



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

*INVESTIGAÇÃO DE ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS EM PORTADORES DE
NECESSIDADE ESPECIAL DE MANAUS-AM*

Bolsista: Camila Praxedes Campos Borges, CNPq

**MANAUS
JULHO/2011**



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL DO PIBIC 035-2010

***INVESTIGAÇÃO DE ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS EM PORTADORES
DE NECESSIDADE ESPECIAL DE MANAUS-AM***

Bolsista: Camila Praxedes Campos Borges, CNPq
Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia Gross, UFAM
Co-orientador: MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro, UFAM

**MANAUS
JULHO/2011**

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Material e Métodos.....	3
3. Resultados finais	6
4. Discussão.....	11
5. Referências Bibliográficas	14

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Célula metafásica do indivíduo H2, corado convencionalmente com Giemsa evidenciando $2n=46$ cromossomos e cariótipo mostrando número diploide 46, XX (b). Barra igual a 10 μm8
- Figura 2** – Célula metafásica do indivíduo H1(mosaicismo) corada convencionalmente com Giemsa evidenciando $2n=46$ cromossomos (a) e cariótipo mostrando número diploide 47, XY+18 (b). Barra igual a 10 μm9
- Figura 3** – Cariótipo do indivíduo H3 com $2n=46$ em bandamento G(a) e $2n=47$, XY+13 em coloração convencional (b). Barra igual a 10 μm 9
- Figura 4**- Metáfase do indivíduo H16 em coloração convencional com Giemsa mostrando um fragmento de um cromossomo. Barra igual a 10 μm 10
- Figura 5** - Célula metafásica do indivíduo H17(mosaicismo) corada convencionalmente com Giemsa evidenciando $2n=46$ cromossomos (a) e cariótipo mostrando número diploide 45, XY+del18pq (b). Barra igual a 10 μm 10
- Figura 6** – Cariotipo do indivíduo H19 em coloração convencional com $2n=46$, XX e $2n=44$, X0+del18pq. Barra igual a 10 μm 10

Lista de gráficos e tabelas

- Gráfico1- Distribuição dos indivíduos coletados por sexo, e o número dos que não participaram da coleta..... 7
- Tabela 1: Indivíduo, sexo e porcentagem de células com alteração..... 8

1. Introdução

Ao contrário do pensamento comum, as doenças genéticas não são raras, afetando 3% a 7% da população geral (Jorde *et al.*, 2004). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 7,6 milhões de crianças nascem a cada ano com um defeito ou desordem genética grave, sendo 95% delas nos países em desenvolvimento (Marques-de-Faria, 2004). Nestes casos, o médico geneticista precisa abordar o paciente de uma maneira integral, pois as doenças genéticas não são desordens isoladas de um determinado órgão ou sistema e, na maioria das vezes, acarretam um comprometimento permanente, físico e/ou mental, do indivíduo (ASHG, 2001). Na genética médica é possível verificar que rearranjos cromossômicos são eventos comuns entre indivíduos de todas as sociedades e populações humanas e na maioria dos casos ocasionam deficiência física e mental incurável. Como a origem de várias deficiências mentais ainda são motivos de especulação, quando tratamos das crianças portadoras de necessidade especiais em Manaus, o presente trabalho visou integrar as atividades teórico-práticas de citogenética para descobrir e contabilizar os casos de anomalias cromossômicas nas crianças fenotipicamente diagnosticadas como deficientes, matriculadas nas escolas especiais de Manaus, comunicando os futuros profissionais da Medicina com a sociedade dependente do Sistema Público de Saúde.

Esta abordagem é interessante, pois apesar de todas as doenças terem um fundamento genético, com a possível exceção de algumas formas de traumatismos, a (r)evolução da genética na medicina e seus subsequentes benefícios vêm tendo pequeno ou nenhum impacto nos países em desenvolvimento, onde vivem mais de 80% da população mundial (Penehaszadeh, 1993). Não deveria ser assim, pois o ônus de haver doenças geneticamente determinadas nesses países pode ser até mesmo maior do que nos países desenvolvidos (Donnai, 2002). Existem muitos mitos que rondam a especialidade genética médica, mas esta área atualmente é reconhecida oficialmente como uma ciência clínica e laboratorial, refletindo a consciência dentro da classe médica de sua importância na educação e prática de saúde (Thompson *et al.*, 1993).

