

**CLAUDINÉIA DE ARAÚJO**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE SEQÜÊNCIAS DO  
CROMOSSOMO Y EM PACIENTES COM SÍNDROME DE  
TURNER**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Mato Grosso, Faculdade de  
Ciências Médicas para obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Sebastião Freitas de Medeiros**

**Co-orientador: Prof. Dr. Marcial Francis Galera**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cuiabá, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**Diretor da Faculdade de Medicina**

Prof.Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins

**Coordenador do Curso de Pós-graduação em Ciências Médicas**

Prof. Dr. Anselmo Verlangieri Carmo

**Orientador:**

Prof. Dr. Sebastião Freitas de Medeiros

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Marcial Francis Galera

Cuiabá, 2008

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE SEQÜÊNCIAS DO  
CROMOSSOMO Y EM PACIENTES COM SÍNDROME  
DE TURNER**

**CLAUDINÉIA DE ARAÚJO**

---

Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva (UNIFESP)

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Bianca Borsatto Galera (UNIC)

---

Prof.Dr.Sebastião Freitas de Medeiros (UFMT)  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas- Faculdade de Medicina Universidade  
Federal de Mato Grosso- UFMT

Cuiabá, Fevereiro de 2008.

## FICHA CATALOGRÁFICA

ARAÚJO, Claudinéia .

Identificação Molecular de Sequências do Cromossomo Y em Pacientes com a Síndrome de Turner, Cuiabá/MT, Faculdade de Medicina - UFMT, 2008.

Dissertação: Mestrado em Ciências da Saúde

1. Síndrome de Turner
2. *Fragmentos do Cromossomo Y*
3. Gonadoblastoma
4. PCR

I. Universidade Federal de Mato Grosso - Dissertação

II. Título

Este estudo foi desenvolvido na Unidade de Genética e Biologia Molecular UNIC/HGU e realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- ❖ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq)
- ❖ Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT)
- ❖ Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas
- ❖ Universidade de Cuiabá, Faculdade de Medicina

Esta dissertação foi desenvolvida com base nas Normas de Vancouver 2000.

Eu não sei se me tornei invisível para o mundo, pode ser... Porém, nunca fui tão consciente da minha existência como agora, nunca me senti tão protagonista da minha vida e nunca desfrutei tanto cada momento do meu aprendizado! Descobri que o ser humano sensível que sou, é também muito forte, descobri que posso me permitir o luxo de não ser perfeita, de ter fraquezas, de me enganar, de fazer coisas indevidas e acima de tudo, não responder as expectativas dos outros, e apesar disso ainda gostar de MIM

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Luiza, minha maior educadora, razão maior da minha vida e meu melhor exemplo de sabedoria.

Ao meu pai, Osmar (*in memoriam*), por me deixar a vontade de aprender, a honestidade e a persistência como maior herança.

Às pacientes portadoras da Síndrome de Turner e seus familiares, pela incansável busca de respostas e soluções. Meus sinceros agradecimentos e meu mais profundo respeito.

## **AGRADECIMENTOS**



A Deus, pelo dom da vida, por me manter de pé diante de todas as dificuldades, e por colocar em meu caminho pessoas especiais, sem as quais eu jamais teria conseguido realizar este e outros sonhos.

Ao Prof. Dr. Sebastião Freitas de Medeiros, pela oportunidade e valiosa orientação. A sua capacidade científica e profissional, além do conhecimento crítico foram estímulos essenciais para vencer este desafio.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Marcial Francis Galera, pela idealização deste projeto e pela confiança em mim depositada, além do exemplo profissional e ético. Sua tranquilidade e segurança foram imprescindíveis na execução deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Bosatto Galera pelo exemplo profissional e pessoal e pela constante ajuda e incentivo desde o início deste projeto.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Flávia Galindo Silvestre por compreender a importância da qualificação científica, além da técnica, me permitindo conciliar meu trabalho e o mestrado, além das imprescindíveis dicas nas análises práticas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Coenga por abrir as portas do Ambulatório de Crescimento e Desenvolvimento do HUJM permitindo o contato com as primeiras pacientes.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Pasquali Parise Maltempo por me dar a primeira oportunidade no mundo da genética e por me ensinar a acreditar em mim e jamais desistir. Seu valor sempre será lembrado.

À equipe da Unidade de Genética: Kelly, Paulo, Flávia, Gleice, Franciele, Leila, Madalena e todos os estagiários pelo apoio, ajuda e prestatividade.

À Kellynha (Guima) por toda gentileza, torcida, orações e muita cumplicidade durante esta jornada.

Ao amigo Eduardo Figueiredo por estar sempre disposto a ajudar, pelo exemplo de garra e simplicidade e pelas valiosas dicas.

Aos meus afilhados, Emidinho e Felipe, razões fundamentais da minha luta pessoal e profissional.

Aos amigos Ana Leonarda e Emídio, pelos exemplos, amizade, apoio e consideração.

À Flávia Almeida Ramos, pela colaboração em todas as fases deste trabalho e pela amizade. Participe dos sonhos e das angústias.

Às AMIGAS, Márcia e Vera, por todos os momentos divididos durante o mestrado. O companheirismo foi nossa marca maior, ter conhecido vocês, meu maior prêmio.

À minha grande amiga Cibele, minha confidente e grande incentivadora, SAUDADES.

