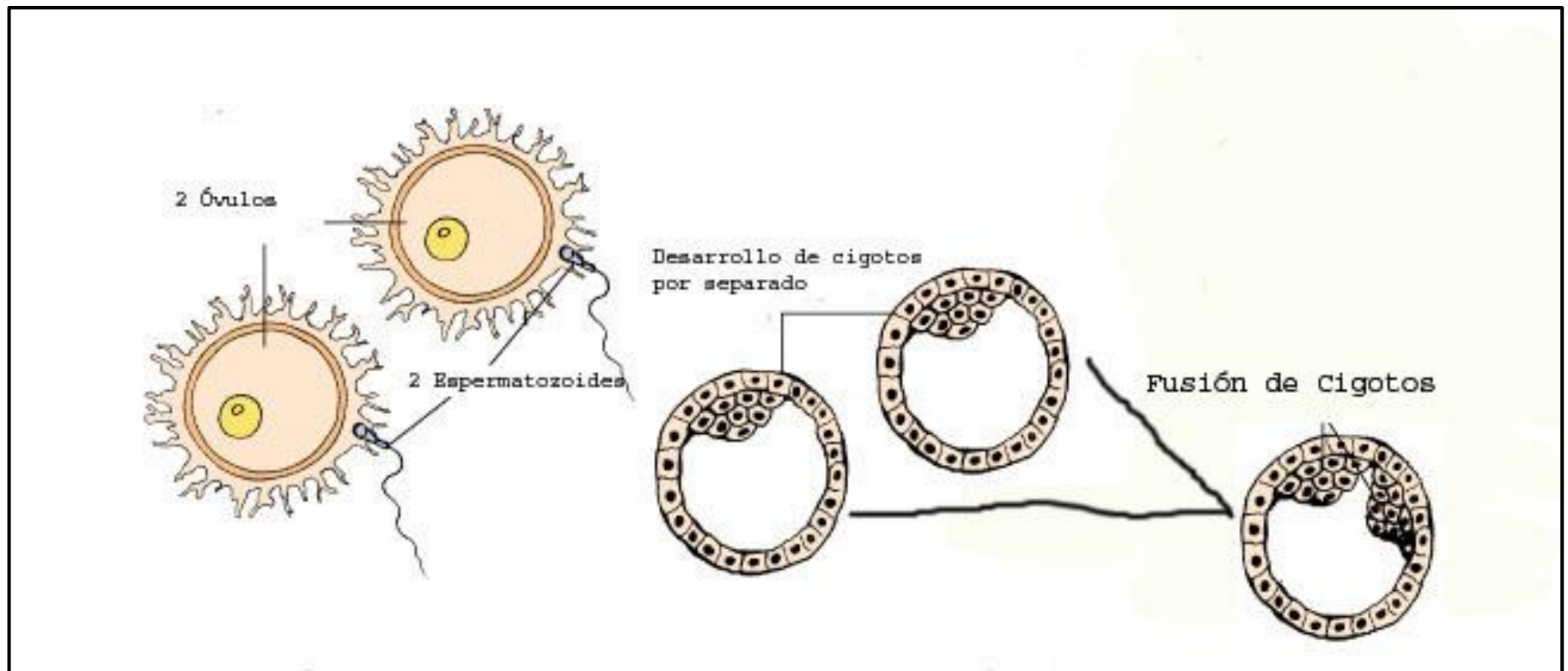
Erro durante a Mitose

Mosaicismo

Não-disjunção Pós-zigótica Mosaicismo

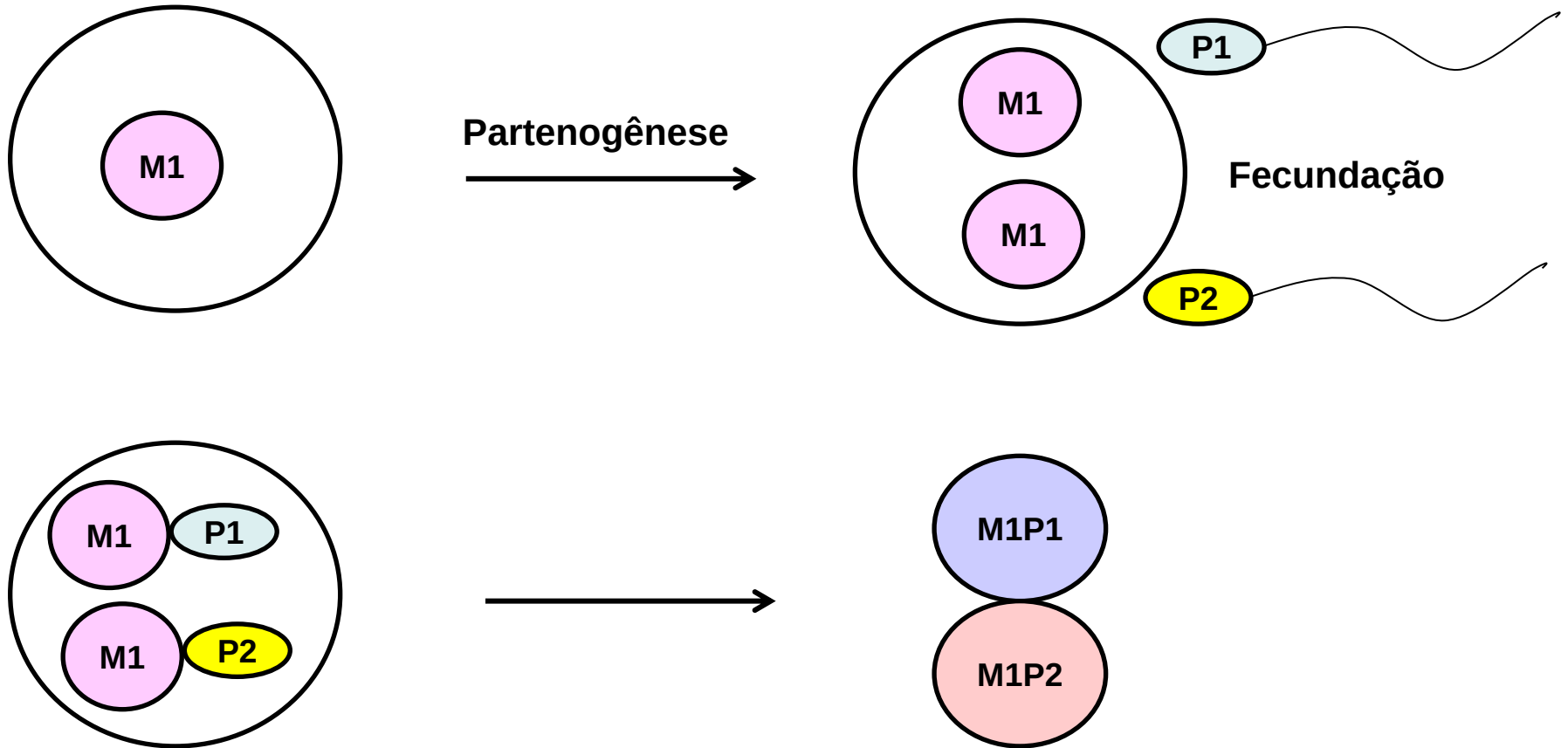


Formação de Quimera



Fusão de dois zigotos

Formação de Quimera- Partenogênese



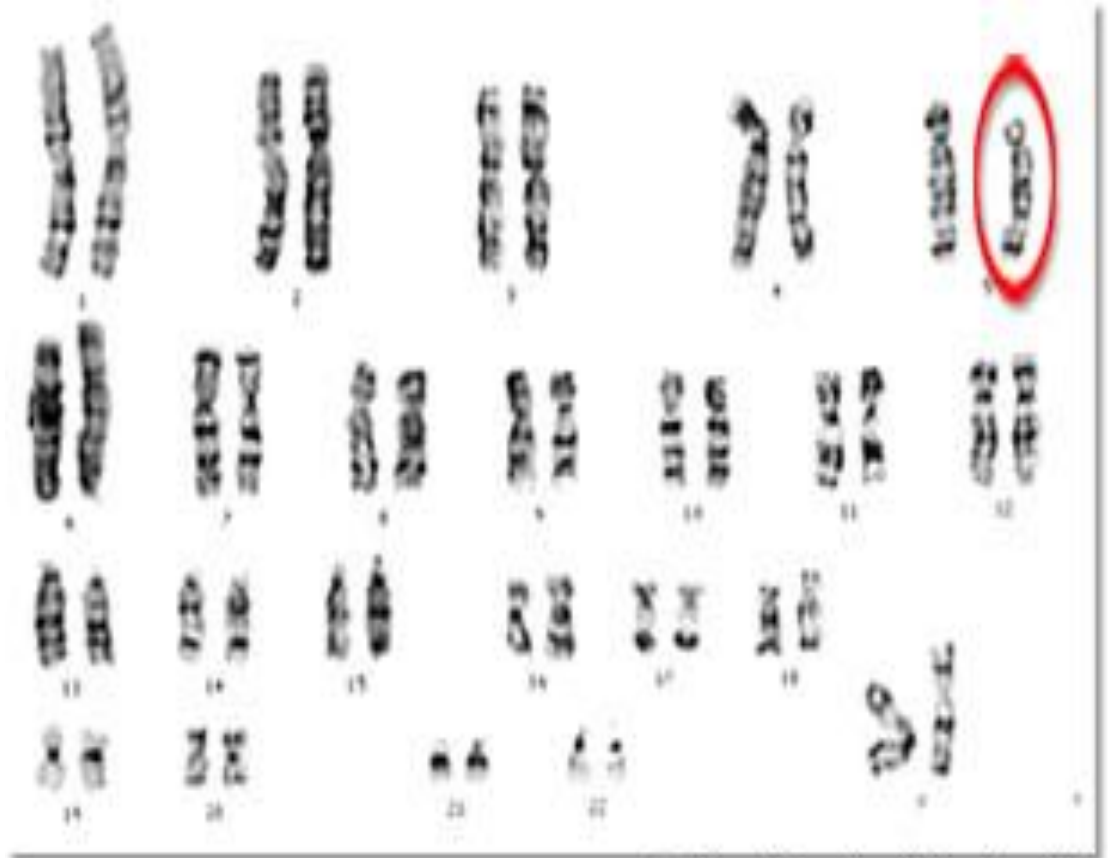
ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS

