

Fenótipo de subfertilidade, polimorfismos cromossômicos e falhas de concepção

Subfertility phenotype, chromosome polymorphism and conception failures

Artigo original

Palavras-chave

Aborto habitual
Fertilidade
Polimorfismo genético

Keywords

Abortion, habitual
Fertility
Polymorphism, genetic

Resumo

Objetivo: avaliar a prevalência de alterações citogenéticas e polimorfismos cromossômicos em casais com fenótipo de subfertilidade em uma população brasileira. **Métodos:** foram avaliados 1.236 cariótipos de casais com fenótipo de subfertilidade de dois diferentes centros (público e privado). Esses pacientes foram classificados em dois subgrupos: um com duas ou mais perdas gestacionais, consecutivas ou não, e outro com, ao menos, uma perda gestacional ou ausência de concepção. Os cariótipos foram obtidos com bandamento convencional G e C. As anomalias citogenéticas foram agrupadas e as frequências calculadas segundo a classificação dos pacientes. Quando aplicável, os testes estatísticos de Fisher e análise de Odds Ratio foram empregados. **Resultados:** aproximadamente 25% de todos os casos apresentaram cariótipo anormal, incluindo alterações numéricas e estruturais e também variantes polimórficas. Nos dois diferentes centros, a prevalência de variantes polimórficas diferiu, sendo de 8,9 e 3,8%, respectivamente. **Conclusão:** não houve diferença significativa entre a predominância de variantes polimórficas e outras alterações nos indivíduos com ou sem história de perda reprodutiva. Os resultados do presente estudo reforçam a necessidade da adequada divulgação da informação citogenética completa nos resultados de cariótipo, com atenção específica em relação às variantes polimórficas.

Abstract

Purpose: to evaluate the prevalence of cytogenetic alterations and chromosomal polymorphism in couples with a subfertility phenotype in a Brazilian population. **Methods:** karyotype analysis through G and C banding of 1,236 individuals who presented the subfertility phenotype, from two different centers (public and private) were included in the study. These patients were classified in two sub-groups: one with two or more gestational consecutive losses or not and the other with, at least, one gestational loss or absence of conception. Karyotype results were evaluated in different groups and frequencies were calculated. Statistical analyses were carried out through Fisher's exact test and Odds Ratio analysis. **Results:** approximately 25% of the cases presented abnormal karyotype results, including numerical and structural alterations and also polymorphic variants. In both centers, the prevalence of polymorphic variants was 8.9 and 3.8%, respectively. **Conclusions:** there was no significant difference between the prevalence of polymorphic variants and other abnormalities in individuals with or without previous history of reproductive loss. The results of the present study reinforce the need of adequate disclosure of complete cytogenetic information in the karyotype results, with specific attention in relation to the polymorphic variants.

Correspondência:

Ricardo Barini

Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM/UNICAMP
Disciplina de Obstetrícia – Departamento de Tocoginecologia
Avenida Alexander Fleming, 101
CEP: 13083-970 – Campinas (SP), Brasil

Recebido

09/02/2011

Aceito com modificações

16/03/2011

Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

¹ Citogeneticista do Laboratório de Citogenética e Cultivo Celular do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

² Citogeneticista do Laboratório de Citogenética e Cultivo Celular e Supervisora dos Laboratórios Clínicos Especializados do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

³ Doutora em Medicina/Ambulatório de Perdas Recorrentes do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

⁴ Professor Associado Livre Docente do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; Coordenador do Programa de Medicina Fetal e Imunologia da Reprodução do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

