



# ANÁLISE DA CARIÓTIPO E PCR X-FRÁGIL DE INDIVÍDUOS PROVENIENTES DE MARINGÁ, PARANÁ, E REGIÃO

Lucas Pozza Gomes<sup>1</sup>, Isabella Fantini Molinar<sup>2</sup>, Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Medicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC<sup>MED</sup>/ICETI-UniCesumar. lucas\_gomes@alunos.unicesumar.edu.br

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. ra-20097110-2@alunos.unicesumar.edu.br

<sup>3</sup>Orientadora, Docente no Curso de Medicina, UNICESUMAR. maria.baldez@docentes.unicesumar.edu.br

## RESUMO

O presente trabalho trata-se de um estudo transversal, de caráter clínico e experimental, cujo objetivo consiste em analisar amostras de sangue periférico e/ou swab oral de pacientes com suspeita de síndrome genética não diagnosticados ou subdiagnosticados provenientes de Maringá (PR) e região, por meio do exame de cariótipo por bandeamento G e reação em cadeia da polimerase (PCR) para cromossomo X-Frágil. As amostras de sangue periférico foram processadas realizando o cultivo de linfócitos, seguido da confecção de lâminas para cariótipo que passaram por visualização e avaliação em microscopia óptica. Foram analisadas cerca de 20 metáfases por paciente. As amostras de swab oral, por sua vez, foram pesquisadas para diagnóstico molecular da Síndrome do Cromossomo X-Frágil (SXF) através de PCR do gene FMR1. Foram realizados 39 exames de cariótipo e 6 exames de PCR, a partir dos quais obtivemos 21 cariótipos nos padrões da normalidade e 18 contendo alterações, incluindo trissomia do cromossomo 21 e mosaicismos dos cromossomos 21 e 22. Dos 6 exames de PCR, obtivemos 5 resultados nos padrões da normalidade e 1 positivo para cromossomo X-Frágil.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cariótipo; PCR X-Frágil; Síndromes Genéticas.

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as alterações cromossômicas numéricas autossômicas compatíveis com a vida após o nascimento, destacam-se as trissomias dos cromossomos 13 (Síndrome de Patau), 18 (Síndrome de Edwards) e 21 (Síndrome de Down), sendo a Síndrome de Down a mais prevalente (NUSSBAUM, 2016). Para o diagnóstico laboratorial destas aneuploidias, pode-se utilizar o exame de cariótipo por bandeamento G, sendo esse realizado com qualquer célula desde que tenha núcleo, pois é onde os cromossomos estão localizados. Através da coleta de sangue são separados linfócitos e preparados para visualização de cromossomos metafásicos assim se tornando possível a realização de contagem numérica e análise estrutural. A utilidade do exame de cariótipo estende-se, também, às aneuploidias de cromossomos sexuais, sendo possível a identificação de síndromes como a Síndrome de Klinefelter (47, XXY), Síndrome de Turner (45, X), Triplo X (47, XXX), entre outras aneuploidias.

Já para alterações cromossômicas estruturais como a Síndrome do X-Frágil (SXF), técnicas diagnósticas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o Southern blot são os exames rotineiramente utilizados, onde há amplificação e visualização de uma região de interesse do DNA para que possa ser feita análise. A SXF é a principal causa de deficiência intelectual hereditária, e é consequência de uma mutação ligada ao cromossomo X. A SXF resulta do aumento das repetições de trinucleotídeos CGG no gene FMR1, e de acordo com o número dessas repetições pode-se classificar o indivíduo como portador de pré-mutação (55 – 200 CGG) ou portadores de mutação completa (superior a 200 CGG), nos quais a mutação conduz ao mecanismo de metilação que diminui ou impede a transcrição



do gene FMR1 (HUNTER et al., 2019). A PCR é uma ferramenta útil na determinação da extensão do segmento de repetição de trinucleotídeos CGG e do grau de metilação do gene FMR1 (SHERMAN et al., 2005).

Indivíduos de diferentes idades com SXF associado ou não ao autismo precisam ser assistidos de maneira correta para que seus potenciais sejam adequadamente desenvolvidos, a fim de garantir a independência em atividades do dia a dia. Nesta área, a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais – APAE é pioneira no Brasil, promovendo atenção integral a indivíduos com deficiência intelectual e múltipla (APAE, 2019).

Considerando dados epidemiológicos específicos para a região de Maringá (Paraná), um estudo realizado no ano de 2012 por ALMEIDA et al. (2013) em um laboratório privado de Maringá identificou, em uma mostra de 202 pacientes, um total de 32 (15,8%) pacientes com alterações cromossômicas, sendo 23 (71,8%) numéricas e 9 (28,1%) estruturais. A Síndrome de Down foi responsável por 66% das confirmações de alterações numéricas observadas neste estudo, dados compatíveis com a maior prevalência desta síndrome sobre outros tipos de alterações cromossômicas numéricas apontada pela literatura médica.