- 1. Deleção**
- 2. Inversão**
- 3. Translocação**
- 4. Isocromossomo**
- 5. Cromossomo em anel**
- 6. Inserção**

Deleção



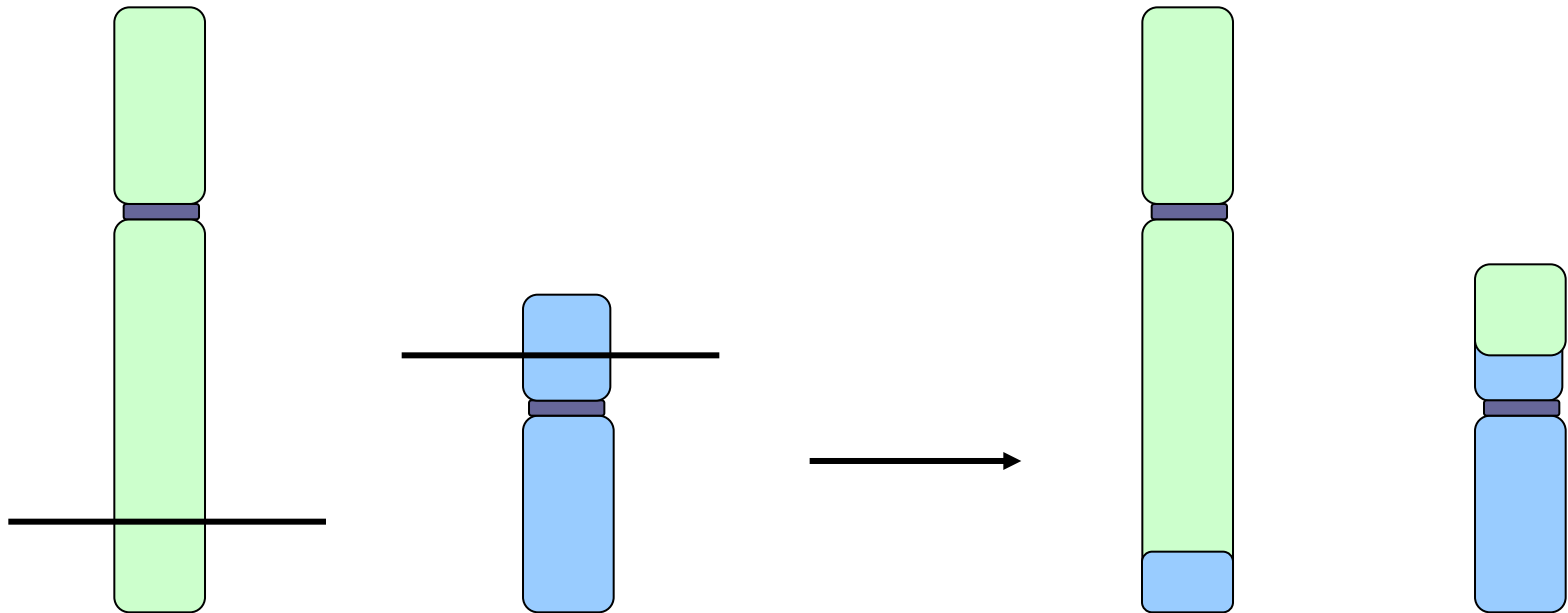
CdC Support Group
www.cridchat.u-net.com

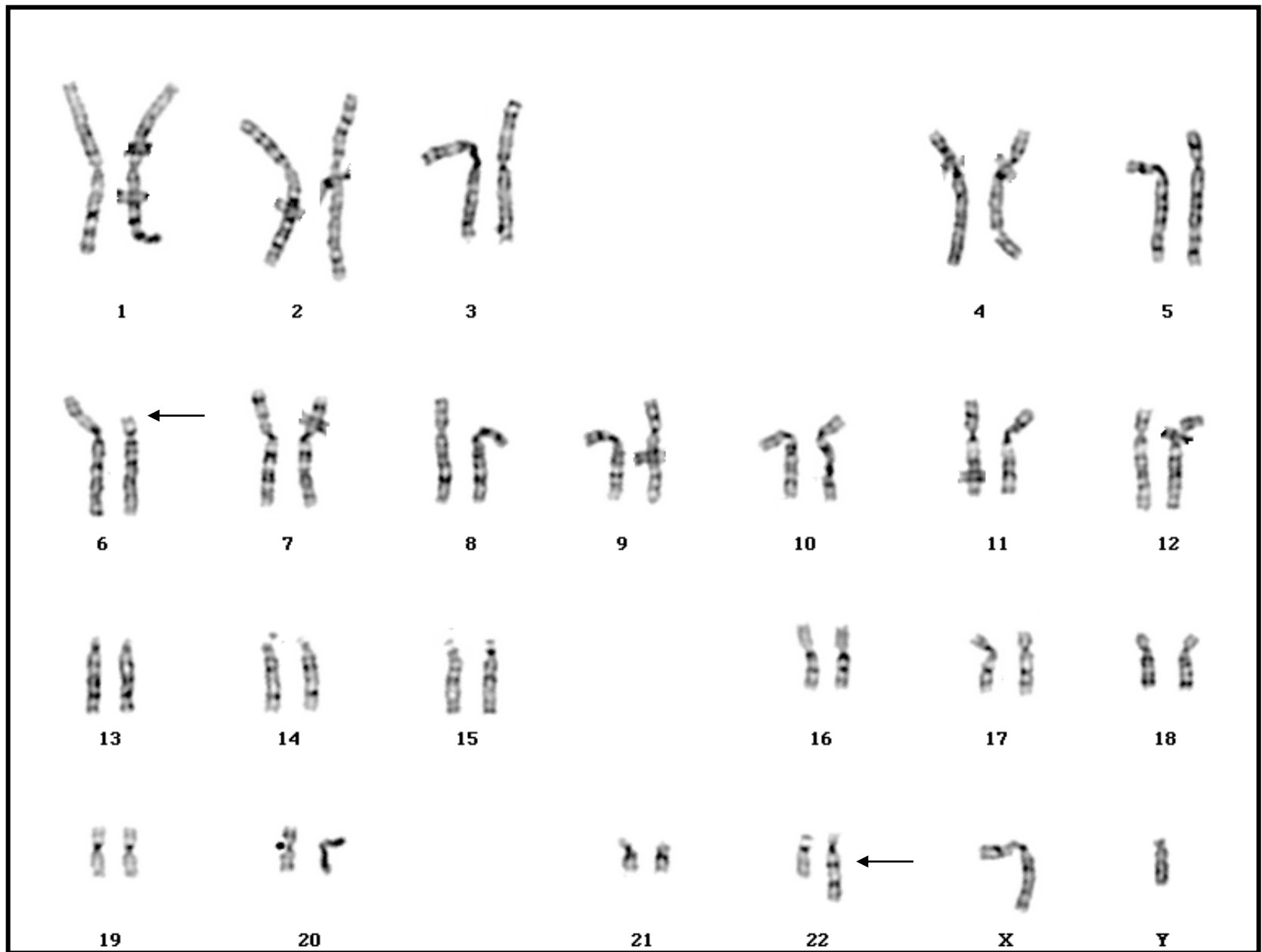


Tokyo Medical University

Síndrome de Cri du Chat: cariótipo 46,XX,del(5p)