Aos amigos Jeane, Marcelo por me ajudar a ficar de pé quando tudo desabou e por tudo que representam para mim.

À amiga Meire, por estar sempre por perto mesmo estando longe.

Aos amigos Wilson, Nídia, Luiza e Gustavo (Minha segunda família) exemplos de vida e fé. Obrigada por me mostrarem a luz quando tudo parecia escuro e por me ajudarem a acreditar que tudo é possível.

## INTRODUÇÃO

O processo de determinação sexual nos mamíferos tem início no momento da fertilização com o estabelecimento do sexo cromossômico do zigoto e é determinado pela interação de genes, fatores transcricionais, hormônios e receptores hormonais (1). O caminho a ser percorrido para que se chegue a um desenvolvimento sexual normal, quer masculino ou feminino, é bastante longo e sujeito a erros em vários momentos. Não é somente necessário que os estímulos ocorram em determinadas estruturas embriológicas, mas também sua cronologia é absolutamente fundamental para que o processo se realize de modo normal (2). Nos seres humanos, os processos de determinação e diferenciação sexual estão intrinsecamente associados à presença ou à ausência do cromossomo Y no gameta (3). O evento primordial na determinação sexual é a formação das gônadas. Este processo ocorre em duas etapas: a) determinação do sexo cromossômico, estabelecido na fertilização e, b) diferenciação das gônadas em testículos ou ovários. As demais diferenças entre os sexos são efeitos secundários exercidos pelos hormônios produzidos pelas gônadas. Após a interação entre células germinativas e somáticas da crista gonadal e diferenciação da gônada, ocorre a diferenciação dos genitais internos e externos masculinos ou femininos, na dependência da presença ou ausência de testículos e testosterona ou diidrotestosterona. As diferenciações sexuais secundárias, induzidas pelos hormônios esteróides gonadais em diferentes tecidos, completam o fenótipo sexual (4).

Tanto a diferenciação como a manutenção da gônada em ovário são eventos dependentes da presença de dois cromossomos X íntegros, caso contrário os folículos ovarianos degeneram e a gônada torna-se disgenética (5). As disgenesias gonadais compõem um espectro clínico de anomalias com fenótipo variável, de feminino a masculino ou ambíguo, observando-se, nestes pacientes, desenvolvimento puberal

**Introdução** parcial ou ausente e cariótipo contendo ou não um cromossomo Y ou fragmentos deste. Embora certas seqüências Y-específicas nem sempre sejam evidentes quando as pacientes são investigadas pela técnica de citogenética, as gônadas disgenéticas de pacientes com estas seqüências, eventualmente não identificadas, apresentam maior risco para o desenvolvimento de tumores gonadais. A detecção destas seqüências do cromossomo Y por técnicas citogenéticas ou moleculares mais precisas tem sido estimulada para nortear a indicação ou não de gonadectomia profilática nestes grupos de pacientes (6).

A mulher normal é homogamética com dois cromossomos X e o homem é heterogamético com um cromossomo X e outro Y. Vários genes localizados nos cromossomos sexuais e autossomos participam dos processos de determinação sexual. Uma complexa cascata gênica é formada por uma série de genes que interagem em fases restritas ou em diferentes momentos do desenvolvimento do tecido gonadal (Figura.01). Alterações nos mecanismos de ação e nas interações gênicas dão origem a diferentes graus de anormalidades no desenvolvimento gonadal, resultando na formação de gônadas disgenéticas ou em agenesia gonadal (1).

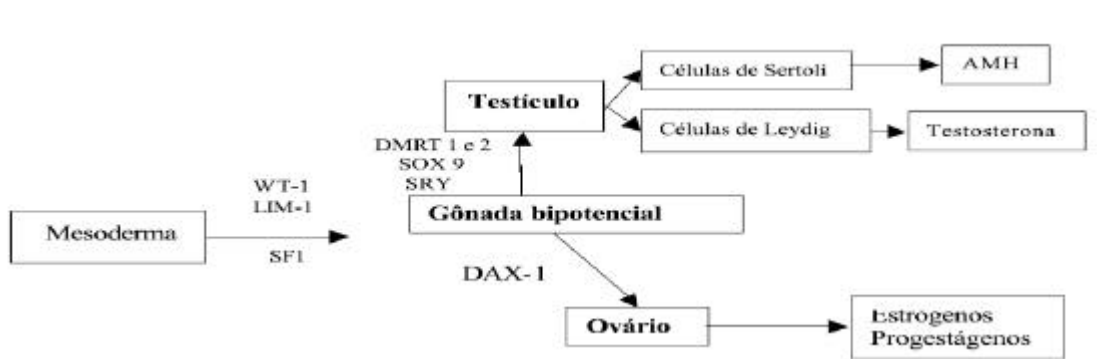


Figura 01. Genes envolvidos na determinação e diferenciação gonadal. Adaptação de Hiort, 2000.