Dada a importância do diagnóstico laboratorial preciso para o adequado seguimento e acompanhamento da evolução clínica esperada em cada anomalia genética e frente à dificuldade de acesso da população às ferramentas necessárias para obtenção destes resultados no âmbito da saúde pública, objetivamos fornecer aos participantes do estudo, com suspeita clínica e sem diagnóstico definitivo ou subdiagnosticados, a pesquisa de aneuploidias cromossômicas numéricas no exame de cariótipo por bandeamento G e/ou da presença de cromossomo X-Frágil através da reação em cadeia da polimerase para o gene FMR1, quando houver indicação para estes exames por suspeita clínica. Além disso, será possível produzir dados epidemiológicos a partir dos resultados, que têm o potencial de contribuir para o planejamento de políticas públicas assertivas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho consiste em um estudo transversal, de caráter clínico e experimental, realizado em parceria com a UBS Aclimação – Maringá, Hospital Metropolitano de Maringá, Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Mandaguçu (PR) e o Laboratório de Genética Humana da Universidade UniCesumar.

O estudo seguiu os encaminhamentos solicitados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UniCesumar, seguindo a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde, onde foi deferido (CAAE:). Assim, todos os participantes voluntários que concordaram em participar da pesquisa foram informados de maneira clara e concisa sobre todos os procedimentos e, ao ler, assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e/ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, caso tenham entre 11 a 18 anos.

As coletas de sangue periférico foram realizadas nas dependências do Laboratório de Genética Humana, bem como o cultivo de linfócitos, respeitando as recomendações de Melo et al. (2010), coletado 5 mL de amostra por sistema à vácuo em tubo heparina (LABOR IMPORT®) de cada doador. Todos os tubos foram identificados corretamente com as informações dos voluntários e, em seguida, levados ao fluxo laminar para o preparo do cultivo celular.

Para o cultivo de linfócitos, foi preciso adaptar e comparar dois protocolos modificados da metodologia proposta pelo laboratório de Citogenética Humana da UNICAMP/SP (técnica modificada de Moorhead et al., 1960). As principais mudanças entre os protocolos foram o tempo de exposição à colchicina, a quantidade de reagentes e de material biológico no preparo do cultivo, além da duração da etapa de hipotonia, a fim de



umentar a quantidade de metáfases apresentadas e o alongamento dos cromossomos. Assim, todas as lâminas passaram por visualização em microscopia óptica na objetiva de 40X e 100X com óleo de imersão, para contagem e/ou análise de 20 metáfases por paciente.

As amostras de swab oral, por sua vez, foram processadas adequadamente e submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene FMR1 para pesquisa e diagnóstico molecular da Síndrome do Cromossomo X-Frágil (SXF).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados parciais obtidos até o momento na execução desta pesquisa consistem na realização de 39 exames de cariótipo por bandeamento G e 6 exames de PCR do gene FMR1 para pesquisa de cromossomo X-Frágil. Com relação ao cariótipo, obtivemos 21 dos 39 exames com resultado dentro dos padrões da normalidade, e dentre os 18 exames onde foram constatadas anormalidades, estão incluídas alterações compatíveis com a Síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21), mosaicismo do cromossomo 21 e mosaicismo do cromossomo 22. Com relação aos exames de PCR, por sua vez, obtivemos 5 resultados nos padrões da normalidade e 1 resultado positivo para cromossomo X-Frágil.

Nossos resultados, ainda que preliminares, vão ao encontro da prevalência esperada para as anomalias cromossômicas numéricas, sendo a trissomia do cromossomo 21 a anomalia mais frequentemente observada em nascidos vivos (ASIM et al., 2015).

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esperamos que os resultados obtidos pelo presente trabalho contribuam para a compreensão do perfil epidemiológico, otimização de políticas públicas e do atendimento às demandas específicas para o adequado desenvolvimento dos portadores de síndromes genéticas.

### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. C.; MACENTE, S.; OLIVEIRA, K. B. Frequência de anormalidades cromossômicas em indivíduos atendidos em um laboratório de análises moleculares em Maringá – PR. Maringá: **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 3, p. 431-437, set./dez. 2013.

APAE. **Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais**. Quem Somos? Disponível em: <<http://maringa.apaepr.org.br/>>. Acesso em 20 de Março de 2019.

ASIM, A.; KUMAR, A.; MUTHUSWAMY, S.; JAIN, S.; AGARWAL, S. Down syndrome: an insight of the disease. [S.l.]: Journal of biomedical science, v. 22, n. 1, 2015.

HUNTER, J. E. *et al.* FMR1 Disorders. **GeneReviews National Center for Biotechnology Information**, 1993-2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>>. Acesso em 22 de Agosto de 2023.



NUSSBAUM, Robert L. **Thompson & Thompson genética médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SHERMAN, S.; PLETCHER, B. A.; DRISCOLL, D. A. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. [S.l.]: **Genet Med**, v. 7, p. 584-587, 2005.