Atualmente, para mudar o pensamento e as atitudes da grande massa em relação a genética, algumas propostas práticas e condizentes com a realidade brasileira já foram apontadas. Entre elas destacam-se: necessidade de campanhas educacionais sobre fatores de risco para deficiências, como, por exemplo, o controle do uso de álcool por mulheres gestantes; a vacinação contra a rubéola das mulheres em período fértil e o controle do uso de teratógenos, como talidomida, miso-prostol e tretinoína; a conscientização do fato de que de 2% a 3% dos nascimentos geram crianças com defeitos congênitos e que no Sul-Sudeste as anomalias congênitas representam as primeiras causas de mortalidade infantil (como nos países desenvolvidos); o apoio às instituições de atenção aos deficientes para o correto estabelecimento do diagnóstico etiológico e realização adequada do aconselhamento genético não-diretivo; o incentivo para que todas as crianças com defeitos congênitos recebam avaliação genética; a avaliação da genética de todos os casais com perdas reprodutivas e/ou dificuldades de fertilização; e o estímulo para que todas as faculdades da área da saúde abordem os conteúdos de genética médica em seus currículos (Pina-Neto, 2002).

Visando responder a esta última recomendação, os ministérios da Saúde e Educação têm mobilizado esforços no sentido de reorientar o modelo assistencial brasileiro, conforme preconizado pela Reforma Sanitária, entendendo que a consolidação do Sistema Único de Saúde depende, também, da revitalização dos projetos pedagógicos dos cursos de graduação em medicina (Ministério da Saúde, 2006). Para tanto, as Diretrizes Curriculares Nacionais do Curso de Graduação em Medicina preconizam que este deve estar organizado, em sua estrutura curricular, de tal maneira que permita a inserção do aluno em atividades práticas, de complexidade crescente durante a graduação, utilizando vários cenários de aprendizagem, por meio da integração ensino-serviço (Conselho Nacional de Educação/Câmara de Educação Superior, 2001).

Nas universidades, ainda que de forma restrita, a compreensão da genética aplicada à medicina vem substituindo a genética clássica, a qual não é baseada em estudos com humanos. Porém, as disciplinas estão sendo basicamente teóricas, deixando de aproveitar a parte de maior aprendizado, a prática, ou se restringindo a casos vistos nos hospitais-escola. Além disso, o

curso de medicina de uma Universidade Federal incentiva e qualifica um médico generalista que trabalhe com saúde pública a nível de atenção primária e que consiga analisar fatores genéticos e não genéticos, diagnosticando precocemente e diminuindo a sobrecarga do Sistema Público de Saúde, tendo em vista que quando mais rápido é feito o diagnóstico, mais o médico pode prever o desenvolvimento da doença e conseqüentemente indicar o melhor tratamento com menores gastos para o sistema com especialistas e materiais caros.

Diante deste contexto, a prática laboratorial muitas vezes é fundamental para efetuar um diagnóstico preciso a respeito de uma dada característica fenotípica indicadora de alguma síndrome e uma das abordagens imprescindíveis é a citogenética, que efetua o estudo dos cromossomos e sua herança aplicada a prática clínica. As anormalidades cromossômicas, clinicamente significativas, ocorrem em cerca de 1% das crianças nascidas vivas e correspondem a 1% das admissões hospitalares pediátricas e 2,5% das mortes na infância (Kozma, 2007) e também corresponde à 2% das gestações em mulheres acima de 35 anos (Thompson *et al.*, 1993), contudo o excesso ou a ausência de cromossomos de uma célula ou mesmo a presença de anomalias em suas estruturas cromossômicas frequentemente são incompatíveis com a vida, ocorrendo em de cerca de 7% a 8% das fecundações. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi integrar os aspectos teóricos com a prática médica, por meio da determinação do cariótipo de indivíduos portadores de fenótipo deficiente que sugeriram a presença de rearranjos cromossômicos. Ainda, estes dados favoreceram a quantificação de quantos são portadores de anomalias cromossômicas graves no Abrigo Moacyr Alves - Manaus, AM.

2. Material e Métodos

As análises cromossômicas foram efetuadas em indivíduos que moram no Abrigo Moacyr Alves (abrigomoacyralves@hotmail.com). Esta entidade está localizada na rua 7, sem número, bairro da Alvorada, Manaus, AM. O Abrigo Moacyr Alves é uma instituição do Governo do Estado do Amazonas, vinculada à Secretaria de Estado e Assistência Social – SEAS, porém desde 1996 o AMA é administrado pelo NASTA – Núcleo de Amparo Social Tomás de Aquino, por meio de convênio firmado com o Governo do Estado, sendo que a responsável pela instituição concordou livremente em participar do projeto. Esta instituição abriga 50 pessoas, todas diagnosticadas fenotipicamente como deficientes, o que pode caracterizar anomalias genéticas. Nesta instituição contamos com a colaboração da equipe de enfermeiros (Daniela Lima da Costa – Coren/AM 7140 e Victor Manuel Castaño Ramos – Coren/AM 8082) e médica (Danielle da Silva Gomes CRM/AM 5206), os quais nos deram suporte técnico na coleta. Esta pesquisa recebeu autorização da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/ CEP-UFAM CAAE nº 0138.0.115.000-10.

