
ARTIGO ORIGINAL

Citogenética de casais inférteis

Ludmila Serafim de Abreu¹, Elza Maria Prestes Sartorelli², Dra. Eliana Ternes Pereira²

Resumo

Introdução: A infertilidade é a ausência de gravidez, por um ano ou mais, em um casal jovem e saudável, com vida sexual ativa, sem o uso de medidas anticonceptivas. Aberrações cromossômicas podem explicar a infertilidade ou recorrência de perda gestacional. Homens e mulheres inférteis têm maiores riscos de serem portadores de alguma anomalia cromossômica. A detecção dessa anomalia é de fundamental importância para o diagnóstico da infertilidade, o aconselhamento genético, o tratamento, quando possível, e os cuidados adequados na gestação.

Objetivos: Analisar citogeneticamente indivíduos com anomalias na gametogênese masculina ou feminina e casais que relataram abortos espontâneos, caracterizar o tipo de aberrações cromossômicas encontradas orientar o casal para aconselhamento genético antes da decisão reprodutiva e antes da inclusão do mesmo em algum procedimento de reprodução assistida.

Metodologia: Os indivíduos foram selecionados nos Ambulatórios de Genética e de Infertilidade do HU-UFSC. A análise citogenética foi obtida pela cultura de linfócitos do sangue periférico, sendo realizadas técnicas de banda G e banda C.

Resultados: Foram estudados: seis casais com história de abortos espontâneos, uma paciente com amenorréia secundária, e um paciente com oligospermia. Foram encontradas aberrações cromossômicas em duas mulheres, uma com a translocação Robertsoniana (14;15) e outra com translocação envolvendo a região distal de dois cromossomos X.

Conclusões: O estudo confirmou a importância de exames citogenéticos em mulheres com amenorréia

secundária e em casais com história de abortos de repetição.

Descritores: 1. Infertilidade;
2. Anomalias cromossômicas;
3. Aconselhamento genético.

Abstract

Background: Infertility is the absence of pregnancy during one year or more in a young and healthy couple, with an active sexual life and without the use of contraceptive. Chromosomal abnormalities can explain the infertility or miscarriage, therefore infertile male and female have an increased risk to carry a chromosomal abnormality. Detection of such an abnormality is of fundamental importance for the diagnosis of infertility, the genetic counseling, a possible treatment, and an appropriate care during pregnancy.

Methodology: The patients were selected from the Outpatient Genetic and Infertility at HU-UFSC. The cytogenetic analysis was carried out on a lymphocytes culture of peripheral blood with GTG and CBG banding.

Results: Were studied: six couples who had at least two or more spontaneous abortions, one woman with secondary amenorrhea, and one man with oligospermia. Chromosomal abnormalities were detected in two women. One with a Robertsonian translocation (14;15) and one with a translocation involving the distal region of two X chromosomes.

Conclusions: The study demonstrated the importance of the cytogenetic studies in woman with secondary amenorrhea and in couples with repeated abortions.

Key Words: 1. Infertility;

¹Bióloga, UFSC

²PhD, UFSC

2. *Chromosomal abnormalities;*
3. *Genetic counseling.*

Introdução

A infertilidade é a ausência de gravidez, por um ano ou mais, em um casal jovem e saudável, com vida sexual ativa, sem uso de medidas anticonceptivas. Ela abrange tanto a incapacidade de conceber quanto de manter uma gravidez até o nascimento de uma criança viva, normal. Pode decorrer de uma variada gama de fatores, incluindo tanto o parceiro masculino quanto o feminino. Em aproximadamente 20% dos casais inférteis a causa da infertilidade não é esclarecida apesar das investigações clínicas¹. Pode-se, então, suspeitar da origem genética da infertilidade nesse grupo devido a fatores cromossômicos ou gênicos².

Os cariótipos anômalos nos abortos podem explicar a infertilidade ou recorrência de perda gestacional. Quando as anomalias ocorrem na linhagem germinativa, os cromossomos anormais podem ser segregados nos gametas e transmitidos à prole. Nos casos de translocação equilibrada em um dos membros do casal pode ocorrer dificuldades na meiose até o bloqueio da gametogênese ou a formação de gametas não equilibrados^{3, 4, 5, 6, 7, 8}.

As translocações equilibradas (paternas ou maternas) podem interferir com o pareamento ou disjunção dos cromossomos na meiose, formando gametas não-equilibrados, sendo consideradas como um dos mecanismos de infertilidade^{9, 10, 11}.