Introdução

A presença do fenótipo de subfertilidade em um indivíduo tem sido alvo de grande debate científico nos últimos anos, a começar por sua própria definição. Tradicionalmente, nesse grupo eram incluídos casais com abortamento, desde que recorrentes, possivelmente devido à influência do trabalho pioneiro de Malpas¹, frequentemente citado por vários autores. Assim, o termo “recorrente” fez-se presente ao longo dos anos, em inúmeras publicações. A ausência do consenso é verificada em uma série de *guidelines* internacionais, com discrepâncias com relação ao número de abortamentos e à sequência dos mesmos. Atualmente, o *American College of Obstetrics and Gynecology* (ACOG) define o abortamento recorrente na presença de duas ou mais perdas consecutivas². A *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) o define na ocorrência de três ou mais perdas consecutivas³. Em contraste, o *Royal College of Obstetrics and Gynaecologists* (RCOG) aponta como três ou mais perdas⁴ e a *Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology* (NVOG) como duas ou mais perdas⁵, sendo que ambas não incluem a palavra “recorrente” em suas definições. Diante de tantas opções, torna-se difícil a classificação de um casal como portador de abortamentos recorrentes, fazendo com que as opções clínicas de diagnóstico e terapêutica sejam tardiamente oferecidas⁶.

Vários autores têm considerado como abortamento espontâneo recorrente a observação de duas perdas fetais, incluindo as não consecutivas⁶⁻⁸, contrapondo-se à definição tradicional que se dava à observação de três ou mais eventos consecutivos, antes de se atingir a 20^a semana de gestação⁹⁻¹¹. Em novembro de 2008, publicou-se uma recomendação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva que definiu o conceito de infertilidade como uma falha no sucesso de atingir-se uma gravidez após 12 meses ou mais de intercurso sexual regular e sem proteção contraceptiva. Também foi definido o conceito de abortamento recorrente como duas ou mais perdas gestacionais, independentemente da recorrência¹².

Na ausência de um consenso acerca do tema, o conceito de subfertilidade passou a ser utilizado por alguns grupos, de forma generalista e não específica, para definir toda a falta de concepção – não desejada – em indivíduos que ativamente desejam conceber. Nesse sentido, estão incluídos indivíduos com perda reprodutiva, recorrente ou não, e indivíduos que apresentam falha de concepção¹³. Tal nomenclatura, por certo, gera certa controvérsia, mas visa incluir sob a mesma nomenclatura dois fenômenos que interagem e requerem quase que o mesmo tipo de abordagem epidemiológica, diagnóstica e terapêutica, reduzindo o tempo requerido para o início de uma investigação específica e, a longo prazo, disponibilizando

opções terapêuticas específicas e realmente necessárias. Nesse sentido, tratamentos podem ser disponibilizados a fim de que uma gestação de sucesso possa ser atingida em um espaço menor de tempo¹³.

As anormalidades cromossômicas são consideradas responsáveis por cerca de metade dos abortos espontâneos de primeiro trimestre, incluindo alterações numéricas, estruturais (translocação, inversão, deleção e duplicação) e mosaicismo. Cerca de 5 a 10% dos casais com fracassos reprodutivos apresentam, em pelo menos um cônjuge, translocações equilibradas e/ou inversões^{9,14,15}.

As variantes polimórficas são um achado comum na rotina do laboratório de citogenética^{14,16-18}. Apesar de um efeito fenotípico específico não ter sido, até o momento, associado às inversões, consideradas polimórficas, a recombinação da região invertida durante a meiose pode resultar na produção de gametas desbalanceados com segmentos cromossômicos deletados ou duplicados, gerando descendentes cromossomicamente anormais, abortos ou, ainda, a ocorrência do efeito intercromossômico, que é a influência dos cromossomos envolvidos em rearranjos sobre outros pares cromossômico^{11,19-21}.

Os polimorfismos cromossômicos são alterações citogenéticas estruturais tidas como “silenciosas”, sendo também assunto controverso quanto à sua expressão fenotípica. Os dados na literatura chegam a apontar uma frequência de até 8% de polimorfismos na população em geral. Atualmente, uma nova linha de investigação sustentada por vários autores tem apontado que essas variantes polimórficas podem estar associadas ao fenótipo de subfertilidade^{14,16,17,22}.

Em se tratando de um assunto bastante controverso, tanto na questão da definição do fenótipo de subfertilidade quanto com relação à expressão fenotípica dos polimorfismos cromossômicos – e considerando que muitos autores têm relatado taxas aumentadas de variantes polimórficas em casais com perdas reprodutivas – o objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de alterações citogenéticas e polimorfismos cromossômicos em casais com fenótipo de subfertilidade, em uma população brasileira, uma vez que existem poucos dados na literatura.