Foi utilizado um *TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO* para o início da pesquisa com estas pessoas. Para obtenção do cariótipo, amostras de sangue (aproximadamente 2 ml) foram retiradas de 28 indivíduos portadores de deficiência que sugerem a ocorrência de rearranjos cromossômicos, cujos responsáveis as indicaram como voluntárias, de qualquer sexo e idade e grupo racial. O sangue foi colocado em seguida em tubo de vacutainer heparinizado, que foi identificado com numeração para que as análises ocorram “às cegas”, sendo a identificação pessoal devidamente referenciada com o número correspondente à preparação cromossômica anotada em um caderno de pesquisa. O vacutainer contendo o sangue foi transportado refrigerado para o Laboratório de Citogenômica Animal (Laca)-UFAM.

As metáfases mitóticas foram obtidas a partir da cultura de linfócitos de sangue periférico, seguindo o protocolo de Moorhead *et al.* (1960) com algumas modificações. Após a coleta, colocou-se o sangue no tubo de vacutainer heparinizado e aguardou-se o tempo necessário para sedimentação das hemáceas (30 minutos). Após este tempo, com outra seringa e agulha 1,5ml de plasma foi retirado e passado para o meio de cultura completo para

cariótipo (RPMI). O conteúdo foi misturado delicadamente e incubado a 37 °C em estufa por 72 horas, em posição inclinada, agitando vagarosamente duas vezes ao dia.

Ao completar 71 horas, foi acrescentado ao meio de cultura 0,03 mL de colchicina à 0,0125%. O frasco foi novamente agitado levemente e recolocado na estufa. Decorrida uma hora, retirou-se o frasco e homogeneizou-se a suspensão que, logo após, foi transferida para um tubo de centrífuga, o qual foi centrifugado a 800 rpm por oito minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se ao tubo 7ml de solução hipotônica KCl a 0,075 M, que foi novamente a estufa à 37 °C por 25 minutos. Logo em seguida foi centrifugado a 800 rpm por 8 minutos e o sobrenadante, descartado. O processo de fixação foi realizado com 7ml de fixador Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) que, novamente, foi a centrifuga à 800 rpm por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e repetiu-se o processo de fixação por mais duas vezes.

A partir da suspensão celular foi efetuada a montagem das lâminas, coloração convencional com giemsa e visualização em microscópio óptico. Para a análise da banda G, um processo de coloração diferencial onde cada par de cromossomos possui um padrão específico de bandeamento sendo 400 bandas por cariótipo haplóide, foi utilizada a técnica de Seabright (1971) em lâminas com envelhecimento de 4 dias a 1 semana. A lâmina foi mergulhada numa solução de tripsina (25mg de tripsina em 40 ml de tampão fosfato pH 6,8), de 3 a 6 segundos. Em seguida a lâmina foi lavada com água destilada e corada com uma solução de Giemsa a 5%, diluída em tampão fosfato pH 6,8 durante 5 minutos.

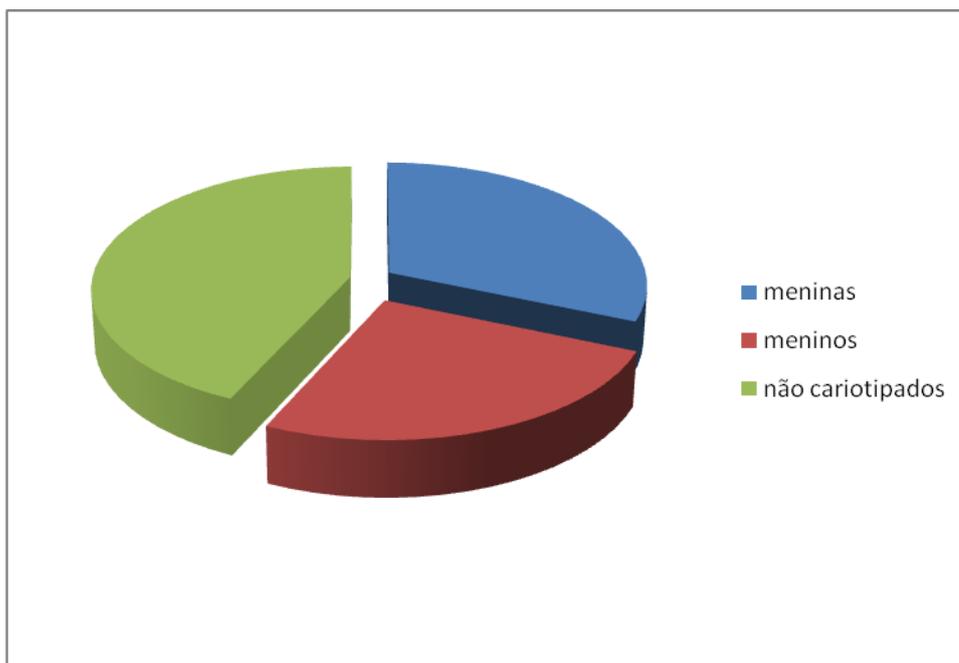
As preparações mitóticas foram analisadas em microscópio óptico comum com objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes). As imagens capturadas através do software Image-PRO MC 6.0 e selecionadas foram editadas no programa Adobe Photoshop CS4. A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a proposta de Levan *et al.* (1964) e separados em categorias, com base na razão de braços cromossômicos e na posição do centrômero, seguindo a padronização internacional da nomenclatura de cromossomos humanos.