A determinação do desenvolvimento testicular foi inicialmente relacionada à existência de um gene no braço curto do cromossomo Y, denominado TDF (*Testis Determining Factor*). Posteriormente, o gene denominado *SRY* (*Sex-determining Region on the Y chromosome*) foi identificado a partir do mapeamento de seqüências Y-específicas em indivíduos portadores de alterações estruturais desse cromossomo (1,8). O gene *SRY* humano está localizado próximo à região pseudo-autossômica do braço curto do cromossomo Y e é constituído por um exon único que codifica uma proteína de 204 aminoácidos (1). O perfil de expressão do *SRY* está de acordo com a função do TDF: as moléculas de mRNA do *SRY* são detectadas na gônada fetal no momento preciso da diferenciação testicular, quando se observa o aparecimento dos primeiros túbulos de células de Sertoli, a partir da sexta semana no ser humano (9). Este gene age como um indutor na determinação sexual masculina e sua expressão nas células somáticas da crista gonadal precedem os primeiros sinais de desenvolvimento testicular. Fatores de transcrição, que regulam a expressão do *SRY* no início do processo de determinação sexual nos humanos, na ausência do cromossomo Y, potencializam o desenvolvimento

ovariano e também a expressão de uma série de genes promotores da diferenciação gonadal. Todos esses genes são expressos durante o desenvolvimento das gônadas e as interações de seus produtos formam o complexo genético responsável pela diferenciação da gonada em testículo ou ovário (10). Em geral, considera-se que mutações no gene *SRY* humano são responsáveis por cerca de 20% dos indivíduos com disgenesia gonadal e cariótipo 46,XY. Um desequilíbrio na constituição dos cromossomos sexuais, como a presença do cromossomo Y em mulheres ou a ausência deste em homens, resulta em várias anormalidades genéticas (11).

### **Introdução**

Historicamente, a Síndrome de Turner (ST), também chamada de Síndrome de Ullrich-Turner, foi descrita pela primeira vez por Serevskij em 1925 e Otto Ullrich em 1930 (13). Em 1938, Henry Turner descreveu um grupo de meninas, entre 15 e 23 anos, com amenorréia primária, infantilismo sexual e baixa estatura. As pacientes também apresentavam *cubitus valgus*, pescoço alado, um largo espaço intermamilar, baixa implantação dos cabelos e linfedema das mãos e dos pés. Quatro anos depois, Varney *et al* e Albright *et al*, independentemente, demonstraram que pacientes com sinais clínicos semelhantes aos daquelas descritas por Turner apresentavam um elevado nível de gonadotrofinas urinárias após a idade puberal, estabelecendo que se tratava de uma desordem da função gonadal e não uma deficiência hipotalâmica ou hipofisária (15). Uma síntese com a prevalência das manifestações clínicas observadas nos principais estudos incluindo pacientes com ST é mostrada na tabela 01.

Esta síndrome é uma das mais importantes e freqüentes anormalidades cromossômicas na espécie humana, tendo uma incidência estimada em 1 a cada 2.500 nascimentos do sexo feminino (16), atingindo 1.500.000 mulheres no mundo. Sua

prevalência entre as meninas com baixa estatura é de 1: 60 (17). Na verdade, o número de recém-nascidas corresponde apenas a uma pequena fração do total de conceptos com ST, uma vez que, embora 1% a 2% de todas as concepções humanas tenha a constituição cromossômica 45,X, cerca de 99% dos conceptos 45,X são abortados. Além disso, esta condição é responsável por cerca de 20% dos abortamentos espontâneos cromossomicamente anormais. Em 75% dos casos a falha na gametogênese (não-disjunção) que causa esta monossomia está no gameta do pai (18). Aproximadamente em 20% dos casos a síndrome é diagnosticada ao nascimento devido a características clínicas e/ou anomalias somáticas. Este agravo pode ainda ser diagnosticado ou suspeitado no pré-natal, através do exame de ultra-sonografia fetal (19).

Tabela 01 – Proporção das alterações clínicas encontradas em indivíduos com Síndrome de Turner.

<b>ALTERAÇÕES CLÍNICAS</b>	<b>PROPOÇÃO (%)</b>
Hipertensão	< 50
Hipotensão	< 50
Deficiência de crescimento	≈ 50
Edema de membros inferiores	≈ 50
Esfereza de mãos e pés	> 50
Orelhas biconvexas e cantos profundos	> 50
Gravidade da forma de rotação incomuns	> 50
Maxila estreita e dentes não repostos	> 50
Variedade de cólon	> 50
Nevo pigmentado	> 50
Dorça ou hipoplasia dos mamilos	> 50
Cúbito valgo	> 50
Encurtamento do quarto metacarpo	> 50
Exostose da tíbia	> 50
Tendência à obesidade	> 50
Otite média recorrente	> 50
Déficit de audição	< 50
Nevo pigmentado	< 50
Pescoço alado	< 50
Anomalias cardiovasculares	< 50

**Fonte: Frias e Davenport , 2003**

### ***Introdução***

Um dos sinais clínicos mais consistentes da ST é a baixa estatura. O déficit de crescimento tem início na vida intra-uterina com peso ao nascimento de aproximadamente 500 gramas abaixo da média da população normal. Apesar da maioria destas pacientes apresentarem estatura = 1,40 m com a administração de esteróides sexuais e hormônio do crescimento, algumas portadoras podem atingir altura maior (2). O pescoço alado também é um sinal evidente. Em menor prevalência pode estar presentes facies incomum típica, linha posterior de implantação baixa dos cabelos, tórax largo com mamilos amplamente espaçados, palato em ogiva, orelhas de implantação baixa, linfedema, hipertrofia de clitóris e hipotiroidismo. Algumas podem apresentar anomalias de células germinativas – hipogonadismo primário, esterilidade, disgerminoma e outras lesões andrógeno-produtoras não tumorais, além de anomalias cardíacas ou renais e hipertensão. Dentre estas pacientes, há um aparente aumento, ainda inexplicado, na frequência de doenças auto-imunes, como hipo ou hipertireoidismo, vitiligo, alopecia, obesidade, *diabetes mellitus*, hiperlipemia e artrite (20).