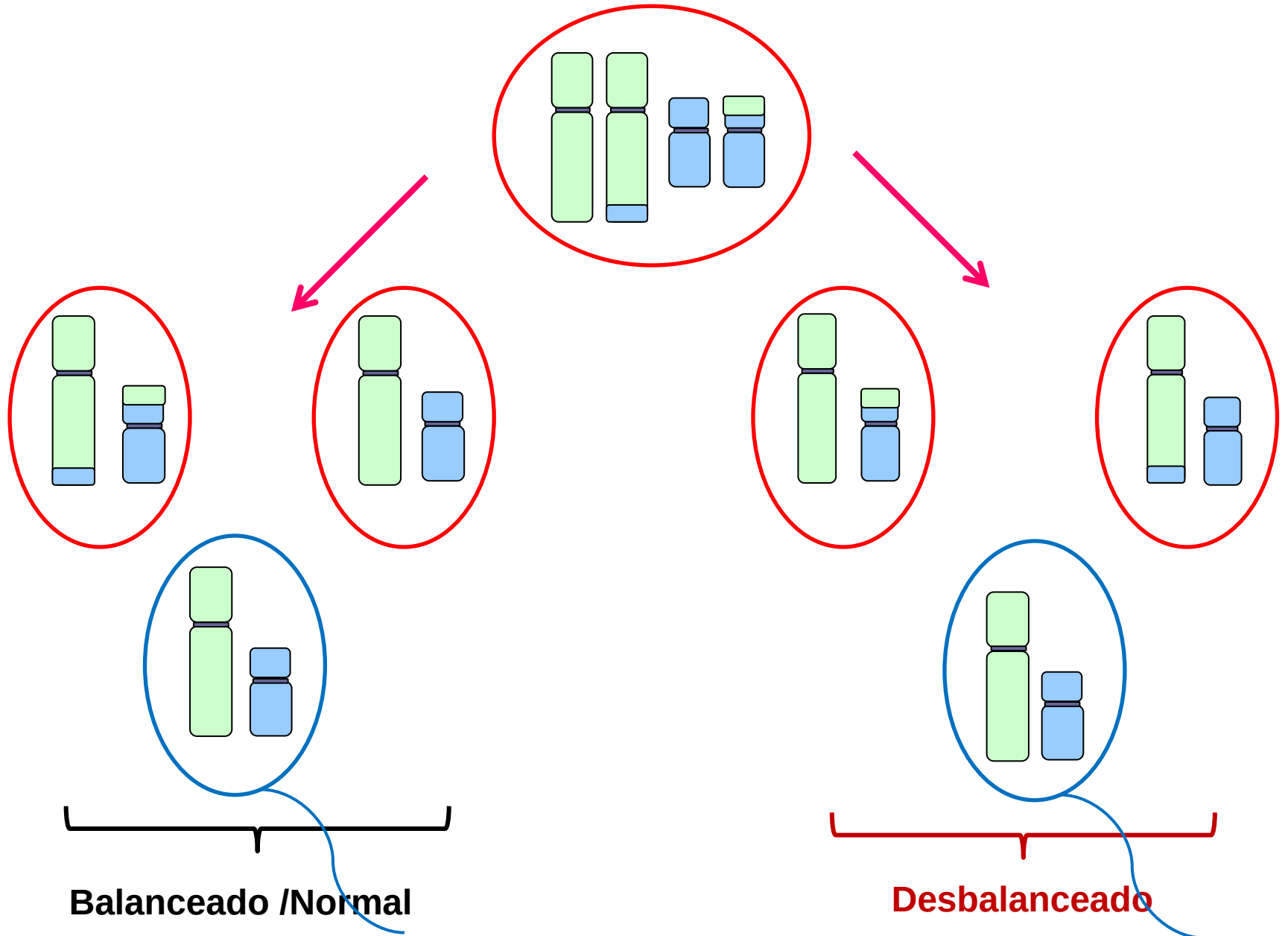
TRANSLOCAÇÃO RECÍPROCA



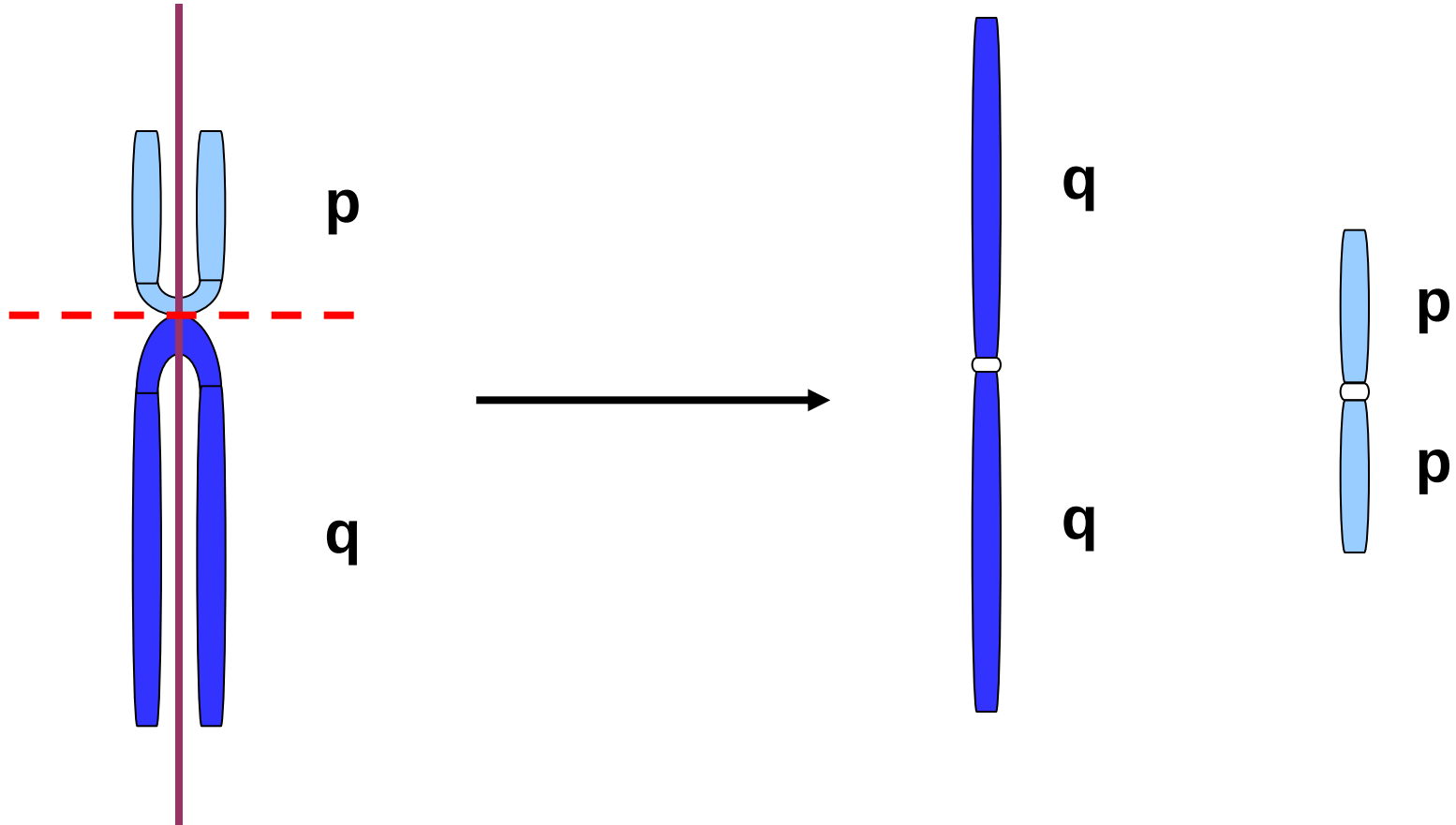


Cariótipo: 46,XY,t(6;22)