Para cada indivíduo foram contadas de 20 a 50 metáfases, exceto em casos de mosaico, os quais contou-se 100 metáfases para que pudéssemos fazer a proporção em 100, o que nos mostra a porcentagem de células diferentes e nos dá a taxa de mosaicismo naquele indivíduo.

3. Resultados finais

Foram efetuadas 31 preparações cromossômicas referentes a 28 indivíduos (três indivíduos tiveram suas preparações efetuadas em duplicatas), restando no abrigo 22 indivíduos não cariotipados neste primeiro momento por não apresentarem características fenotípicas que sugiram a presença de alterações cromossômicas. Dos indivíduos analisados, 13 são meninos e 15 meninas (gráfico 1).

Gráfico1- Distribuição dos indivíduos amostrados por sexo e o número dos que não participaram da coleta.



Dos 28 indivíduos que tiveram suas preparações cromossômicas efetuadas, 23 indivíduos não apresentam alterações cromossômicas visíveis, sendo evidenciado $2n=46$ cromossomos em todas as células (Figura 1a, b). Assim, dos 28 indivíduos deficientes analisados 5 apresentam algum distúrbio numérico de seu cariótipo o que mostra uma frequência relativa de 0.175 (Tabela 1).

Tabela 1: Indivíduo, sexo e porcentagem de células com alteração

Indivíduo	Sexo	Porcentagem de células alteradas
H1	Masculino	11,76% com trissomia do cromossomo 18
H3	Masculino	11,76% com trissomia do cromossomo 13
H16	Feminino	16,6% com fragmentação cromossômica
H17	Feminino	33,3% com monossomia do 18
H19	Masculino	16,66% com duas monossomias (18 e X0)

Dentre estes indivíduos mosaicos, foi encontrado um indivíduo (H1) com trissomia do par 18 em 11,76% das suas células, responsável pelo fenótipo característico da síndrome de Edwards (Figura 2). O indivíduo 3 apresentou uma trissomia do par 13 em 11,76% das suas células, característico da Síndrome de Patau (Figura 3). Já o H16 apresentou uma fragmentação de parte de um cromossomo em 16,6% das células analisadas, cujo cromossomo que sofreu a perda não pode ser encontrado com técnicas citogenéticas clássicas (Figura 4). O indivíduo H17 apresentou monossomia do 18, cujas deleções envolvendo este cromossomos estão relacionadas a retardo mental (Figura 5). O indivíduo H19 apresentou em 16,6% das células analisadas $2n=44$ tendo uma monossomia no cromossomo sexual e no par 18 (Figura 6).

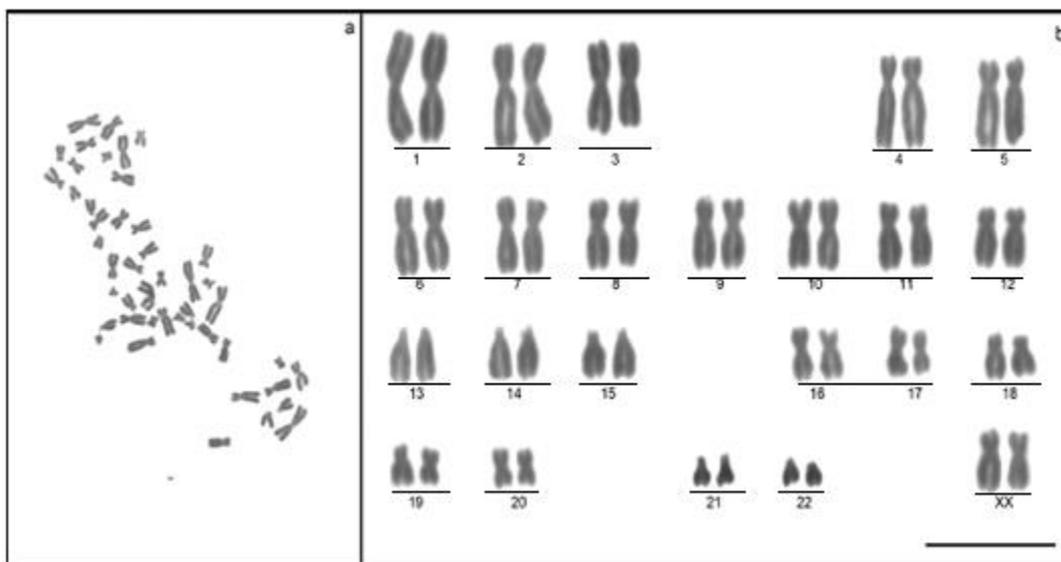


Figura 1 – Célula metafásica do indivíduo H2, corado convencionalmente com Giemsa evidenciando $2n=46$ cromossomos e cariótipo mostrando número diploide 46, XX (b). Barra igual a 10 μm .