Como demonstrado na tabela 01, os indivíduos portadores apresentam um fenótipo extremamente variável. Apesar das gônadas indiferenciadas, as pacientes ST têm genitália externa e interna claramente feminina; no entanto, o útero apresenta tamanho pequeno, uma vez que seu pleno desenvolvimento depende de estímulos hormonais. As gônadas são, em regra geral, duas fitas fibrosas, nas quais não se detectam células germinativas nem formações foliculares, mas somente um tecido que lembra o estroma do córtex ovariano (15,21).



### ***Introdução***

Outra característica, devida ao processo acelerado de atresia dos folículos ovarianos, é a infertilidade (13). A falência gonadal é observada na grande maioria das mulheres portadoras da ST. As gônadas da maior parte destas pacientes mostram ausência das células germinativas e células da teca-granulosa, responsáveis pela produção dos esteróides sexuais. Habitualmente, encontra-se apenas estroma ovariano e tecido conjuntivo cicatricial, caracterizando, assim, uma gônada disgenética (21). Clinicamente, as pacientes com a ST apresentam hipogonadismo, amenorréia primária e déficit no desenvolvimento somático. No entanto, cerca de 2% das mulheres com cariótipo 45,X, e 12% daquelas com mosaicismo, apresentam folículos residuais suficientes para permitir alguma menstruação. Frequentemente, estas mulheres apresentam atraso na menarca e desenvolvimento de outras características marcantes associadas à puberdade como consequência da ausência de hormônios importantes para o desenvolvimento sexual normal (22). Embora a esterilidade seja a regra na ST, há relato de gravidez espontânea em 1% a 2% dos casos pouco afetados.

A expectativa de vida dos indivíduos acometidos é normal (23). Segundo Frias e Davenport (2003), diferente do que se pensava o retardo mental não é uma característica importante na ST, admitindo-se hoje que somente uma minoria irá apresentá-lo. Algumas delas apresentam dificuldade de aprendizado, principalmente com relação à percepção espacial, coordenação visual-motora e matemática. As repercussões psicossociais da ST mais freqüentes são baixa auto-estima, problemas de interação social com fortes traços de introversão, extrema sensibilidade, déficit de atenção, hiperatividade e infantilismo

emocional com forte dependência parental relacionada a superproteção e mecanismos evidentes de negação em relação ao diagnóstico e prognóstico da estatura e provável

### **Introdução**

impossibilidade de gravidez (20).

Citogeneticamente, esta síndrome é caracterizada por monossomia do cromossomo sexual (45,X) em indivíduos fenotipicamente femininos. Esse cariótipo pode ser verificado em 50-60% dos casos (Figuras 02 e 03). Trata-se de uma aneuploidia cromossômica, que costuma ser atestada ao nascimento, ou antes da puberdade, por causa das suas especificidades distintas. Esse é geralmente um evento esporádico dentro de uma família e seu risco de recorrência na irmandade é muito baixo. Ainda que na maioria dos casos a ST esteja relacionada à monossomia do cromossomo X (45, X), muitos indivíduos têm uma variedade de outras anormalidades estruturais, tanto do cromossomo X como do Y (23, 24).



Figura 02. Metáfase em bandeamento G de uma das pacientes do estudo (ST14) ilustrando a monossomia do cromossomo X (45,X).

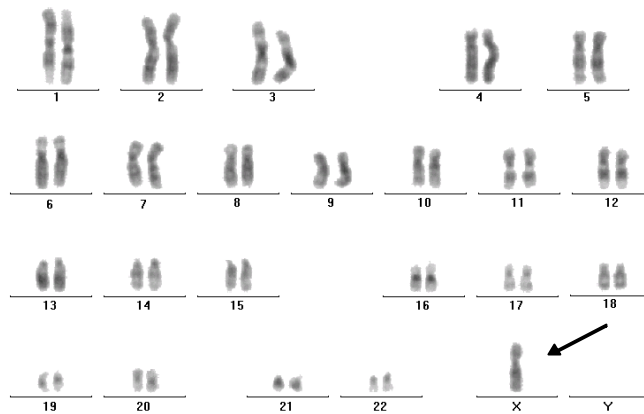


Figura 03. Cariótipo da paciente ST14 demonstrando a monossomia do cromossomo X.

Os cariótipos em mosaico estão presentes em cerca de 30% de indivíduos com ST, sendo que nestes casos, normalmente as pacientes apresentam sinais fenotípicos menos graves. Aproximadamente 20% desses mosaicos têm um marcador sexual derivado do X, entretanto, 6% destes casos possuem uma segunda linhagem celular com anormalidades estruturais derivadas do cromossomo Y. Por outro lado, a detecção de fragmentos ou seqüências do cromossomo Y pode ser observada em mais de 35% dos casos de ST com mosaico, destes, 30% são devido a alterações estruturais do cromossomo X, como isocromossomo do braço longo ou curto [46,X,i (Xq ou Xp)], cromossomos dicêntricos, deleção nos braços curto ou longo [46,X,del(Xp) ou del(Xq)] e cromossomo em anel [46,X,r(X)] (12) . Na tabela 02 estão descritos os possíveis cariótipos relacionados com a ST.

