

ANÁLISE DE CARIÓTIPOS DE PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN SEM DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO

Ana Carolina Soares Avelar¹; Andressa Dalólio Valente²; Mariane Castardo Araujo³; Ana Maria Silveira Machado de Moraes⁴; Marcela Funaki dos Reis⁵; Clarissa Torresan⁶.

¹Acadêmica do Curso de Medicina, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Participante do PIC. ana_carolinavelar@hotmail.com.

²Acadêmica do Curso de Biomedicina, UNICESUMAR. andressa.dalolio@gmail.com.

³Graduada em Ciências Biológicas, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. castardomari96@gmail.com

⁴Colaboradora, Doutora, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. ana.machado@unicesumar.edu.br

⁵Coorientadora, Doutora, Departamento de Biomedicina, UNICESUMAR. marcela.reis@unicesumar.edu.br

⁶Orientadora, Doutora, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. clarissa.torresan@unicesumar.edu.br

RESUMO

A Síndrome de Down (SD) é causada por uma alteração cromossômica conhecida e estudada em âmbito mundial devido a sua grande incidência. Os portadores da síndrome possuem características físicas comuns, como: estatura baixa, hipotonia generalizada, língua proeminente, olhos pequenos semelhantes aos de origem oriental e cabeça arredondada com crânio reduzido. A síndrome pode ser causada por trissomia livre do cromossomo 21, por translocação Robertsoniana ou ainda por mosaïcismo genético. A análise do cariótipo dos indivíduos com SD e, em caso de presença de translocação, a de seus progenitores também, é fundamental para o aconselhamento genético. O objetivo desse trabalho é fornecer o laudo citogenético a indivíduos clinicamente diagnosticados com SD, bem como identificar se existem portadores de translocação cromossômica, encaminhando-os para o aconselhamento genético. Serão coletadas amostras de sangue de alunos da Associação de Pais e Amigos (APAÉ) de Maringá, que possuem diagnóstico clínico de SD, e realizado o cariótipo por bandeamento G. Espera-se com o presente trabalho fornecer os laudos citogenéticos aos alunos com SD, bem como identificar possíveis casos com translocação cromossômica.

PALAVRAS-CHAVE: Aconselhamento genético; Trissomia do 21; Translocação.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD) é uma doença genética de alta prevalência mundial e representa a causa mais comum de deficiência intelectual na população em geral, ocorrendo em 1 a cada 700 nascidos vivos (CUNHA et al., 2010).

A SD possui características fenotípicas comuns entre seus portadores, destacando-se braquicefalia, boca pequena, olhos puxados, cabeça arredondada, base nasal achatada, hipoplasia da região mediana da face e baixa estatura (BRUNONI, 2013).

O comprometimento intelectual é a consequência mais deletéria da SD (MUSTACCHI, 2000). KOREMBERG et al (1994) consideram a deficiência intelectual uma característica patognomônica na SD, assim como BENDA (1960), que reforça a denominação e a define como uma forma específica de deficiência intelectual associada a certas características fenotípicas da SD.

A síndrome, caracteriza-se pela presença de um cromossomo 21 extra em seus portadores. Pode ser causada por vários mecanismos genéticos, sendo o principal (95% dos casos) a trissomia do cromossomo 21, como resultado da não-disjunção cromossômica durante a divisão celular, mais comum em mães idosas (SILVA; DESSEN, 2002).

A translocação cromossômica é responsável por 5% dos casos. Nestes, o cromossomo 21 adicional está localizado junto a um outro cromossomo autossômico, sendo a mais comum a translocação robertsoniana existente entre os cromossomos 14 e 21.

Nos casos de translocação, existe a possibilidade de um dos progenitores ser portador da mesma, seja ela recebida de gerações anteriores ou por erro na gametogênese. Como a translocação é uma alteração cromossômica balanceada, seus portadores não são afetados e nem apresentam qualquer tipo de característica clínica. Mais comumente, observa-se a transmissão da translocação por mães jovens e de fenótipo normal. Contudo, a análise do cariótipo dessas mães revela um cromossomo (geralmente o 14 ou 15) com um segmento sobreposto, que é o material do cromossomo 21 extra. Assim, essas

mulheres podem gerar um filho portador de translocação não balanceada, que vai caracterizar a SD, e seu cariótipo apresentará um cromossomo translocado recebido do óvulo (SILVA; DESSEN, 2002).

Dessa forma é essencial conhecer o cariótipo dos indivíduos com SD e, em caso de presença de translocação, o de seus progenitores também, pois o aconselhamento genético segue de forma diferenciada. Em progenitores jovens, se um deles possuir a translocação, a probabilidade de ter outro filho e síndrome de Down é de 20% a 25% (exceto translocação equilibrada 21/21) (MUSTACCHI, 2000).