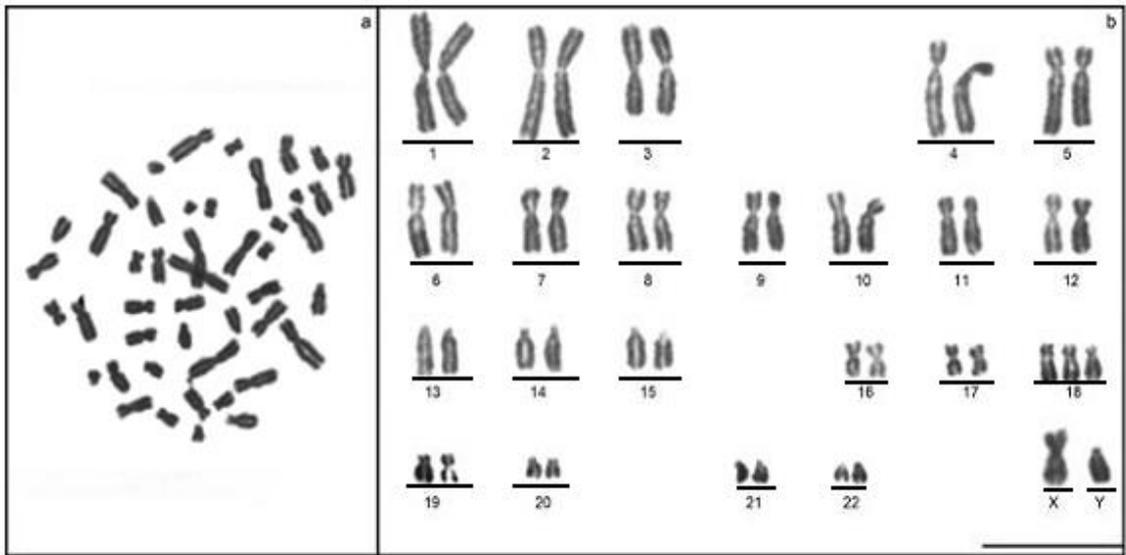


Figura 2 – Célula metafásica do indivíduo H1(mosaicismo) corada convencionalmente com Giemsa evidenciando $2n=46$ cromossomos (a) e cariótipo mostrando número diploide 47, XY+18 (b). Barra igual a 10 μ m.

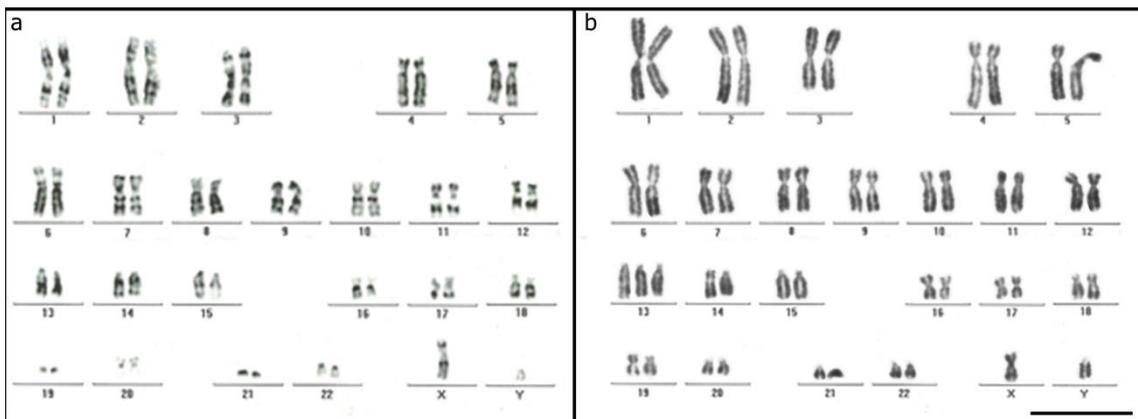


Figura 3 – Cariótipo do indivíduo H3 com $2n=46$ em bandamento G (a) e $2n=47$, XY+13 em coloração convencional (b). Barra igual a 10 μ m.