Tabela 02. Distribuição dos cariótipos relacionados com a Síndrome de Turner.

<b>Cariótipo</b>	<b>Classificação</b>
45, X	Monossomia
45,X /46,XX	Mosaico
45,X/46,X,i(Xq)	Mosaico
45,X/46,X,i(Xq)/47,X,i(Xq),i(Xq)	Mosaico
45,X/46,X,del(X)	Mosaico
45,X/46,XY	Mosaico
45,X/46,XX/47,XXX	Mosaico
45,X/47,XXX	Mosaico
45,X/46,XX/47,XXX/48,XXXX	Mosaico
46,X,(Xq)	Alteração estrutural do cromossomo X
46,X,i(Xq)	Alteração estrutural do cromossomo X
46,X,del(X)	Alteração estrutural do cromossomo X

Teoricamente um segundo cromossomo sexual é necessário à sobrevivência do feto. Assim, virtualmente, todo nascido vivo 45, X apresentaria mais de uma linhagem celular, compondo seu cariótipo (26). Parece que essa condição seria necessária apenas a alguns órgãos, durante determinado período da embriogênese (27,28). É possível, então, que a frequência de mosaicismo do cromossomo sexual seja muito superior em nascidos vivos com ST em relação à observada em abortos e que aproximadamente 99% dos embriões puramente 45,X morrem intra-útero.

A comparação da ST com outras anomalias cromossômicas numéricas tais como Síndrome de Down ou trissomia do cromossomo 18, mostra que a incidência da ST não aumenta conforme a idade materna (29, 30). Tais achados se contrapõem à hipótese da não disjunção meiótica como o principal mecanismo de geração de um cariótipo 45,X. Clinicamente, ao contrário de outras síndromes cromossômicas, mesmo pacientes com cariótipo puramente 45,X podem apresentar fenótipos completamente distintos. Com exceção da baixa estatura, que parece ser uma característica geral, as demais alterações são achados inconstantes. Uma das possíveis explicações seria o mosaïcismo não detectado, uma vez que o diagnóstico geralmente é realizado após a análise de 5 a 30 linfócitos de sangue periférico para determinação do cariótipo (31). Sabe-se que uma segunda linhagem celular está presente em 1 a 2% das células do indivíduo. Cerca de 99% dos conceptos humanos com cariótipo 45,X são abortados ainda no primeiro estágio de desenvolvimento embrionário (27, 28). Logo, apenas 1% dos embriões 45,X alcançam a viabilidade e apresentam características da ST (14). Tanto na mortalidade embrionária como nos nascidos com fenótipo característico da ST, há monossomia de genes em comum nos cromossomos X e Y (região pseudo-autossômica) (30). Esses genes são expressos tanto no cromossomo X ativo como no inativo nas mulheres, como um meio de assegurar a quantidade adequada do produto gênico. Acredita-se que, em dose única, um ou mais desses genes estejam relacionados com a síndrome (32).

A distribuição de sequências do cromossomo Y nas pacientes com ST pode variar entre os diferentes tecidos. Estes fragmentos muitas vezes estão presentes na forma de pequenos marcadores, o que dificulta a identificação positiva deste em uma rotina normal de cariótipo, especialmente se o número de metáfases analisadas for limitado (13). Vários estudos têm mostrado que 3 a 61% das pacientes com ST com diferentes cariótipos (45,X, mosaicos e pacientes com um marcador cromossômico) têm material genético

derivado do cromossomo Y, dependendo da metodologia aplicada e população estudada (15,21,33). A tabela 03 mostra a prevalência de seqüências do cromossomo Y encontradas em dezessete estudos, incluindo América, Europa e Ásia.

Tabela 03. Prevalência de seqüências Y-específicas em pacientes com a Síndrome de Turner, em diferentes populações.

População estudada	Prevalência de seqüências Y-específicas (%)	Referência
França	2,5	47
Áustria	3,0	41
Brasil	3,3	35
Inglaterra	4,0	59
Turquia	5,0	46
Rússia	6,6	38
Venezuela	7,6	49
México	8,0	50
Itália	8,8	51
Brasil	8,3	02
México	9,3	52
Dinamarca	12,2	53
Japão	13,3	31
USA	16,0	57
Suécia	25,0	13
Brasil	30,0	15
Inglaterra	100,0	58

## **Introdução**

Linfócitos de sangue periférico são geralmente escolhidos para análise citogenética de pacientes com suspeita de ST, pela facilidade de obtenção das células. No diagnóstico laboratorial, a análise citogenética clássica é feita em trinta metáfases, o que pode detectar 10% de mosaicismo. Se a hipótese de que toda portadora de ST tem mosaicismo for verdadeira, então pacientes com mosaico para uma segunda linhagem celular numa frequência menor que 10% nas células do sangue, não seriam identificadas pelo emprego de técnicas de citogenética clássica (34).