A síndrome afeta consideravelmente a vida do portador. Contudo, há tipos de mutações que podem ser previstas. Portanto, o presente trabalho busca fornecer o laudo citogenético para diferenciar o tipo de mutação cromossômica responsável pela SD e encaminhar para o aconselhamento genético, quando necessário. O aconselhamento genético é fundamental para a família portadora da translocação, a fim de prevenir a SD na geração subsequente. Ademais, não há em Maringá um centro para realização do exame citogenético, assim o Laboratório de Biologia Molecular da Unicesumar pode auxiliar no diagnóstico e aconselhamento de inúmeros portadores e se tornar uma referência municipal. Logo, o objetivo do presente trabalho é realizar a análise citogenética dos alunos da Associação de Pais e Amigos de Maringá (APAE), diagnosticados clinicamente com SD, mas que não possuem laudo citogenético confirmando a causa cromossômica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa tratou-se de um estudo transversal de caráter clínico e experimental realizado em parceria com a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Maringá, Liga Acadêmica de Genética Médica de Maringá-LAGeM, e o Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Cesumar – UniCesumar. Foram inclusos na pesquisa os alunos que possuíam características fenotípicas da SD e que foram clinicamente diagnosticados com SD. O número de alunos sem laudo citogenético, diagnosticado clinicamente com SD foi obtido por um estudo realizado em 2018 pelo grupo de pesquisa de análise citogenética e molecular da biodiversidade. Foram encontrados 40 pacientes diagnosticados clinicamente com SD, mas sem confirmação da SD por exame específico, e 38 pacientes diagnosticados clinicamente para SD, mas que não souberam informar se possuíam laudo citogenético. O total de pacientes (78) será dividido com outro projeto do mesmo grupo de pesquisa, para otimizar a análise citogenética e aumentar número de amostras analisadas conforme as demandas laboratoriais.

Dessa forma, se iniciou o treinamento de todos os membros da pesquisa para coleta sanguínea e para a realização das funções de acordo com as técnicas laboratoriais e de biossegurança do laboratório de Biologia Celular da Unicesumar. Logo após, foi executada a etapa de padronização do cultivo de linfócitos, que se baseou em alguns testes descritos a seguir. O protocolo base utilizado para o cultivo de linfócitos para cariótipo humano se baseou na técnica modificada de Moorhead et al. 1960, com créditos ao laboratório de citogenética humana da UNICAMP. A padronização do cultivo de linfócitos e da fixação em lâminas de microscopia está finalizada. A próxima etapa será a análise por Bandeamento G e assim o início das coletas com os alunos da APAE. O Bandeamento G para humano e outros mamíferos será realizado conforme o manual de citogenética de GUERRA e SOUZA, 2002. Serão utilizadas lâminas preparadas com cultivo em estufa a 40 °C por 24 horas e se reduzirá o tempo de tratamento com tripsina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os testes foram realizados com concentrações fixas de 1 ml de soro albumina fetal, 1 ml de sangue total e 3,8ml de solução RPMI 1640, com variação de fitohemaglutina e tempo de aplicação da colchicina.

Na figura 1, observa-se à direita um aumento menor de 4x e à esquerda evidenciado no aumento de 40x. No teste denominado T1 (figura1) foi utilizado a concentração de 200 μL de fitohemaglutina e aplicação de 50 μL de colchicina a 71 horas de cultivo que estimularam as mitoses das células sanguíneas. No entanto, a técnica de preparação da lâmina não permitiu o espalhamento necessário para a individualização dos cromossomos impossibilitando a contagem dos cromossomos metafásicos. Na figura 2 realizou-se o teste T2 a concentração de 150 μL de fitohemaglutina e aplicação de 50 μL de colchicina a 71 horas e 10 minutos de cultivo estimularam as mitoses das células sanguíneas. Nesse teste, também não foi possível o espalhamento necessário para a individualização dos cromossomos.

Por fim, realizou-se um teste T3 (figura 3) que se observa à direita no aumento de 4x e à esquerda no aumento de 40x da região setada. No teste T3 a concentração de 200 μL de fitohemaglutina e aplicação de 50 μL de colchicina a 71 horas e 20 minutos de cultivo estimularam as mitoses das células sanguíneas. A técnica de preparação da lâmina permitiu o espalhamento necessário para a individualização dos cromossomos realizando a contagem dos 46 cromossomos metafásicos compatível com amostra de controle negativo.