Casais que relatam aborto de repetição têm risco aumentado de apresentarem anomalias cromossômicas estruturais, principalmente as translocações recíprocas e inversões. Essas alterações, na grande maioria das vezes, não são evidenciadas no portador e só são detectadas após o nascimento de filhos não-equilibrados. Análises citogenéticas de casais que se submeterão a ICSI também são essenciais para as famílias, para os conselheiros genéticos e para os centros de reprodução assistida.

A evidência de condições genéticas que podem levar à constituição de um zigoto não-equilibrado corrobora a importância do aconselhamento genético para casais atendidos no tratamento de reprodução assistida.

A preocupação com a utilização de técnicas de reprodução assistida sem a avaliação citogenética prévia do casal é que elas podem ocultar alterações cromossômicas nos pais e propagar anomalias genéticas

às próximas gerações¹⁰. O estudo citogenético de ambos os pais é uma prioridade essencial e deve preceder qualquer utilização de técnica de reprodução assistida¹²

O objetivo desse trabalho foi analisar o cariótipo de indivíduos do sexo masculino, com diagnóstico de azoospermia ou de oligospermia severa, indivíduos do sexo feminino com diagnóstico de amenorréia primária ou secundária e casais que relataram abortos espontâneos com a finalidade de aconselhamento genético.

Metodologia

Foram identificados indivíduos com histórico de infertilidade, atendidos nos Ambulatórios de Infertilidade e de Genética do Hospital Universitário-UFSC. Os prontuários dos pacientes foram analisados para coleta de dados de histórico e de exame físico coletados nos ambulatórios. Foram avaliados a história menstrual, a presença de oligospermia ou azoospermia e casais com história de abortos de repetição. O exame citogenético foi realizado nos pacientes que concordaram com a avaliação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFSC em reunião do dia 25/04/2005 conforme o anexo de nº 10.3.

A cultura de linfócitos de sangue periférico foi efetuada segundo técnica descrita por Moorhead e colaboradores¹³. O material foi obtido a partir da punção venosa de sangue periférico.

Para a obtenção de bandas para análise de aberrações cromossômicas, a banda G foi obtida com tripsina, segundo metodologia descrita por Seabright¹⁴. Análise de banda C foi realizada quando necessário para esclarecer situações específicas, de acordo com a metodologia descrita por Salamanca & Armendares¹⁵.

Foram analisadas, no mínimo, 20 metáfases por paciente. Na suspeita de mosaïcismo cromossômico foram analisadas 50 metáfases. Em caso de aberrações cromossômicas, as metáfases foram fotografadas em microscópio óptico.

A nomenclatura utilizada foi descrita no manual An International System for Human Cytogenetic Nomenclature¹⁶.

Resultados

No período de janeiro de 2006 a junho de 2007 foram selecionados 6 casais devido a dois ou mais abortos de

repetição, 1 indivíduo do sexo feminino com amenorréia secundária e 1 do sexo masculino que apresentava oligospermia severa (Tabela I). Todos os pacientes foram atendidos em ambulatórios do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Para a seleção foram analisados 67 prontuários do Ambulatório de Infertilidade e, sendo selecionados 28 pacientes, dos quais foram estudados 5 casais e um homem oligospermico. Do ambulatório de Genética, foram selecionados 1 casal e uma paciente com amenorréia secundária. Dos pacientes selecionados, 14 assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram incluídos na investigação citogenética.

O estudo citogenético dos 14 indivíduos foi realizado de março a junho de 2007. As análises foram concluídas em todos os pacientes, dos quais 11 apresentaram cariótipo normal, 2 apresentaram anomalias cromossômicas e uma paciente apresentou um polimorfismo cromossômico. As aberrações cromossômicas foram encontradas em indivíduos do sexo feminino.

O cariótipo da paciente A1 demonstrou uma translocação Robertsoniana entre os cromossomos 14 e 15 na região organizadora dos nucléolos (NOR), com perda distal dos braços curtos de cada um dos pares desses cromossomos, sem repercussão fenotípica (Figuras 1 e 2).

A paciente G1, com amenorréia secundária, apresentou duas linhagens celulares, sendo uma com monossomia do cromossomo X em 88% das metáfases analisadas. A outra linhagem, encontrada em 12% das metáfases, demonstrou uma translocação entre dois cromossomos X, com cariótipo 45,X/46,Xt(X;X)(q26q26), apresentando trissomia do segmento Xpter'!Xq26 e monossomia do segmento Xq27'!Xqter (Figuras 3 e 4).