A presença de material cromossômico do Y em indivíduos com ST pode ser investigada tanto citogeneticamente como pelo emprego de técnicas de biologia molecular (35). Essas últimas têm a vantagem de não necessitar de culturas de células e requerer uma quantidade mínima de material para análise. Dessa forma, a utilização de métodos de avaliação molecular na detecção de seqüências cromossomo Y-específicas tornou-se uma ferramenta imprescindível na avaliação destas pacientes (36,37,38). A detecção de mosaicismo é determinada principalmente pelo tipo e o número de tecidos analisados, número de células estudadas (27), sensibilidade das técnicas aplicadas e possibilidade de seleção, com possível perda de linhagens celulares (26). Uma condição clínica com pequena frequência de mosaicismo pode não ser detectada pela técnica de citogenética clássica, pois esse tipo de análise requeriria um número muito grande de células. A aplicação de técnicas moleculares, como a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), melhora substancialmente a detecção de linhagens celulares presentes em baixa frequência e facilita a identificação de possíveis alterações estruturais (39).



## Introdução

Existe uma associação dínica muito importante entre a presença do cromossomo Y, ou fragmentos deste, e o desenvolvimento de gonadoblastoma (Figura 04). Esta associação tem sido amplamente estudada nos casos identificados com auxílio de técnicas de citogenética. Contudo, vários relatos têm demonstrado a presença destes fragmentos em pacientes com exame citogenético prévio negativo para tal cromossomo. A patogênese do gonadoblastoma e o seu potencial maligno ainda são amplamente discutidos, mas sabe-se que esse risco está diretamente relacionado à idade e eleva-se significativamente após a puberdade, devido à ausência de virilização da genitália externa e a localização intra-abdominal das gônadas (40).

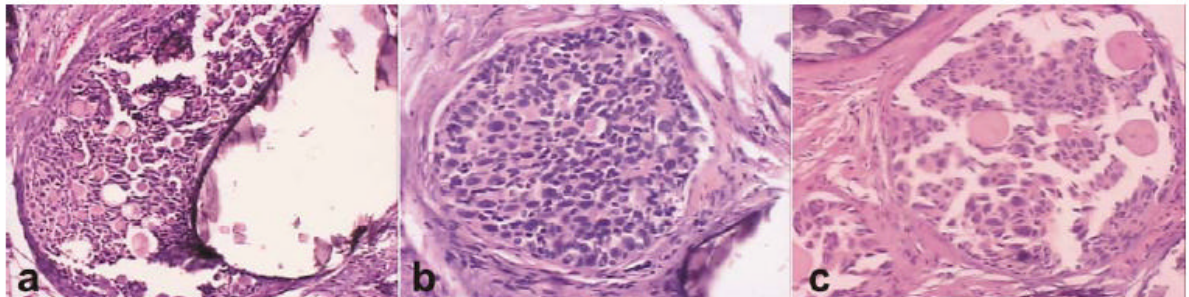


Figura 04. Micrografia (a) X 100 e (b) X 200. Achados histológicos da morfologia gonadal de uma paciente com ST, cariótipo 45,X. Em (a) e (b), gonadoblastoma caracterizado por um agregado celular composto de uma mistura de células germinativas e pequenas células epiteliais da fita gonadal. Em (c) espaços circulares com material eosinofílico, separados por estroma fibroso.

## **Introdução**

O advento da tecnologia do DNA recombinante possibilitou uma análise mais sensível de anormalidades dos cromossomos em nível molecular, ajudando tanto na identificação da origem parental das anomalias como na compreensão da associação entre o genótipo e fenótipo. A detecção de genes ou seqüências destes pela técnica de *PCR* permite identificar pacientes com risco para desenvolvimento do gonadoblastoma com maior eficiência, possibilitando que estas sejam, ou não, submetidas à gonadectomia preventiva. Assim, a avaliação de marcadores moleculares do cromossomo Y pode ser generalizada à todas as pacientes com ST, cujo cariótipo não revele inicialmente a presença do cromossomo Y. Estudos prévios indicam que a PCR é mais sensível que as análises citogenéticas na detecção de mosaicismos ocultos em pacientes com a ST (15,12,43). As seqüências *SRY* e *DYZ3* são as mais frequentemente usadas como marcadores moleculares na maioria destes estudos (Tabela 04). Em geral, o gene *SRY* é usado como referência devido a sua localização e sua função na sinalização da cascata de eventos da determinação sexual. Este gene está localizado no braço curto do cromossomo Y (Yp11.3). Apesar da maior utilização das seqüências *SRY* e *DYZ3*, a importância da identificação de novos genes do cromossomo Y justifica a inclusão de mais marcadores moleculares como *ZFY*, *DYZ1*, *DYS1*, *PABY*, dentre outros (Tabela 04).

Tabela 04. Distribuição de seqüências Y-específicas analisadas e encontradas em pacientes com Síndrome de Turner em diferentes países.