Métodos

Foram incluídos no estudo um total de 1.236 sujeitos, que foram investigados com relação a seu cariótipo, atendidos em dois serviços especializados. Destes, 202 cariótipos foram processados em um serviço público de referência no Sistema Único de Saúde (CAISM/Unicamp), provenientes de casais com fenótipo de subfertilidade, atendidos entre janeiro de 2003 a março de 2009. A idade média das mulheres que foram submetidas à investigação foi de 29 anos (19-42 anos). Entre os homens, a idade

média foi de 31 anos (16-46 anos). A avaliação socioeconômica realizada por informação dos prontuários revelou uma renda média de até cinco salários mínimos. Também foram incluídos os resultados de 1.034 cariótipos de casais com fenótipo de subfertilidade, atendidos em um serviço privado, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008. Esses pacientes, em sua maioria, eram oriundos de convênios médicos ou atendimento particular, com renda acima de dez salários mínimos. A idade média das mulheres que foram submetidas à investigação foi de 33 anos (25-47 anos). Entre os homens, a idade média foi de 31 anos (26-55 anos).

Para este estudo, foram selecionados pacientes com o fenótipo de subfertilidade, tal qual na forma generalista apresentada por Gnoth et al.¹³. No entanto, esses pacientes ainda foram classificados em dois subgrupos, conforme a classificação da *American Society for Reproductive Medicine*¹²: Grupo A = Grupo (G>2 perdas) e Grupo B = Grupo (G≥1 perda).

Para os casais com fenótipo de subfertilidade atendidos no serviço privado, foi realizada a consulta aos prontuários como forma de acesso aos laudos e resultados de cariótipo, provenientes de diversos laboratórios externos de citogenética. Para os casais atendidos no serviço público, utilizou-se a técnica de cariótipo convencional com bandamento G, para todos os casos, e com bandamento C em casos selecionados. A técnica consistiu, resumidamente, na preparação de cultivos de linfócitos a partir de sangue periférico, inibição do fuso mitótico, choque hipotônico, fixação das células em fixador Carnoy e preparação das lâminas para posterior coloração cromossômica em bandas. Foram analisadas 20 metáfases por caso. Em casos com suspeita de mosaicismo, esse número foi expandido para 100. Os cariótipos foram classificados de acordo com o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009 (ISCN)*²³.

As imagens foram analisadas e adquiridas por meio do sistema *BandView Software (Applied Spectral Imaging)*.

Os resultados das análises de todas as técnicas utilizadas foram conferidos por um segundo analisador, seguindo critérios internacionais de assertividade, rastreamento e controle de qualidade. A análise citogenética dos dois grupos deste estudo (serviço público e privado) foi realizada por analisadores e laboratórios independentes empregando, contudo, técnicas clássicas, consagradas para o diagnóstico citogenético.

O teste exato de Fisher e o cálculo de Odds Ratio foram aplicados quando a análise estatística era apropriada. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Resultados

Os resultados foram apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3. A Tabela 1 apresenta as alterações citogenéticas encontradas nos serviços público e privado, incluídos os grupos A e B. A Tabela 2 apresenta uma comparação entre os resultados de cariótipo obtidos para os grupos A e B, atendidos no serviço público. A Tabela 3 apresenta, de forma geral, a descrição dos cariótipos alterados, em cada um dos serviços, incluindo alterações numéricas, estruturais e variantes polimórficas. A frequência de indivíduos afetados pelas variantes polimórficas foi de 8,9% no serviço público e de 3,8% no serviço privado. As anomalias numéricas envolveram, via de regra, os cromossomos sexuais, enquanto as anomalias estruturais envolveram diversos cromossomos

Tabela 1 - Alterações citogenéticas encontradas no serviço público e no serviço privado