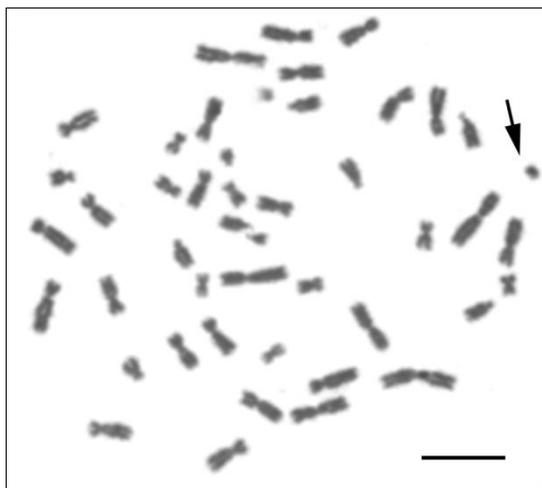


Figura 4- Metáfase do indivíduo H16 em coloração convencional com Giemsa mostrando um fragmento de um cromossomo. Barra igual a 10 μ m.

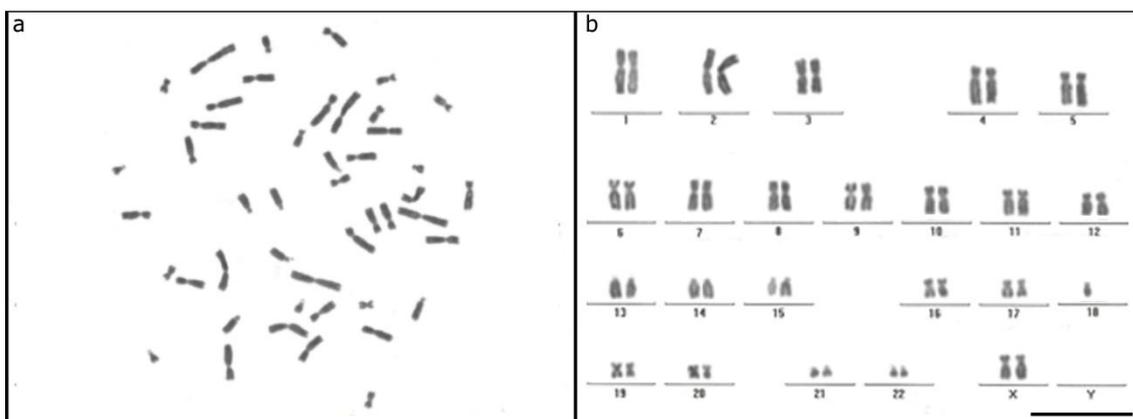


Figura 5 - Célula metafásica do indivíduo H17(mosaicismo) corada convencionalmente com Giemsa evidenciando 2n=46 cromossomos (a) e cariótipo mostrando número diploide 45, XY+del18pq. Barra igual a 10 μ m.

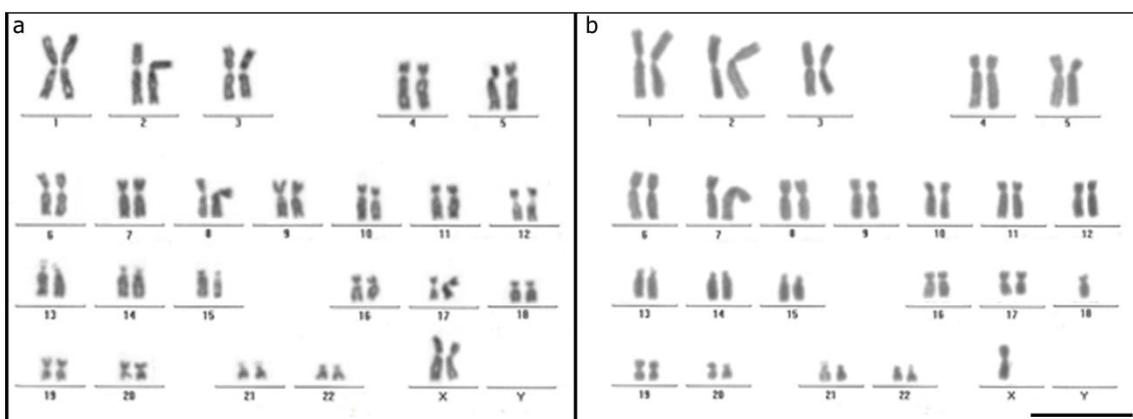


Figura 6 – Cariótipo do indivíduo H19 em coloração convencional com 2n=46, XX e 2n=44, X0+del18pq. Barra igual a 10 μ m.

4. Discussão

As doenças geneticamente determinadas são classificadas em três categorias principais: cromossômicas, monogênicas e multifatoriais, embora, além dessas, duas outras categorias, atualmente devem ser consideradas, as de origem mitocondriais e do distúrbio das células somáticas (câncer) (Della-Rosa *et al.*, 2004).