País	Ano do estudo	Seqüências Y-específicas analisadas	Seqüências encontradas	Ref.
USA	1993	<i>SRY e DYZ3</i>	<i>SRY e DYZ3</i>	57
Dinamarca	1995	<i>SRY,DYZ3,DYZ1 e ZFY</i>	<i>SRY,DYZ3,DYZ1 e ZFY</i>	53
Alemanha	1995	<i>SRY e DYZ3</i>	<i>SRY e DYZ3</i>	56
México	1998	<i>SRY e ZFY</i>	<i>SRY e ZFY</i>	50
Rússia	1998	<i>SRY</i>	<i>SRY</i>	38
Brasil	1999	<i>SRY</i>	<i>SRY</i>	2
Inglaterra	1999	<i>SRY,DYZ3,DYZ1,PABY e AMXY</i>	<i>SRY,DYZ3, PABY</i>	59
Áustria	1999	<i>SRY,DYZ3,DYZ1,ZFY,PABY</i>	<i>SRY,DYZ3, ZFY,PABY</i>	41
Dinamarca	2000	<i>SRY,DYZ3,DYZ1,DYS1,ZFY,YRRM</i>	<i>SRY,DYZ3,DYZ1,ZFY</i>	53
México	2000	<i>SRY,ZFY e PABY</i>	<i>SRY,ZFY e PABY</i>	52
Japão	2001	<i>SRY e DYZ3</i>	<i>SRY e DYZ3</i>	31
Brasil	2002	<i>SRY e TSPY</i>	<i>SRY e TSPY</i>	35
Índia	2002	<i>SRY, DYZ3, DYS1 e PABY</i>	<i>SRY, DYZ3</i>	60
Suécia	2002	<i>SRY, DYZ3 e DYZ1</i>	<i>SRY, DYZ3 e DYZ1</i>	13
Venezuela	2003	<i>SRY,DYZ3,ZFY,PABY,DYS1,DYZ1,T SPY</i>	<i>SRY,DYZ3,ZFY,PABY, DYS1</i>	49
Índia	2003	<i>SRY,DYZ3, PABY,DYS1</i>	<i>SRY,DYZ3, PABY,DYS1</i>	11
Itália	2005	<i>DYZ3</i>	<i>DYZ3</i>	51
Brasil	2006	<i>SRY e DYZ3</i>	<i>SRY e DYZ3</i>	15
		<i>SRY,DYZ3,PABY,DYS1,DYS14,DYS</i>	<i>SRY,DYZ3,PABY,DYS1</i>	
Turquia	2007	<i>209,DYS213,DYS218,DYS224,DYS231,DYS27DYS280,DYZ1,AMGY.</i>	<i>DYS14,DYS209,DYS213</i>	46

Como a presença de um cromossomo Y, ou parte dele, está associada ao risco de desenvolvimento de gonadoblastoma em até 30% das pacientes, há necessidade de se identificar pacientes sob risco. O objetivo deste estudo é rastrear a presença das seqüências Y-específicas **SRY, DYS1, DYZ1, PABY, ZFY e DYZ3** em pacientes com ST dando suporte a proposta de que esta investigação pode ser útil na prevenção do gonadoblastoma.

## OBJETIVO GERAL

Rastrear a presença de seqüências Y-específicas em pacientes com a Síndrome de Turner.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as variantes citogenéticas em pacientes com a Síndrome de Turner.
- Investigar a presença das seqüências **SRY, DYS1, DYZ1, PABY, ZFY e DYZ3**, específicas do cromossomo Y em pacientes com a Síndrome de Turner não identificadas no cariótipo.
- Rastrear entre os indivíduos com a Síndrome de Turner aquelas com maior risco de desenvolvimento de gonadoblastoma.

**Tipo de Estudo**

Estudo de corte transversal, descritivo de pacientes com ST em Mato Grosso.

**Tamanho da amostra**

Na determinação do tamanho da amostra, considerou-se o desenho do estudo, assumiu-se prevalência de fragmentos do cromossomo Y em 3% nos indivíduos com ST (41), intervalo de confiança de 95% e imprecisão de 6%, segundo a fórmula:

$N = (1,62)^2 \times p(1-p) / \delta^2$  onde,  $p$  = proporção de 0,03 e  $\delta^2$  = Imprecisão de 0,06  $\delta^2$

**Pacientes**

O estudo incluiu 42 pacientes, com idade entre 1 mês e 40 anos, atendidas no Ambulatório de Genética da Unidade de Genética Médica e Biologia Molecular do HGU/UNIC e/ou encaminhadas do Ambulatório de Desvio de Crescimento e Desenvolvimento do Hospital Universitário Júlio Muller (HUJM) ou de outras Unidades de assistência médica no município de Cuiabá. Todas as pacientes que participaram do estudo foram acompanhadas por um especialista em genética médica, para a verificação das características clínicas e aconselhamento genético. As principais alterações clínicas encontradas na ST estão listadas na Tabela 04, modificada de Frias e Davenport, 2003. Os critérios de inclusão no estudo foram fenótipos femininos com marcadores clínicos e cariótipo compatível com a ST e concordância da paciente, ou responsáveis, em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram excluídas do estudo as pacientes com ST que apresentaram na constituição cromossômica o cromossomo Y.

## Considerações éticas

Todas as pacientes participantes do estudo, ou os responsáveis pelas mesmas, assinaram o TCLE aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá (UNIC) em 24 de fevereiro de 2006.

## Coleta das amostras

Foram coletados cerca de 5mL de sangue venoso de cada paciente incluída no estudo utilizando seringa estéril contendo heparina (Liquemine<sup>®</sup>, Roche<sup>®</sup>, Suíça). Esta amostra foi mantida em geladeira com temperatura entre 2°C e 8°C até o momento da cultura de linfócitos, todas realizadas no mesmo dia da coleta. Para as análises moleculares coletaram-se outros 5mL de sangue venoso também em seringa estéril. Esta amostra foi transferida para um tubo *vacutainer* e armazenada em geladeira até o momento da extração do DNA.