	Serviço público		Serviço privado		Total	
	n	%	n	%	n	%
Normal	165	81,6	964	93,2	1.129	91,3
Númerica	12	5,9	17	1,6	29	2,3
Estrutural	7	3,4	13	1,2	20	1,6
Polimorfismo	18	8,9	40	3,8	58	4,6
Total	202		1.034		1.236	

Tabela 2 - Anomalias citogenéticas observadas classificadas de acordo com a história clínica

	Normal	Polimorfismo	Estrutural	Númerica	Qualquer	Total
Grupo A						
n	110	10	2	10	22	132
%	83,3	7,6	1,5	7,6	16,7	100,0
Grupo B						
n	55	8	5	2	15	70
%	78,6	11,4	7,1	2,9	21,4	100,0
Odds Ratio (IC95%)	-	1,60 (0,6-4,2)	5,00 (0,94-26,6)	0,40 (0,08-1,89)	1,36 (0,66-2,8)	
Total	165	18	7	12		202

Nota: apenas casos atendidos no Serviço Público. Grupo A = Grupo (G>2 perdas) e Grupo B = Grupo (G≥1 perda). Teste exato de Fisher: 0,08.

Tabela 3 - Descrição dos cariótipos alterados nos serviços público e privado

Tipo	Descrição	Público	Privado
Anomalias numéricas	Ganho ou perda de cromossomos	12	17
Anomalias estruturais	Anomalias na estrutura do cromossomo	7	13
Variantes polimórficas	Varição de tamanho de heterocromatina Ex.: 1qh+, 9qh+, 16qh+, Yqh+	6	17
	Variações envolvendo satélites Ex.: 21ps+, 22ps+, 15psk+	5	11
	Inversões Ex.: inv(9), inv(8), inv(1)	7	12
	Total	37	70

qh+: aumento de heterocromatina; ps+: aumento de satélite; psk+: aumento do pedúnculo do satélite; inv: inversão.

autossômicos, sem preferência. Com relação aos polimorfismos descritos, foram observadas as variantes mais frequentes, corroborando dados da literatura, envolvendo aumento de heterocromatina dos cromossomos 1, 9, 16 e Y, bem como inversão do cromossomo 9 e anomalias de satélites dos cromossomos acrocêntricos.

Discussão

Os rearranjos cromossômicos têm importância particular no contexto da saúde reprodutiva, uma vez que podem estar envolvidos na expressão de uma série de fenótipos, incluindo as malformações fetais e as perdas gestacionais^{24,25}.

Com aplicação de técnicas de bandamento e, mais recentemente, com técnicas moleculares, é agora conhecido que os polimorfismos cromossômicos representam heterocromatina constitutiva, principalmente da região centromérica dos cromossomos, podendo os segmentos polimórficos variar em tamanho e posição^{17,26}.

Uma extensa variação nas frequências de anomalias cromossômicas foi observada tanto no serviço público quanto no serviço privado. Acredita-se que as diferenças a respeito da frequência dos polimorfismos nos dois diferentes grupos de pacientes, mais elevadas entre os pacientes do serviço público, são devido à padronização de divulgar todas as variações polimórficas no laudo citogenético final.

Em um trabalho de revisão sobre a frequência de anormalidades cromossômicas em casais com perdas fetais recorrentes, Kiss et al.¹¹ relatam frequências que variam de 0,6 a 2,8% para anomalias de todos os tipos, sendo, dentre essas, de 3 a 30% aquelas consideradas como polimórficas, mais especificamente as inversões pericentroméricas.

É interessante notar que indicar a presença de um polimorfismo no laudo final é facultativo. Em normatizações europeias indica-se, inclusive, que variantes polimórficas

não devem ser apontadas no laudo final, ficando apenas registradas nas anotações internas do laboratório, para que não haja uma interpretação controversa por parte do profissional não citogeneticista²⁷. Nos Estados Unidos, o grupo de Citogenética do Colégio Americano de Patologistas declara que não há um padrão estabelecido para o registro dos heteromorfismos no laudo citogenético, ficando a critério do citogeneticista responsável pelo exame a decisão de reportá-los ou não²⁸. No Brasil, não existe uma normatização com relação à informação das variantes polimórficas, existindo uma sugestão da Sociedade Brasileira de Genética de que as variantes cromossômicas como tamanho de heterocromatina e satélite, exceto aquelas envolvendo quebra e reunião de cromossomos, não necessitam ser incluídas na descrição dos resultados. Aponta-se, entretanto, que se forem mencionadas, o seu significado deve estar claramente descrito nos comentários dos laudos²⁹.