O cariótipo da paciente B1 foi considerado normal, revelando polimorfismo da região de heterocromatina do cromossomo 9 (Figura 5). A tabela II sumariza os resultados citogenéticos deste estudo.

Discussão

Neste estudo, como descrito na literatura, a maioria dos indivíduos apresentou cariótipo normal^{17, 18, 19}.

O cariótipo da paciente A1, apresentando uma translocação Robertsoniana entre os cromossomos 14 e 15, justifica seus abortos espontâneos. Segundo Ohno e colaboradores²⁰, ao estudarem 509 casais com histórico de dois ou mais abortos espontâneos, foram encontrados

26 portadores de aberrações cromossômicas, das quais 10 (3,8%) eram translocações Robertsonianas. Qian e colaboradores²¹, ao analisarem 1.780 indivíduos que relataram abortos recorrentes, encontraram 57 cariótipos anômalos, dos quais, 14 (24,5%) apresentavam translocações Robertsonianas. Os resultados encontrados por esses autores confirmam que translocações Robertsonianas estão presentes em grande parte dos cariótipos anômalos associados com abortos espontâneos. A diferença na frequência das anomalias cromossômicas entre os dois trabalhos^{20,21} possivelmente representa variação na seleção dos pacientes estudados.

Monossomias e trissomias completas dos cromossomos 14 e 15 são incompatíveis com a vida, podendo ser responsáveis por abortos ocultos, onde o produto da concepção é eliminado em algum momento dentro das duas primeiras semanas, produzindo pouca ou nenhuma alteração do ciclo menstrual. No entanto, filhos de portadores de translocações Robertsonianas equilibradas, envolvendo os cromossomos 14 e 15, podem ser normais ou, com menor probabilidade, portadores normais dessa translocação.

A região organizadora dos nucléolos é altamente repetitiva e a sua perda não é deletéria, sendo compensada pela ativação nos outros acrocêntricos normais²².

O cariótipo da paciente G1, 45,X/46,Xt(X;X)(q26q26), explica a ocorrência de amenorréia secundária e, conseqüentemente, sua infertilidade. A paciente não desenvolveu o fenótipo da Síndrome de Turner, apesar de possuir a linhagem 45,X. Isso possivelmente se explica pela presença de 3 cópias do gene SHOX (short stature homeobox) nas células que continham o cromossomo anômalo, uma vez que este não esteja sujeito à inativação. A haploinsuficiência do gene SHOX, localizado na região pter'!p22.33 do cromossomo X, está associada ao retardo de crescimento observado em portadoras de Síndrome de Turner^{23, 24}. Na literatura, um caso semelhante já foi relatado em uma mulher com cariótipo 45,X/46,X,t(X;X)(q27;q27), que não possuía retardo de crescimento, mas apresentava amenorréia primária e quadro clínico de disgenesia gonadal pura²⁵.

O polimorfismo da região de heterocromatina do cromossomo 9, descrito na paciente B1, pode estar relacionado aos abortos de repetição. Del Porto e colaboradores²⁶ analisaram a relação entre polimorfismos cromossômicos e abortos recorrentes em 257 casais (137 destes com duas ou mais perdas gestacionais) e encontraram apenas a inversão pericêntrica do

cromossomo 9 [inv(9)(p11q12)] como mais freqüente nos casais com perdas gestacionais, sugerindo sua relação causal. Kumar²⁷ corrobora essa possibilidade com o estudo realizado em 757 casais (382 deles com dois ou mais abortos recorrentes), e também sugere que, além do polimorfismo cromossômico inv(9)(p11q13), outras variações do segmento 9qh podem estar relacionadas com abortos recorrentes. Essas evidências não foram conclusivas para o risco de infertilidade e mais observações são necessárias.

Não foram encontradas anomalias cromossômicas no paciente H2, que apresentava oligospermia. Outras condições que também devem ser investigadas são a varicocele, mutações no gene CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) que podem causar agenesia unilateral dos vasos deferentes e microdeleções no braço longo do cromossomo Y. As pesquisas revelam que oligospermia severa e azoospermia não-obstrutiva podem estar associadas à microdeleções no cromossomo Y com prevalências descritas entre 4% a 11%^{28, 29, 30, 31 e 32}.