Formação de Gametas



FORMAÇÃO DE ISOCROMOSSOMO

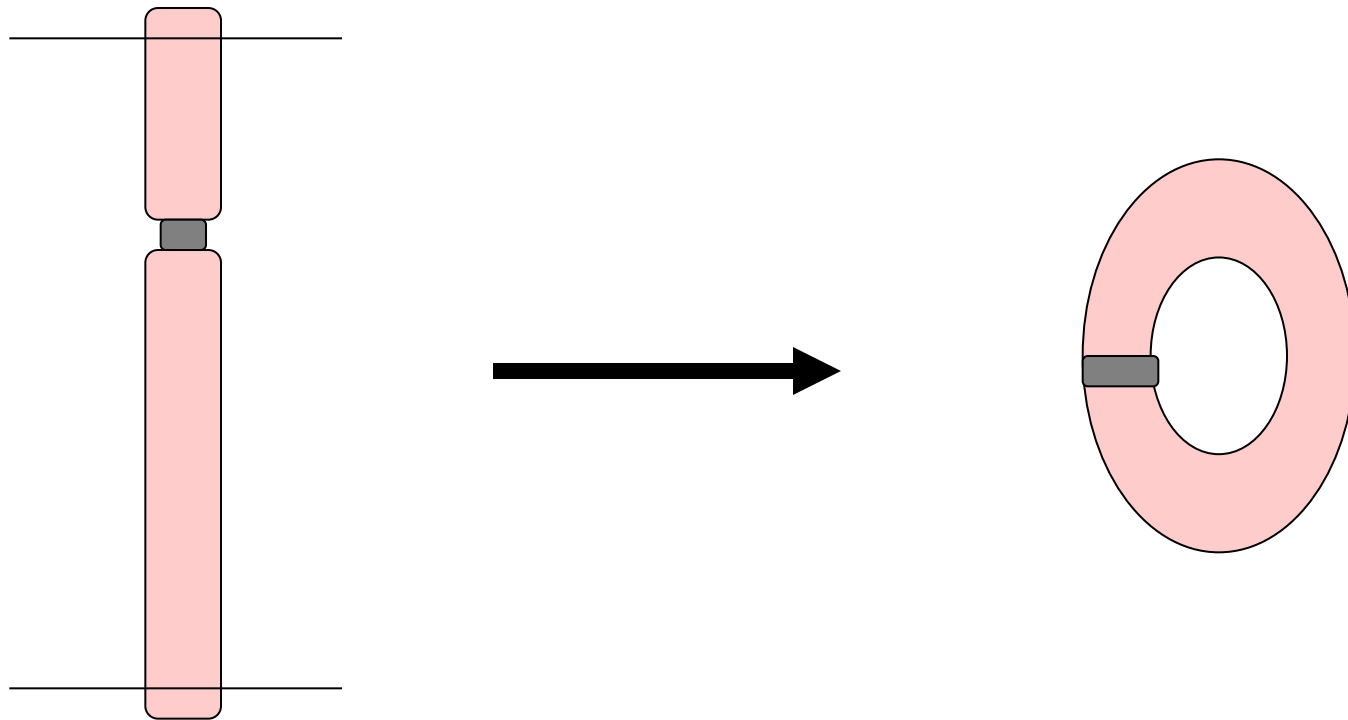


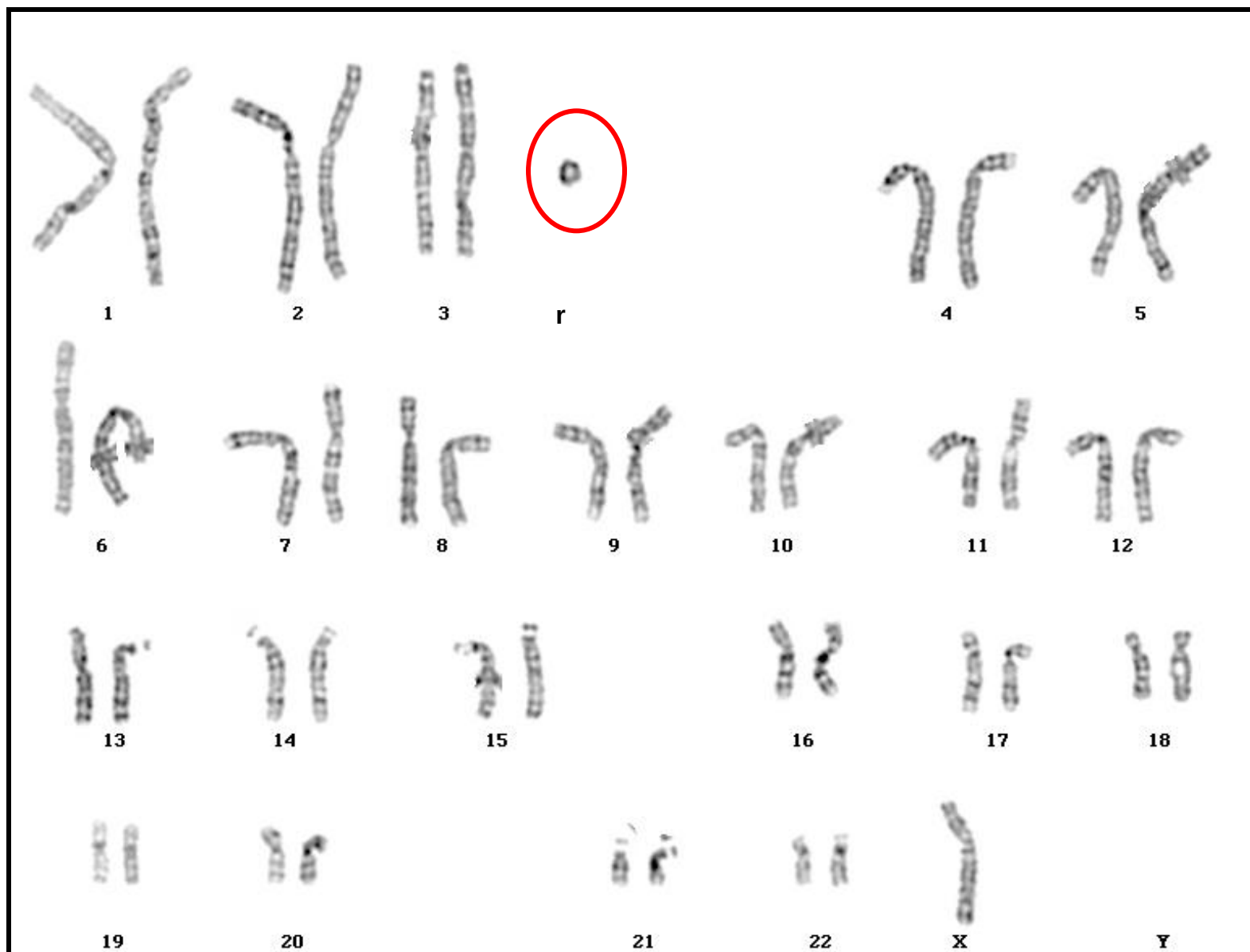
Separação das cromátides



Cariótipo: 46,X,i(Xq) compatível com síndrome de Turner

FORMAÇÃO DE CROMOSSOMO EM ANEL





Cariótipo: 46,X,+r

ISCN 2016

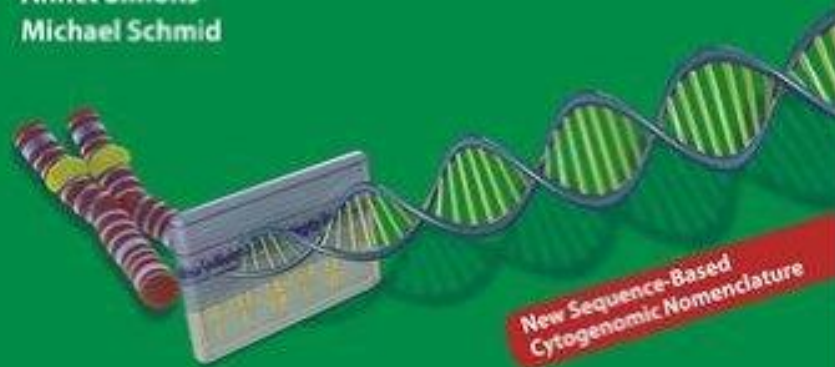
An International System for
Human Cytogenomic Nomenclature (2016)

Editors

Jean McGowan-Jordan

Annet Simons

Michael Schmid



New Sequence-Based
Cytogenomic Nomenclature

KARGER

CITOGENÔMICA

(Citogenética Molecular)