No serviço público participante do presente estudo, optou-se desde 2002 pelo registro dos polimorfismos em laudo, em todos os casos. Assim, é possível que os dados apresentados na literatura possam estar subestimados, devido à falta de normatização com relação à descrição dos polimorfismos em laudo, viés este não encontrado na prática desse serviço público em especial.

É importante ressaltar que muitos autores indicam a possibilidade de reportar os polimorfismos relacionados às inversões, pois estas apresentam duas quebras de DNA na estrutura do cromossomo, deixando-se, em um segundo plano, a possibilidade de informação dos aumentos de tamanho de heterocromatina²⁸. No presente estudo, no qual não houve seleção dos polimorfismos a serem reportados, verificou-se que as frequências para o aumento de tamanho de heterocromatina são tão ou mais prevalentes do que as inversões. Dessa forma, é possível que vários trabalhos que publicaram que as inversões são mais prevalentes do que os aumentos de tamanho de heterocromatina possam ter apresentado dados subestimados.

Outro tema a ser considerado é o fato de que nosso grupo encontrou frequências similares para variações polimórficas nos casais classificados nos subgrupos A e B. Considerando-se as anomalias estruturais e numéricas conjuntamente, pode-se igualmente observar a ausência de uma diferença significativa entre os dois grupos (9,1% para o grupo A e 10% para o grupo B). Nossos resultados corroboram o estudo de van den Boogaard et al.⁶, que determinaram não haver influência na consecutividade dos abortamentos para o risco de anomalias cromossômicas e reforçaram a possibilidade de utilização do termo e da classificação do fenótipo de subfertilidade, de forma generalista, a fim de triar pacientes para investigação precoce de falhas de reprodução e disponibilização de opções terapêuticas específicas.

Como este trabalho envolveu a maior casuística de pacientes brasileiros e, até onde conhecemos, é o terceiro trabalho internacional a envolver mais do que mil indivíduos com cariótipos analisados, os resultados validam a importância do registro em laudo das variantes da normalidade, como os polimorfismos, sejam eles constituídos por inversões ou aumento de tamanho de regiões heterocromáticas, com o subsequente comentário interpretativo do achado em questão, para que não haja um entendimento controverso por parte do profissional não citogeneticista.

Apesar de ainda não haver consenso científico acerca de sua repercussão fenotípica, os polimorfismos são um achado frequente em um serviço de Citogenética. Sua visualização, por citogenética convencional, pode constituir-se em um marcador para a triagem de casos para investigação

molecular. Por outro lado, investigações complementares com técnicas de Biologia molecular poderão indicar pequenos ganhos ou perdas genômicas associadas à ocorrência dos heteromorfismos e, assim, levar à descoberta de novas sequências envolvidas na etiologia de malformações fetais específicas ou ao fenótipo estendido de subfertilidade em casais, mesmo na ausência de abortamento recorrente. Ainda que poucas opções terapêuticas estejam disponíveis para casais com anomalias citogenéticas, o oferecimento do teste para casais com fenótipo de subfertilidade, em seu entendimento generalista, oferece uma resposta diagnóstica efetiva e em menor tempo, poupando-os de sucessivas frustrações com relação ao insucesso reprodutivo ou, ainda, colocando-os em contato com outras abordagens investigativas a fim de se determinar a etiologia da doença e as possíveis opções terapêuticas.