Como mostrado na tabela 1, cinco indivíduos apresentam algum tipo de aneuploidia, que são distúrbios cromossômicos de qualquer maneira. A taxa de mosaicismos pode ser um fator atenuante para as manifestações clínicas das síndromes geradas por esse excesso ou falta de cromossomos, uma vez que a maioria das aneuploidias totais não é tolerada por humanos, com exceção das trissomias dos cromossomos 13, 18, 21 e sexuais (X e Y); assim como monossomia do X (Mustacchi & Peres, 2001).

Dentre as anomalias cromossômicas numéricas mais comuns estão a Síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21 ou em decorrência de translocações envolvendo os cromossomos 14 e 21) e a Síndrome de Turner (onde o indivíduo portador apresenta apenas um cromossomo sexual, estando o outro homólogo ausente - X0) (Turnpenny & Ellard, 2009). Nenhuma destas síndromes foi observada nos indivíduos analisados.

Outra síndrome bem característica é a Síndrome de Edwards, que é observada em casos de trissomia livre (80%), translocação ou mosaicismos envolvendo o cromossomo 18. Neste último caso, uma linhagem celular apresentará número diploide igual a 47 (contendo o cromossomo 18 trissômico) e uma linhagem celular normal, ou seja, com número diplóide igual a 46. Sua prevalência varia entre 1 em 6.000 a 1 em 8.000 nascimentos e cerca de 95% dos embriões portadores dessa síndrome evoluem para aborto espontâneo ou óbito fetal, nascendo apenas 5%, e sua mortalidade pós-natal é elevada, tendo estes recém-nascidos uma sobrevivência média inferior a uma semana; globalmente, menos de 5% destas crianças atingem o primeiro ano de vida (Young, 2007). Contudo, em indivíduos com mosaicismos os sintomas podem ser atenuados de acordo com o nível de células aneuploides. Apenas um indivíduo (H1) apresentou mosaicismos envolvendo a trissomia do cromossomo

18 e esse paciente apresenta deficiências físicas significativas, microcefalia, hipertelorismo ocular, além de um retardo mental significativo.

Em contrapartida, o indivíduo H17 apresentou monossomia do cromossomo 18, sendo que este distúrbio está relacionado à presença de microcefalia com face achatada e redonda, com ponte nasal, epicanto invertido, entre outras alterações faciais, além de pescoço curto, obesidade leve, cifose leve e lordose, e a presença de traços autistas na criança (Kuczynki, 1996).

A Síndrome de Patau pode ser vista em casos de trissomia do par cromossômico 13 e, além disso, cerca de 20% dos casos resultam de uma translocação não balanceada. A sua incidência foi estimada em cerca de um caso para 5000 nascimentos. Aproximadamente 45% dos afetados falecem após o primeiro mês de vida; 70%, aos 6 meses e somente menos de 5% dos casos sobrevivem mais de 3 anos. A maior sobrevivida relatada na literatura foi a de 10 anos de idade (Mustacchi & Peres, 2001; Young, 2007). O indivíduo H3 apresenta mosaico com células trissômicas para o cromossomo 13 caracterizando Patau. Esse indivíduo apresenta deficiências no desenvolvimento físico e cognitivo, contudo esses sintomas estão atenuados pela presença de células normais em maior número.

Já as aneuploidias dos cromossomos X e Y são relativamente comuns, com uma incidência geral de cerca de 1 em 400 a 500 nascimentos. Os fenótipos associados a estes defeitos cromossômicos em geral são menos graves que aqueles associados aos distúrbios autossômicos e a maior parte dos destes distúrbios cromossômicos caracteriza-se por atraso do desenvolvimento físico e mental e, em geral, várias anomalias de face, membros, sistemas e órgãos (Della-Rosa *et al.*, 2004). Além disso, ainda existe outros tipos de mosaicismo envolvendo os cromossomos sexuais e os sintomas das aneuploidias desses indivíduos vão depender da porcentagem de células contendo o número diploide diferente de 46, como por exemplo, no mosaicismo da Síndrome de Turner 45XO / 46XX que muitos dos estigmas físicos podem ser discretos ou ausentes, em alguns desses pacientes podem ter ciclos menstruais regulares e ovulação, e até mesmo gravidez espontânea, apesar do que a maioria deles acaba na falência ovariana precoce primária (Elsheikh, 2002; Márquez *et al.*, 1993). Contudo, não foi encontrado nenhuma aneuploidia relacionada apenas aos cromossomos sexuais, com exceção do

indivíduo H19 que apresentou duas monossomias (18 e X0) em 16,66% das suas células analisadas e isso pode justificar seu fenótipo deficiente.