- **FISH**
- **Array CGH**

FISH

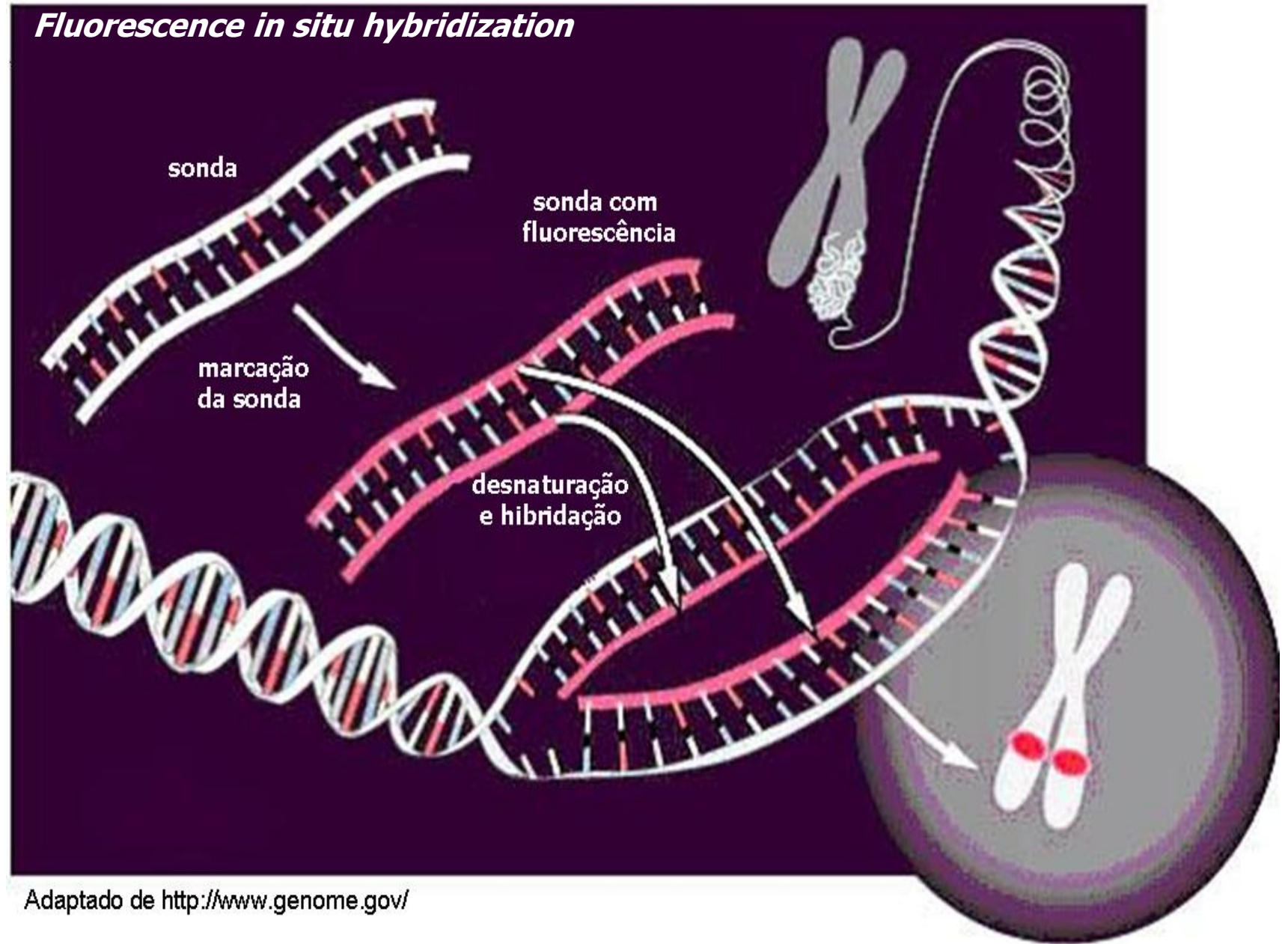
(Fluorescence *in situ* Hybridization)

- **Pinkel et al 1986**
- **Sondas marcadas com fluorocromos**

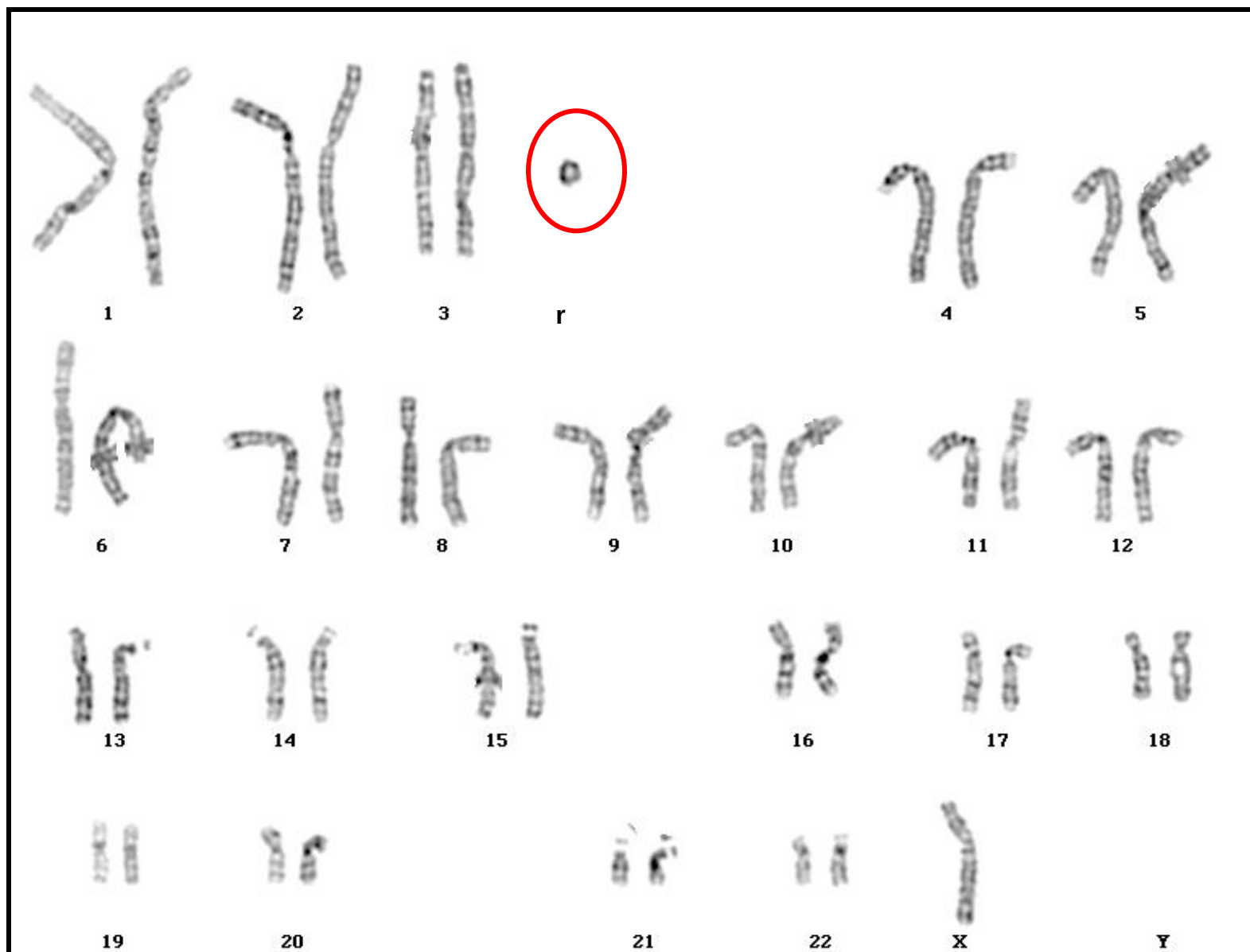
Aplicações:

- **translocações/inversões/deleções**
- **ganhos ou perdas (microscópicas e submicroscópicas)**
- **amplificação gênica**
- **mapeamento gênico**
- **origem de marcadores e anéis**