Como não foram encontradas anomalias cromossômicas em 5 casais que relataram abortos espontâneos, outras causas devem ser investigadas, como fatores imunológicos, hormonais e genéticos.

A fertilidade intrínseca não pode ser restaurada em homens azoospermicos ou em mulheres com ciclos anovulatórios, quando estes têm sua fertilidade afetada por razões cromossômicas. Portanto, a constatação precoce de que a infertilidade é devida a causas cromossômicas é muito importante, pois fornece uma explicação para o insucesso reprodutivo e evita, além do desapontamento, um desgaste físico, psicológico e financeiro, podendo orientar o tratamento da infertilidade para a fertilização *in vitro* com doação de sêmen ou de ovócitos, de acordo com o cônjuge que apresentar a alteração cromossômica³³.

Os portadores de aberrações cromossômicas não deletérias necessitam de aconselhamento genético com informações específicas sobre o tipo de anomalia, sua relevância clínica, sua possível herdabilidade, o risco genético de prole afetada e as possibilidades de diagnóstico pré-natal. Além disso, o esclarecimento de que outros membros da família também podem ser carreadores da mesma anomalia.

Conclusões

O trabalho confirmou a importância de estudos

citogenéticos em casais com história de abortos espontâneos e mulheres com alterações menstruais, assim como a importância da avaliação citogenética como prioridade essencial para casais inférteis que se submeterão a técnicas de reprodução assistida. Um casal bem esclarecido sobre os riscos de doenças genéticas, cromossômicas ou monogênicas, pode tomar uma decisão esclarecida para a sua decisão reprodutiva.

Referências Bibliográficas:

- 1- Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura K. Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility* 2001; 76 908-14.
- 2- Solari AJ. Meiosis, Recombinación y Disyuncion. *Genética e Infertilidad*. In: *Genética Humana - Fundamentos y aplicaciones en medicina*. 2nd ed. Editorial Medica Panamericana: Espanha; 1999.
- 3- Makino T, Tabuchi T, Nakada K, Iwasaki K, Tamura S, Iizuka R. Chromosomal analysis in Japanese couples with repeated spontaneous abortions. *Int J Fertil* 1990; 35,266-70.
- 4- McFadden DE, Friedman JM. Chromosome abnormalities in human beings. *Mutat Res* 1997; 396,129-40.
- 5- Wilkins-Haug LE, Rein MS, Hornstein MD. Oligospermic men: the role of karyotype analysis prior to intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1997; 67,612-4.
- 6- Lawler AM, Gearhart JD. Genetic counseling for patients who will be undergoing treatment with assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 1998; 70,412-3.
- 7- Pao-Lin Kuo. Maternal trisomy 21 and recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 2002; 78,432-3.
- 8- Gekas J, Meens R, Gondry J, Mathieu M, Thepot F. Value of karyotyping women patients of couples referred for sterility. *Gynecol Obstet Fertil* 2003; 31,66-9.
- 9- Martin RH, Spriggs EL. Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY,t(9;13)(q21.1;q21.2) and a review of the literature. *Clin Genet* 1995; 47,42-6.
- 10- Engel W, Murphy D, Schmid M. Are there genetic risks associated with microassisted reproduction? *Hum Reprod* 1996; 11,2359-70.
- 11- Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin

- DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003; 126(1):13-25.
- 12- Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111(3-4):317-36.
- 13- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured From Human Peripheral Blood. *Exp Cell Res* 1960; 20(3): 613-6.
- 14 - Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 1971; 971-2.
- 15- Salamanca F, Aremendares S. C bands in human metaphases chromosomes treated by barium hydroxide. *Ann. Génét* 1974; 17:135 – 6.
- 16- ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Karger. Cytogenetics and Cell Genetic, 1995.
- 17- Sazonova LA, Suskov II. Genetic anomalies in dysmenorrhea and sterility: range and frequency, age-related dependence, mosaicism dynamics. *Genetika* 1983; 19(1):171-173.
- 18- Sasiadek M, Haus O, Lukasik-Majchrowska M, et al. Cytogenetic analysis in couples with spontaneous abortions. *Ginekol Pol* 1997; May;68(5A):248-52.
- 19- Basaran S, Engur A, Aytan M, et al. The results of cytogenetic analysis with regard to intracytoplasmic sperm injection in males, females and fetuses. *Fetal Diagn Ther* 2004; Jul-Aug;19(4):313-318.
- 20- Ohno M, Maeda T, Funato T, Yabe N, Matsunobu A, Yoshihara K. Cytogenetic studies in couples with repeated spontaneous abortions. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1989; 41(9):1387-93.
- 21 - Qian WP, Tan YM, Song D, Tan YQ, Lu GX. Cytogenetic study of 1780 cases of spontaneous abortion. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; 30(3):258-60.
- 22- Beiguelman, B. *Citogenética Humana*. 1982.
- 23- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A. et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 1997; 16:54–63.
- 24- Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, et al. Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3):1402-6.
- 25- Mirzayants GG, Baranovskaya LI. X-X translocation in a patient with gonadal dysgenesis and the problems of phenotype-karyotype correlations. *Hum Genet* 1978; 16;40(3):249-57.
- 26- Del Porto G, D'Alessandro E, Grammatico P, Coghi IM, DeSanctis S, Giambenedetti M, et al. Chromosome heteromorphisms and early recurrent abortions. *Hum Reprod* 1993; 8(5):755-8.12(2):108-11.
- 27- Kumar R. Role of chromosome heteromorphism in early recurrent miscarriages in the Middle East. *J Obstet Gynaecol* 1997 ;17(4):390-3.
- 28- Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endoc Rev* 2001; 22(2):226-39.
- 29- Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17(1):13-6.
- 30 - Carrara RCV, Yamasaki R, Mazucatto LF, Veludo MAL, Sartorato EL, Pina-Neto JM. Somatic and germ cell cytogenetic studies and AZF microdeletion screening in infertile men. *Genet Mol Biol* 2004; 27(4):477-82.
- 31- Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1):152-6.
- 32- Jia YF, Wu AH, Qiu Y, Qu JY, Song CZ. Azoospermia factor microdeletions in idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2006; 12(2):108-11.
- 33- Farah LMS. (1999) *Medicina Reprodutiva no século XXI, Congresso do Fertility, Centro de Fertilização Assistida*. <http://www.fertility.com.br>

Tabela I – Caracterização dos indivíduos

Indivíduos	Indicação	Nº de concepções	Nº de partos	Nº de abortos
A1 ¹ ,A2 ²	aborto de repetição	3	0	3
B1 ¹ ,B2 ²	aborto de repetição	2	0	2
C1 ¹ ,C2 ²	aborto de repetição	4	1	3
D1 ¹ ,D2 ²	aborto de repetição	4	1	3
E1 ¹ ,E2 ²	aborto de repetição	4	1	3
F1 ¹ ,F2 ²	aborto de repetição	5	2	3*
G1 ¹	amenorréia secundária	0	0	0
H2 ²	oligospemia severa	0	0	0

*Os 3 abortos relatados pela paciente ocorreram com o novo companheiro.