Um fato importante encontrado foi um indivíduo (H16) com seu cariótipo com fragmentação cromossômica, porém para se confirmar qual cromossomo foi alvo dessa alteração a técnica de bandeamento G deve ser aplicada. Contudo, essa técnica apresentou baixa reprodutibilidade nas análises efetuadas, sendo que algumas vezes os padrões de bandas foram inespecíficos. Ainda, a análise do bandamento G muitas vezes é efetuado por um software, uma vez que o reconhecimento do padrão de bandas exige um bom treinamento do observador. Tendo em vista que a UFAM não dispõe deste software e que os trabalhos de citogenética humana estão iniciando nesta entidade, foi optado pela não apresentação dos cromossomos bandeados.

Vale ressaltar que os indivíduos deficientes que participam da pesquisa não foram expostos a nenhum risco grave, porém a coleta do sangue pode ter causado uma leve dor na hora e uma pequena mancha roxa que desapareceu em 3 a 4 dias, mas por se tratar de um projeto de pesquisa e não diagnóstico propriamente dito, espera-se que os dados obtidos forneçam um melhor conhecimento das fenótipos/doenças apresentados pelos indivíduos do Abrigo Moacyr Alves. E, por conseguinte, o projeto tem favorecido a interação entre teoria e prática laboratorial aos alunos de Medicina, que poderão vir a se especializar na área Genética Médica, que está em franca ascensão.

Conclui-se então que a frequência de alterações cromossômicas nessa instituição é significativa, e que deve-se incentivar novas pesquisas na área da citogenética para contabilizar o maior número de casos tornando os dados fidedignos para próximas pesquisas que virão. O diagnóstico genético de deficiências ligadas a Síndromes proporciona uma melhor qualidade no tratamento de sintomas futuros, trazendo um retorno para a sociedade que utiliza do sistema único de saúde e conseqüentemente diminuindo os gastos com tratamento de sintomas mais graves.

5. Referências Bibliográficas

- ASHG. 2001. Medical School Curriculum Guidelines Association of Professors of Human and Medical Genetics. 27 de dezembro de 2001. Disponível em <http://www.ashg.org/pages/pubs_curriculum.shtml>. Acesso em: 08 julho de 2008.
- Conselho Nacional da Educação. Câmara de Educação Superior. Diretrizes Curriculares Nacionais para os Cursos de Graduação em Enfermagem, Medicina e Nutrição. Parecer CNE/CES nº 1.133/2001, de 7 de agosto de 2001. Diário Oficial da União. Brasília, 3 out. 2001; Seção E1, p 13.1
- Della-Rosa, V.A.; Moraes, A.M.S.M.M; Mello, R. 2004. Oito Anos de Citogenética Clínica na Universidade Estadual de Maringá: Integrando Ensino e Pesquisa. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. Belo Horizonte.
- Donnai D. 2002. Genetic services.. *Clin. Genet* 61: 1-6.
- Jorde, L.B.; Carey, J.C.; Bamshad, M.J.; White, R.L.; Bases e história. In *Genética Médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 1-9.
- Kozma, C.O. 2007. O que é síndrome de Down. In: Stray-gudensern, K. (Org). *Crianças com síndrome de Down: guia para pais e educadores*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 15-38.
- Kuczynki, E. 1996. Anormalidades cromossômicas esporádica associadas à síndrome autística. *Infanto Rev. Neuropisiq. da Inf. e Adol.* 4(2):26-36.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Marques-de-Faria, A.P.; Ferraz, V.E.; Acosta, A.X.; Brunoni, D. 2004. Clinical genetics in developing countries: the case of Brazil. *Community Genet.*, 7(2/3):95-105.
- Ministério da Saúde. Ministério da Educação. 2006. A aderência dos cursos de graduação em enfermagem, medicina e odontologia às diretrizes curriculares nacionais. Brasília: Ministério da Saúde.
- Moorhead, P.S.; Nowell, P.C.; Mellmam, W.J.; Battips, D.M.; Hungerford, D.A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res* 20:613-616.

- Mustacchi, Z.; Peres, S. 2001. Genética Baseada em Evidências: Síndromes e Heranças. CID Editora, São Paulo, 1299p.
- Penchaszadeh, V.B. 1993. Genetica y Salud Publica. *Bol. of Sanit. Panam.*, 115: 1-11.
- Pina-Neto, J. M. 2002. A Genética Médica e a Saúde Pública. *Jornal do CREMESP*. Edição 176.
- Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 11: 971-972.
- Thompson, M.W.; McInnes, R.R.; Willard, H.F. 1993. Thompson & Thompson: Genética Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Turnpenny, P.; Ellard, S. 2009. Emery: Genética médica. 13a Edição. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 426 p.
- Young, I.D. 2007. Genética Médica. Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 259p.