Fluorescence in situ hybridization

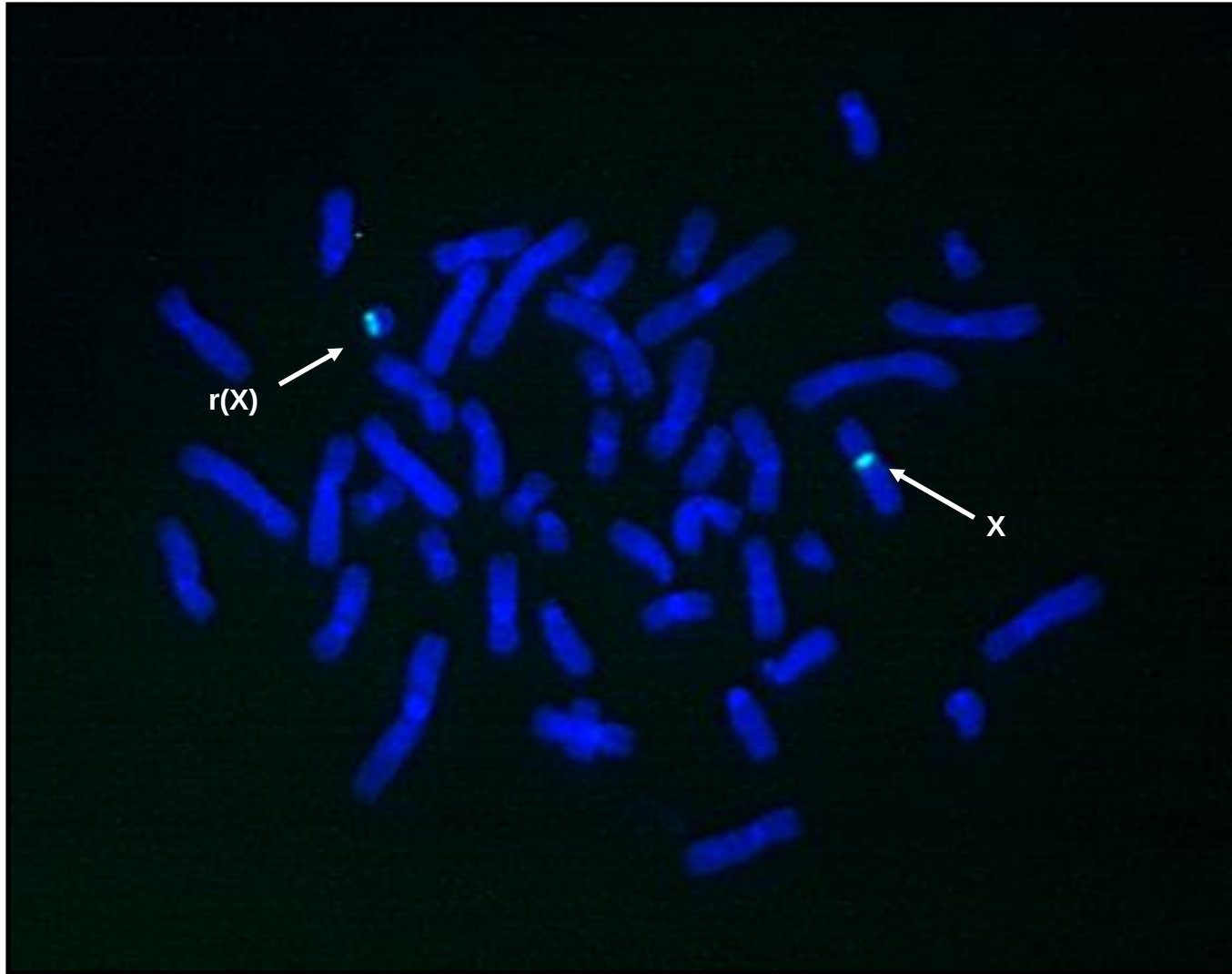


Adaptado de <http://www.genome.gov/>



Cariótipo: 46,X,+r

Identificar origem de cromossomo em anel

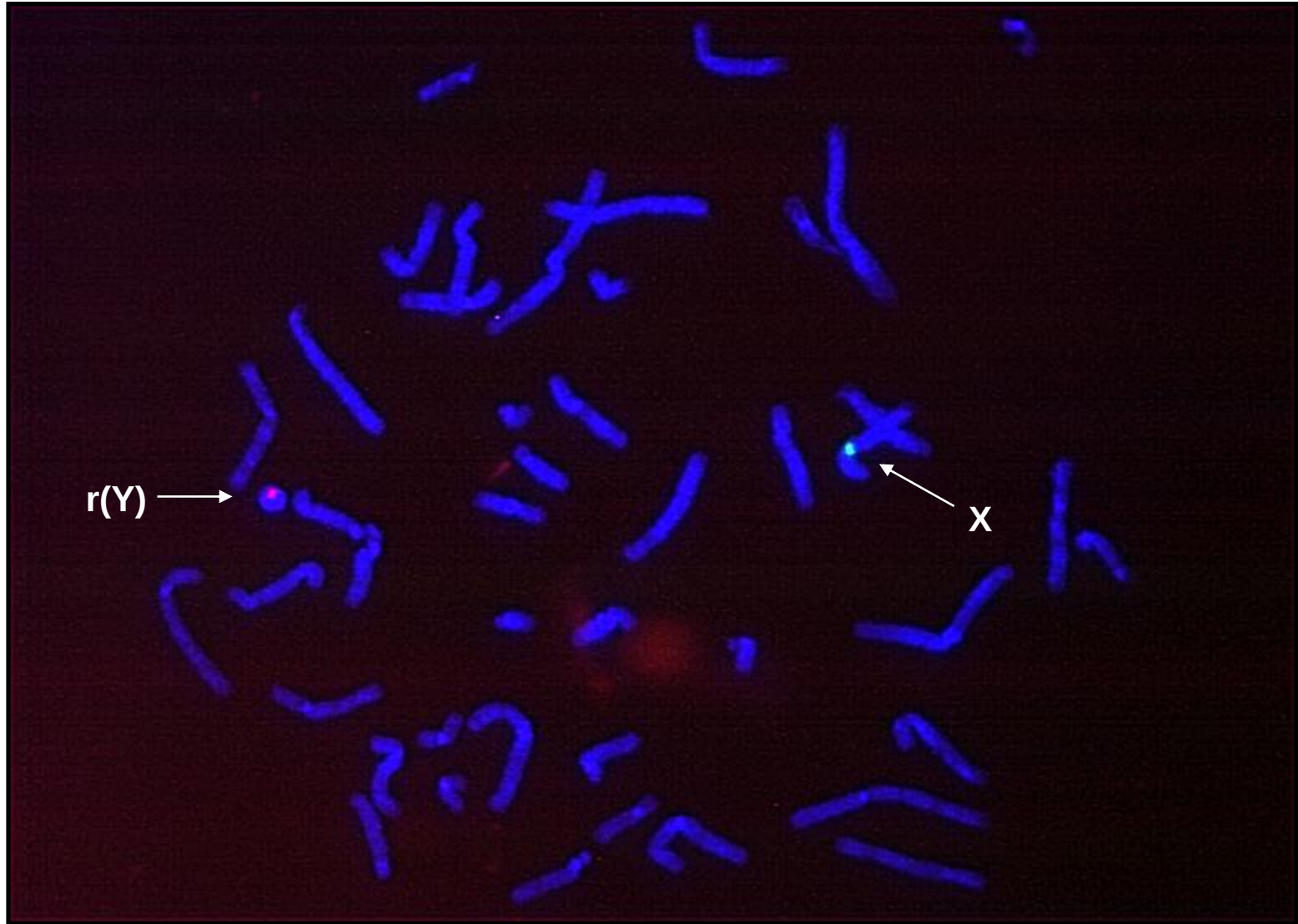


Centrômero X: verde

Centrômero Y: vermelho

46,X,+r.ish r(X)(DXZ1+)

Identificar origem de cromossomo em anel



Centrômero X: verde
Centrômero Y: vermelho

46,X,+r.ish r(Y)(DYZ3+)

Síndrome de Prader-Willi

Características Clínicas:

- Obesidade (compulsão alimentar)
- Retardo Mental
- Baixa Estatura
- Genitália pouco desenvolvida
- Hipogonadismo
- Pés e mãos pequenos



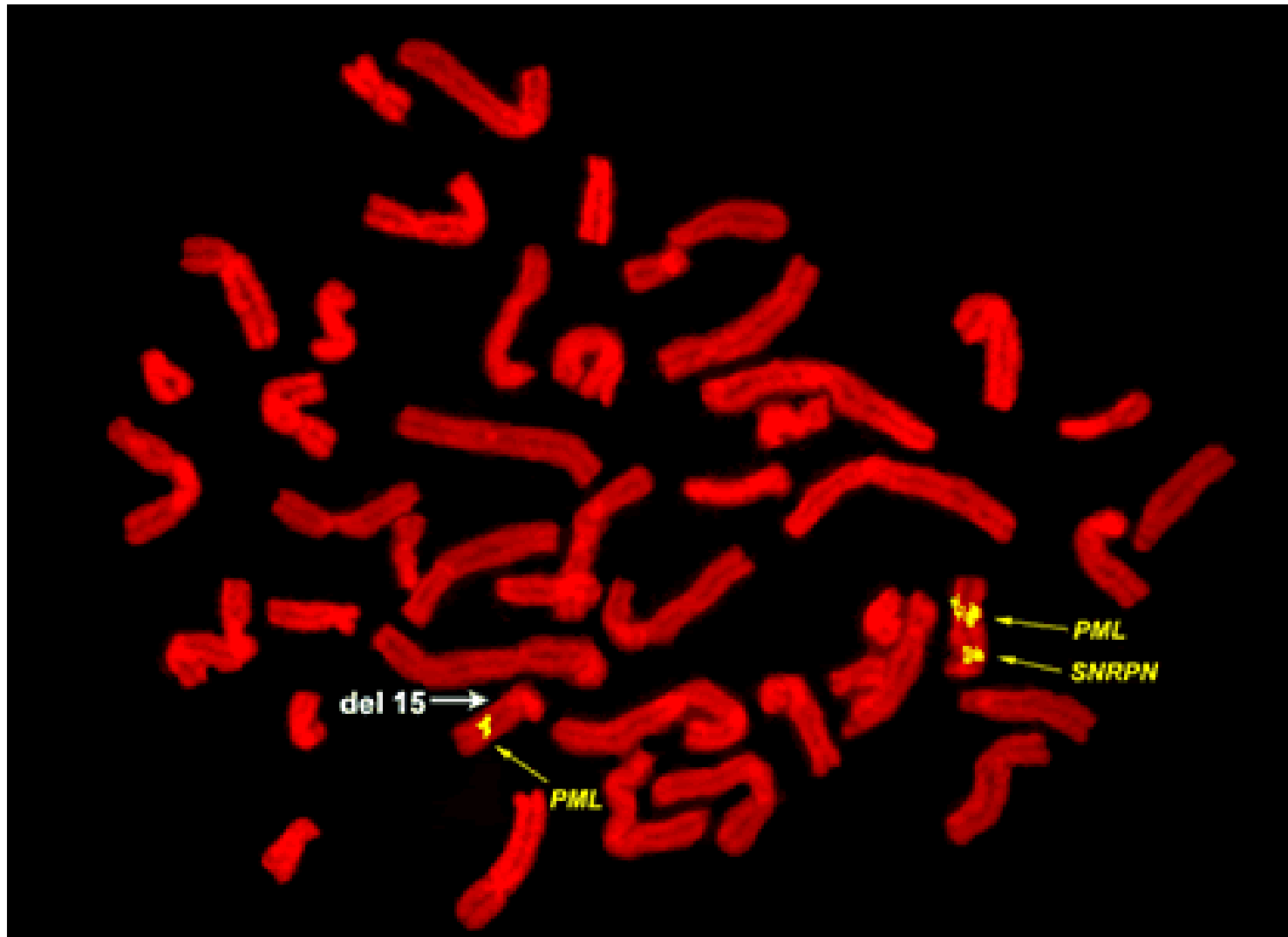
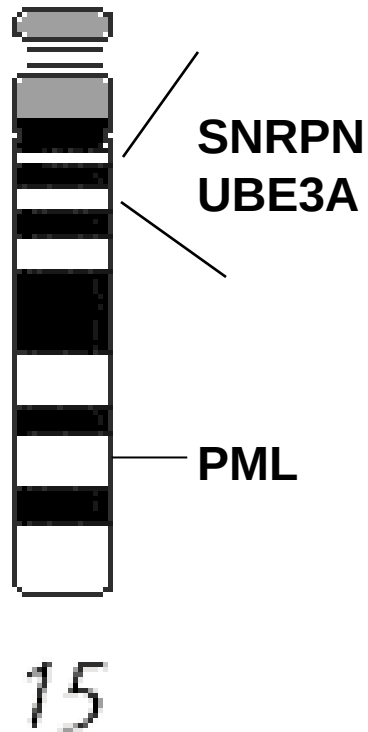
Síndrome de Prader-Willi