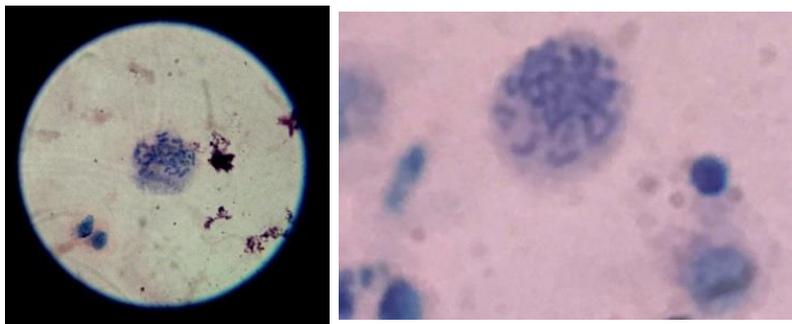


Figura 1: Linfócito em metáfase durante a aplicação do teste T1
Fonte: Dados da pesquisa.

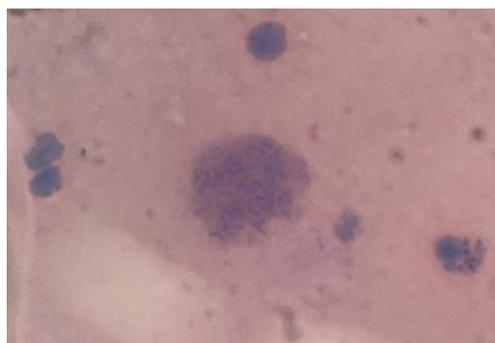


Figura 2: Linfócito em metáfase durante a aplicação do teste T2.
Fonte: Dados da pesquisa.

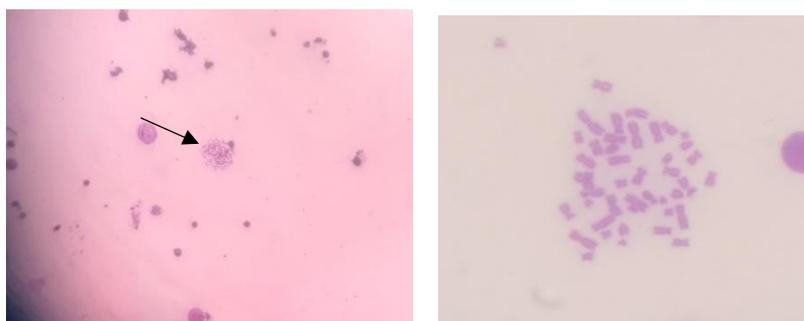


Figura 3: Linfócito em metáfase durante a aplicação do teste T3.

Fonte: Dados da pesquisa.

Dessa forma, pode-se constatar que nos testes realizados, as concentrações de colchicina se mantiveram em 50 μL , e as de fitohemaglutinina variaram de 150 a 200 μL . O tempo de aplicação de colchicina variou de 40 a 60 minutos, sendo o tempo de repouso ideal atingido o de 72 horas de cultivo à 37°C, com aplicação de colchicina a 40 minutos. Como resultado final, chegamos ao protocolo otimizado com as seguintes concentrações: colchicina 50 μL e fitohemaglutinina 200 μL . Contudo, no presente protocolo, a fitohemaglutinina deve ser aplicada juntamente com o 1 ml sangue total. Além do que, o pH da solução foi medido e ajustado sempre depois de retirar do banho maria durante a hipotonia e antes de aplicar fitohemaglutinina e sangue, e se houver variação de pH, esse deve ser ajustado para 7.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se com esse projeto a importância em realizar análise citogenética para o fornecimento do laudo citogenético aos alunos da APAE, diagnosticados clinicamente com SD. A obtenção de um laudo citogenético permitirá a realização de um aconselhamento genético mais informativo ao paciente e seus familiares, além de propiciar aos pacientes o laudo necessário para benefícios oferecidos pelo Governo Federal.

5 REFERÊNCIAS

BENDA, C. E. The Child with Mongolism (Congenital Acromicria). **New York:Grune;** 1960.

BRUNONI, D.; PEREZ, A. B. A. **Guia de genética médica.** Barueri, São Paulo: Manole, 2013.

CUNHA, A.; BLASCOVI-ASSIS, S.; FLAMENGGHI JR., G. Impacto da notícia da síndrome de Down para os pais: histórias de vida. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 2, p. 444-51, 2010.

GUERRA; M.; SOUZA, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, 2002, 132p.

KOREMBERG, J. R; CHEN, X. N; SCHIPPER, R.; SUN, Z.; GONSKY, R.; GERWEHR, S.; et al. Down syndrome phenotypes: The consequences of chromosomal imbalances. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994

MOORHEAD, P.S.; NOWEL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v.20, p.613-616, 1960

MUSTACCHI, Z. Síndrome de Down. In: MUSTACCHI, Z.; PERES, S. (Org.). Genética baseada em evidências - síndromes e heranças. **São Paulo: CID** editora, 2000. Cap. 21.

SILVA, N.L.P.; DESSEN, M.A. Síndrome de Down: etiologia, caracterização e impacto na família. **Interação em Psicologia**, Brasília, DF, v.6, n.2, p.167-176, 2002.