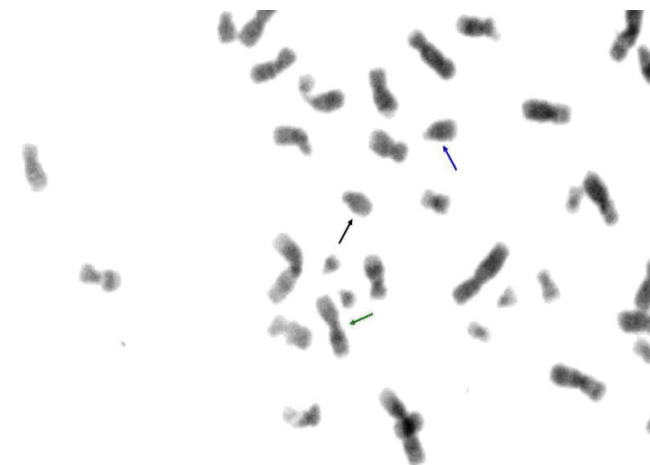
1[†] - sexo feminino

2[‡] - sexo masculino

Tabela II – Cariótipos encontrados nos pacientes

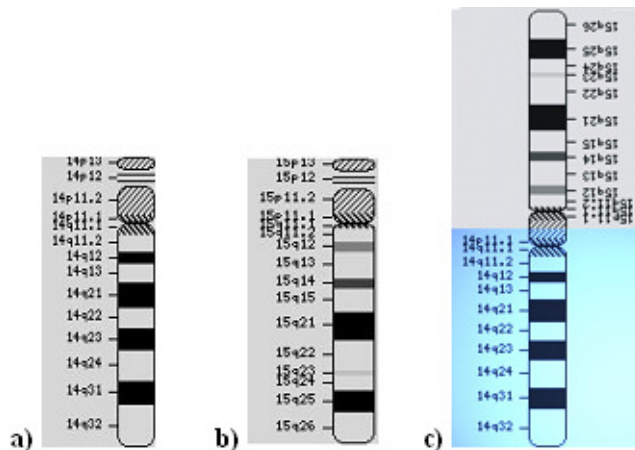
Indivíduos	Cariótipo
A1	45,XX,t(14;15)
A2	46,XY
B1	46,XX,9qh+
B2	46,XY
C1	46,XX
C2	46,XY
D1	46,XX
D2	46,XY
E1	46,XX
E2	46,XY
F1	46,XX
F2	46,XY
G1	45,X/46,XX,t(Xq;Xq)
H2	46,XY

Figura 1: As setas azul e preta indicam, respectivamente, os cromossomos 14 e 15. A seta verde indica a translocação 14p;15p (Banda G).



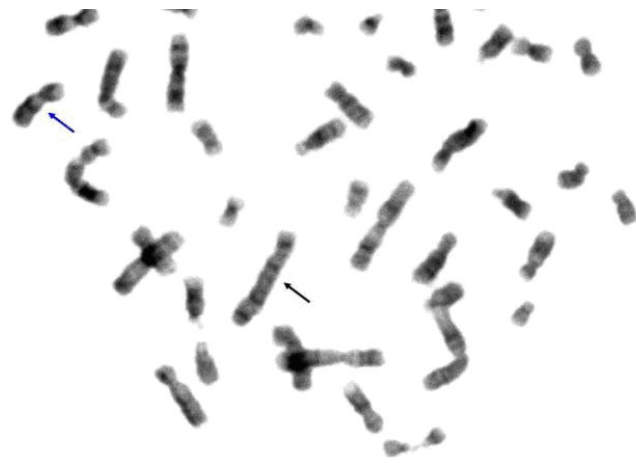
Metáfase parcial com cariótipo 45,XX,t(14p;15p)dic observado na paciente A1

Figura 2: Os ideogramas a e b representam, respectivamente, os cromossomos 14 e 15. O ideograma c representa a translocação 14p;15p, sendo que a região azul indica o segmento translocado do cromossomo 14.



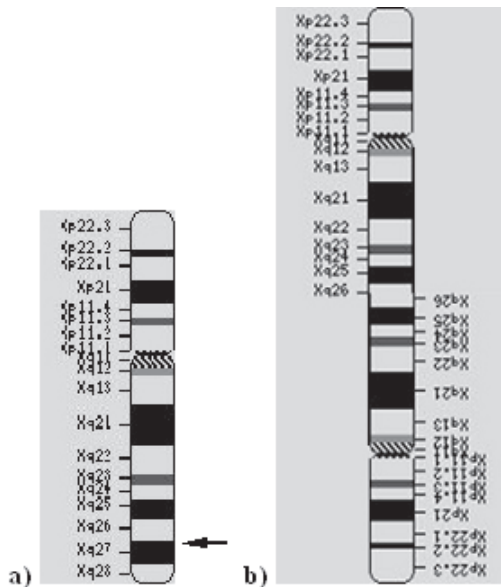
CARIÓTIPO: 45,XX,t(14;15)

Figura 3: As setas azul e preta indicam, respectivamente, o cromossomo X normal e o cromossomo X translocado (Banda G).



Metáfase parcial com cariótipo 46,X t(Xq;Xq) observado na paciente G1.

Figura 4: Os ideogramas **a** e **b** representam, respectivamente, o cromossomo X normal e o cromossomo X com a translocação **Xpter'! Xcen '!Xq26::Xq26 '!Xcen '!Xpter**. A seta no ideograma **a** indica o possível ponto de quebra do cromossomo X.



CARIÓTIPO: 45,X/46,XX,t(Xq;Xq)

Figura 5: Metáfase parcial com cariótipo 46,XX,9qh+ observado na paciente B1. As setas azul e preta indicam, respectivamente, os cromossomos 9 e 9qh+ (Banda C).



Metáfase parcial com cariótipo 46,XX,9qh+ observado na paciente B1.

Endereço para correspondência:

Dra. Eliana Ternes Pereira

Departamento de Clínica Médica - Hospital
Universitário

Universidade Federal de Santa Catarina - Trindade
Florianópolis - Santa Catarina

CEP: 88040-900

E mail: ludiserafimabreu@gmail.com;
elianatp@hu.ufsc.br