- **Herança autossômica dominante**
- **Incidência 1/30.000**

Causas Genéticas:

- **75% - Deleção da região 15q11-13 paterno**
- **24% - Dissomia uniparental materna**
- **<1% - Defeitos no centro de imprinting**

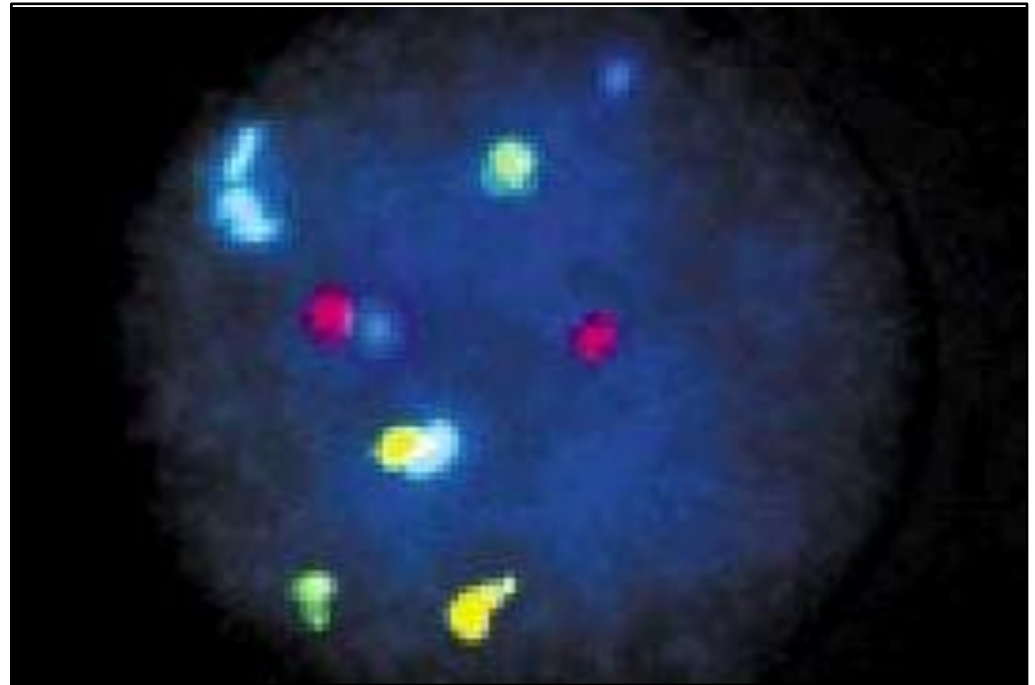
FISH deleção 15q11-q13 paterna



SNRPN (15q11- deleção)
PML – controle de reação

46,XX.ish del(15)(q11.2)(SNRPN-)

Reprodução Assistida



13 16 18 21 22

Técnica de FISH

Vantagens

- Uso de núcleos interfásicos
- Metáfases com cromossomos inadequados para análise citogenética
- Cortes histológicos de tecidos parafinados ou congelados, esfregaços de mucosas
- Contagem de sinais específicos
- Rápida detecção
- Resolução > 0,05 Mb

Desvantagens

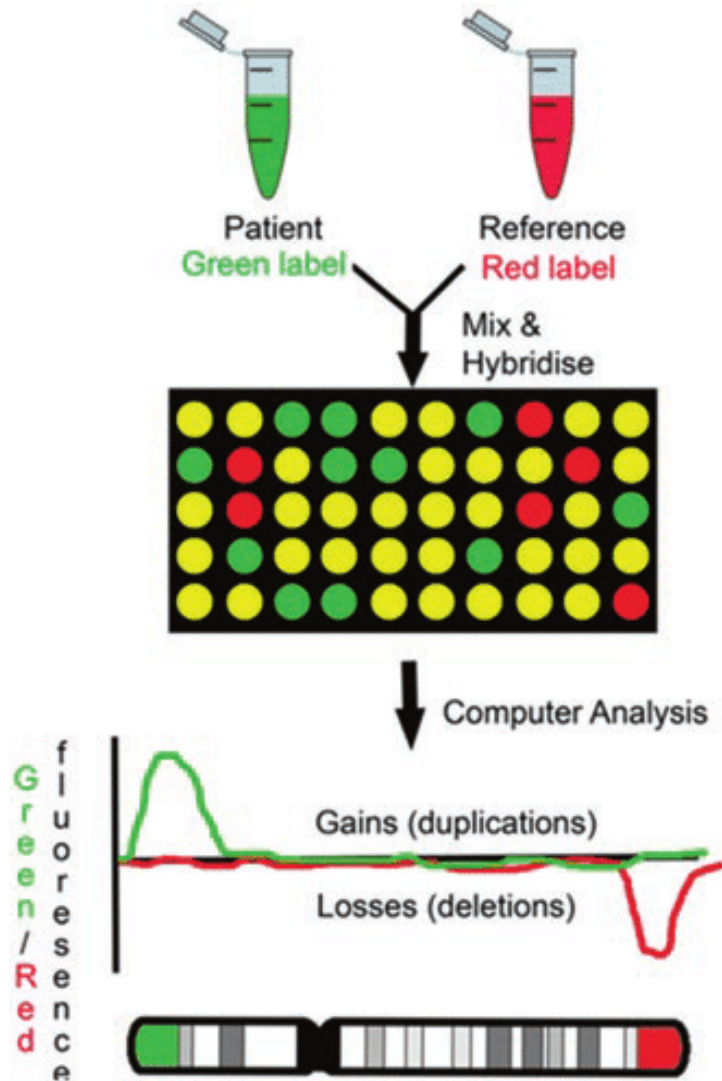
- Alto custo
- Análise de sequências específicas

ARRAY CGH/ SNPs

(Comparative Genomic Hybridization)

- **Indicado: atraso desenvolvimento neuropsicomotor, espectros de autismo e malformações congênitas**
- **Na endocrinologia : obesidade severa de início precoce, hipotireoidismo congênito, disgenesia tireoidiana, genitália atípica, baixa estatura e insuficiência ovariana primária**

- **Permite detecção de ganho e perda de regiões do genoma (microscópicas e submicroscópicas)**
- **Nos SNPs arrays: dissomia uniparental e perda de heterozigosidade (LOH)**
- **Sondas/oligonucleotídeos fixados em lâminas ou em chips ou em beads**
- **Técnica trabalhosa, de alto custo e necessita de bioinformática**