Referências

- Malpas P. A study of abortion sequences. *BJOG*. 1938;45(6): 932-49.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;78(2):179-90.
- Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2006;21(9):2216-22.
- Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). The investigation and treatment of couples with recurrent miscarriage. London: RCOG; 2003.
- Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology (NVOG). Guideline: recurrent miscarriage. Utrecht: NVOG; 2007.
- van den Boogaard E, Kaandorp SP, Franssen MTM, Mol BWJ, Leschot NJ, Wouters CH, et al. Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: is there any difference in carrier status? *Hum Reprod*. 2010;25(6):1411-4.
- Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS, Baumeister L, Doyle DL, Leppig K, et al. Genetic evaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2005;14(3):165-81.
- Yuce H, Tekedereli I, Elyas H. Cytogenetic results of recurrent spontaneous abortion in Turkey. *Med Sci Monit*. 2007;13(6):CR286-9.
- Horne AW, Alexander CI. Recurrent miscarriage. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2005;31(2):103-7.
- Caetano MR, Couto E, Passini Junior R, Simoni RZ, Barini R. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. *São Paulo Med J*. 2006;124(4):181-5.
- Kiss A, Rosa RFM, Dibi RP, Zen PRG, Pfeil JN, Graziadio C, et al. Anormalidades cromossômicas em casais com história de aborto recorrente. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(2):68-74.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S60.
- Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod*. 2005;20(5):1144-7.
- Srebniak M, Wawrzkiwicz A, Wiczkowski A, Kaźmierczak W, Olejek A. Subfertile couple with inv(2),inv(9) and 16qh+. *J Appl Genet*. 2004;45(4):477-9.
- Silva AE, Migliori IK, Jorge YC, Santos JR. Casais com abortamento espontâneo recorrente: participação das translocações cromossômicas. *Arq Ciênc Saúde*. 2007;14(4):211-5.
- Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, et al. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia*. 2006;38(4):122-7.
- Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Uttamchandani SA, Parikh FR. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Ferti Steril*. 2009;92(1):88-95.
- Mikhaail-Philips MM, Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH. Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet A*. 2004;127A(2):139-43.
- Lejeune J. Autosomal disorders. *Pediatrics*. 1963;32(3):326-37.
- Colls P, Blanco J, Martínez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Márquez C, et al. Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13), analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet*. 1997;99(6):761-5.
- Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril*. 2006;85(3):661-6.
- Ait-Allah AS, Ming PML, Salem HT, Reece EA. The clinical importance of pericentric inversion of chromosome 9 in prenatal diagnosis. *J Matern Fetal Invest*. 1997;7(3):126-8.
- Shaffer LG, Slovak ML, Campbell, LJ, editors. ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger; 2009.

24. ESHRE Capri Workshop Group. Genetic aspects of female reproduction. *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):293-307.
25. Celep F, Karagüzel A, Ozeren M, Bozkaya H. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006;127(1):106-9.
26. Ramesh KH, Verma RS. Breakpoints in alpha, beta, and satellite III DNA sequences of chromosome 9 result in a variety of pericentric inversions. *J Med Genet*. 1996;33(5):395-8.
27. Bricarelli FD, Hastings RJ, Kristofferson U, Cavani S; ECA European Cytogeneticists Association. Cytogenetic guidelines and quality assurance – a common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations [Internet]. 2009 [cited 2009 Jun 29]. Available from: <http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit1/ceqa/NL17z7Guidelines%20v1.2.pdf/>
28. Brothman AR, Schneider NR, Saikevych I, Cooley LD, Butler MG, Patil S, Mascarello JT, Rao KW, Dewald GW, Park JP, Persons DL, Wolff DJ, Vance GH; Cytogenetics Resource Committee, College of American Pathologists/American College of Medical Genetics. Cytogenetic heteromorphisms: survey results and reporting practices of giemsa-band regions that we have pondered for years. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(7):947-9.
29. Borovik CL, Tajara EH, Rocha JC, Farah LMS, Naccache NF, Mingroni Netto RC, et al. Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana [Internet]. 2009 [citado 2009 Jun 29]. Disponível em: <http://www.liagiraldopro.br/enfoques/arquivos/boasPraticasOGM.pdf>