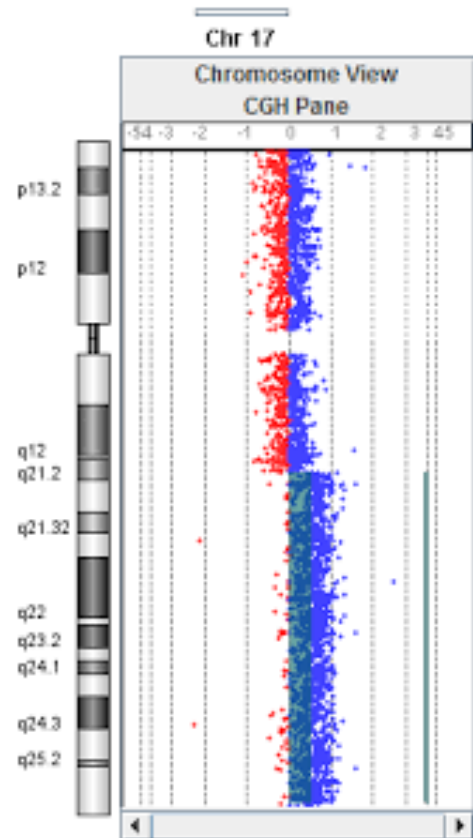


Spot	Patient	Control	Green : Red
	 2 copies	 2 copies	1.0 : 1.0
	 3 copies	 2 copies	1.5 : 1.0
	 1 copy	 2 copies	0.5 : 1.0

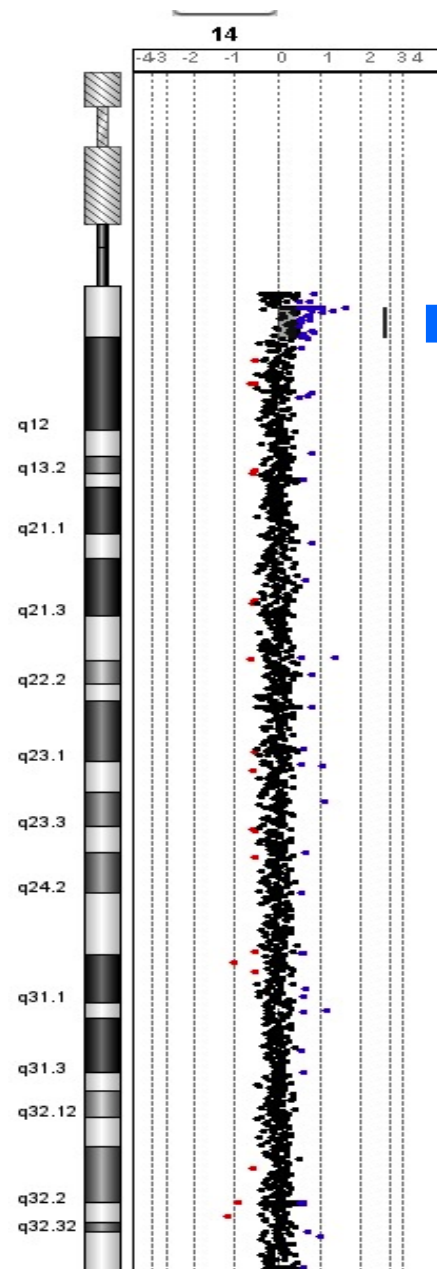


Agilent Technologies





Deleção ± 40 Mb



Duplicação ± 2,7 Mb

Array CGH detecta deleções ou ganhos submicroscópicos (CNVs)

➤ **CNV: Copy Number Variation (Variação do número de cópias)**

“Segmento de DNA com mais de 1 kb, com um número de cópias variável em relação a um genoma referência”

Sites utilizados para a classificação dos CNVs:

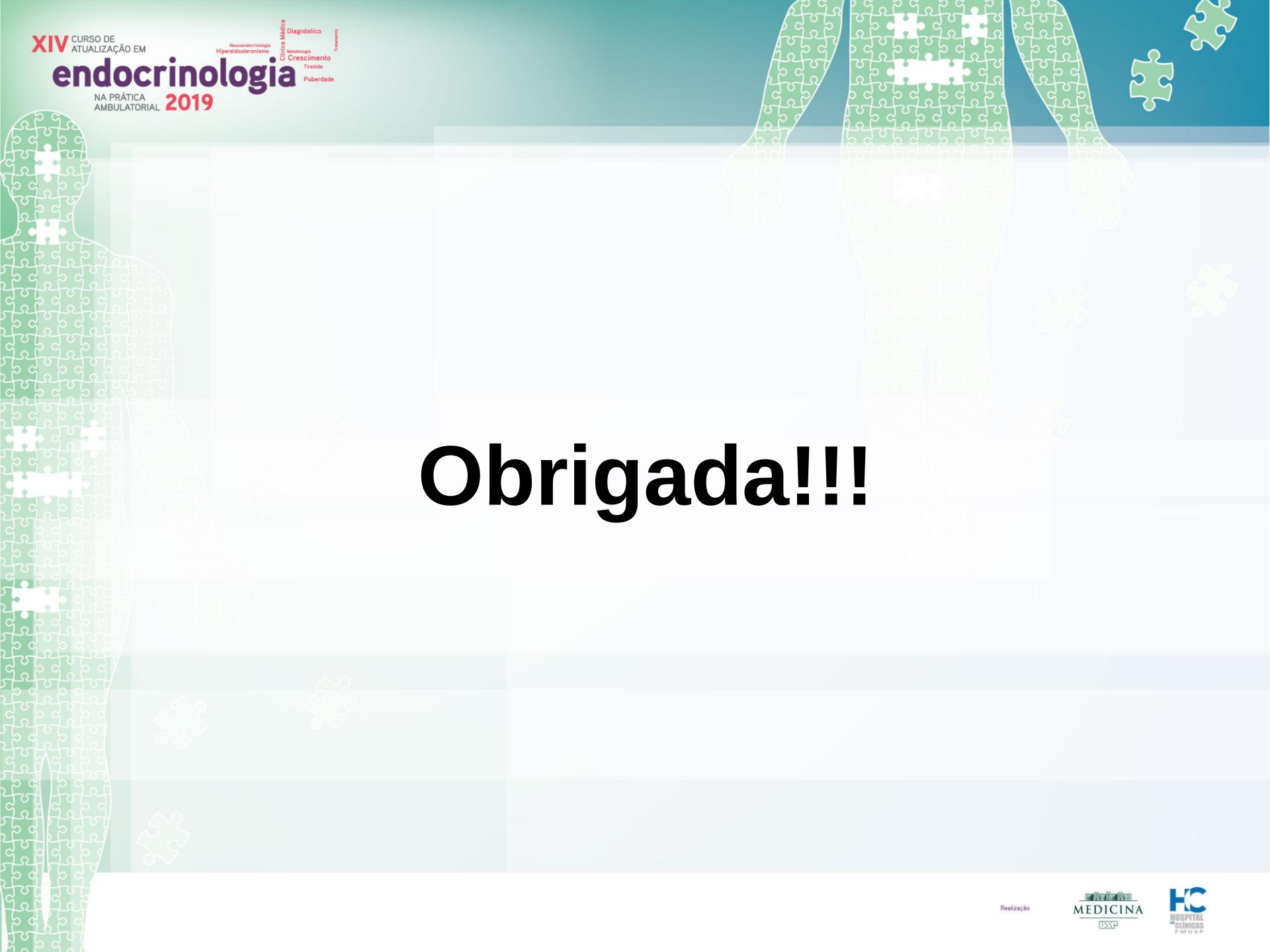
- DGV: CNVs Indivíduos saudáveis (Database of Genomic Variants)
<http://projects.tcag.ca/variation>
- DECIPHER: CNVs Indivíduos com fenótipos alterados (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources) <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- UCSC Genome Browser: Conteúdo gênico das CNVs (UC Santa Cruz) <http://genome.ucsc.edu/>
- OMIM: Função dos genes envolvidos (Online Mendelian Inheritance in Man) <https://www.omim.org/>

VarElect <https://varelect.genecards.org/>

GTEx <https://www.gtexportal.org>

ExAC <http://exac.broadinstitute.org/>

- **Classificação de patogenicidade seguindo os critérios: segregação familiar, descrições prévias (OMIM, databases), tamanho e conteúdo gênico:**
 - **Patogênicas:** alterações não reportadas no DGV, sobreposição a fenótipos alterados e rica em genes OMIM
 - **Provavelmente Patogênicas:** alterações não reportadas no DGV, faz sobreposição a fenótipos alterados; com tamanho acima de 3 Mb, contendo genes OMIM ou não, ou contém genes relacionados ao fenótipo independente do tamanho
 - **VUS (Variante de Significado Clínico Incerto):** CNVs não reportadas no DGV, mas que não fecham critérios para patogênicas ou provavelmente patogênicas
 - **Provavelmente Benignas:** podem conter genes OMIM, porém amplamente descritas no banco de dados DGV.
 - **Benignas :** amplamente relatadas no banco de dados de saudáveis



Obrigada!!!