## Análise Citogenética

### Cultura de linfócitos

As culturas de linfócitos periféricos foram realizadas à partir da técnica de Moorhead *et al* (1960) com modificações. Em cada frasco de cultura falcon 15mL (Gibco<sup>®</sup> EUA) foram adicionados 5,0mL de meio RPMI 1640 (Difco<sup>®</sup> EUA) enriquecido com 20% de soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup> EUA), 0,2mL de fito-hemaglutinina (Gibco<sup>®</sup> EUA) e cerca de 0,4mL de sangue total, previamente homogeneizado. Os frascos foram então incubados em estufa à 37°C por 72 horas. Toda a semeadura foi realizada em capela de fluxo laminar. Aproximadamente 40 minutos antes do início da preparação citológica, foi adicionado em cada frasco 0,1mL de colchicina (Sigma<sup>®</sup>, Brasil) na concentração final de

0,08 µg/mL para promover a parada da divisão celular na metáfase, uma vez que a colchicina é um agente anti-mitótico.

### **Preparação Citológica**

Após 40 minutos do tratamento com colchicina, o material foi submetido à centrifugação a 12879xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 4mL de solução hipotônica de KCl 0,075 M. Os frascos de cultura foram então incubados em estufa à 37°C por 10 minutos. Após a incubação, repetiu-se a centrifugação e o sobrenadante foi novamente desprezado. A fixação do material foi feita com a adição de 4 mL de uma solução fixadora, recém-preparada constituída de metanol e ácido acético glacial, na proporção de 3:1. Este processo de fixação foi repetido por 3 vezes. Após, o material foi mantido em geladeira a 4°C por pelo menos uma hora antes da preparação das lâminas. As lâminas previamente mantidas em água deionizada gelada foram montadas, gotejando-se 2 a 3 gotas do material citológico homogeneizado e, após este procedimento, foram secas à temperatura ambiente.

### **Métodos de coloração**

#### **Coloração Convencional**

As lâminas de todos os casos foram analisadas primeiramente em coloração convencional. Colocou-se um filme de corante contendo 1mL de corante Giemsa (Merck® Brasil) para 9mL de tampão Sorensen pH 6,8 sob cada lâmina por 6 minutos. Após, estas foram então lavadas em água corrente, e secas em temperatura ambiente.

### **Material e Métodos**

#### **Bandeamento G**

As lâminas usadas para bandeamento foram preparadas pelo menos 5 dias antes da data da coloração. O bandeamento G foi realizado segundo técnica de Sanchez *et al*, (1973). Em síntese, as lâminas foram incubadas em tampão fosfato 0,06 M, pH 6,8, durante 1 minuto à 37° C, lavadas em água deionizada, secas e mantidas em temperatura ambiente. Foi colocada então, uma camada de solução corante, previamente preparada com corante Wright (Merck<sup>®</sup>, Brasil) e tampão fosfato 0,06 M, numa proporção de 3:1, aguardando-se 3 a 4 minutos. Após este procedimento as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente até a leitura. Foram analisadas 30 células de cada paciente, utilizando objetiva de imersão com 100 x de aumento em microscópio Nikon Eclipse 2000 Hexasystems (Biometrix<sup>®</sup>, Brasil). Nos casos onde o mosaicismo foi identificado, analisou-se 50 células de cada indivíduo.

## **Análise Molecular**

Foram realizadas amplificações de DNA das pacientes, através da técnica de PCR, para a identificação dos marcadores de DNA do cromossomo Y, *SRY*, *DYS1*, *DYZ1*, *PABY*, *ZFY* e *DYZ3*.

## **Extração do DNA**

O método de extração do DNA foi realizado, com modificações, a partir do método descrito por Lahiri & Nurnberg (1991). Aproximadamente 5mL de sangue periférico total de cada paciente foram coletados e transferidos para tubos falcon de 15 mL (Gibco<sup>®</sup>, EUA), identificados, e centrifugados durante 8 minutos a 2236xg. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado, e a membrana celular foi submetida à primeira etapa de lise. Para tal, foram utilizados 9 mL da solução 1X TM1, constituída em 10X TM1 (100 mM



Tris-HCl, 100 mM KCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM EDTA) diluída em Triton X-100 2,75% na proporção de 3:1. Este material foi novamente centrifugado nas condições acima. Retirado o sobrenadante, o sedimento foi novamente lavado em 8,5 mL de 1X TM1. Este procedimento (centrifugação, retirada do sobrenadante, lavagem e ressuspensão) foi repetido até que o precipitado de células estivesse isento de hemoglobina. Após centrifugação com 1X TM1, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspendido em 1,6 mL de 1X TM2 (10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 0,4 N NaCl), consistindo esta a segunda etapa de lise. Foram adicionados a este tubo, 160 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e colocados em banho-maria à 56°C por 15 minutos. Após este tempo, 480 µl de 5M NaCl foram adicionados e o material centrifugado a 12879xg por 5 minutos. O sobrenadante foi então transferido para um tubo falcon 15mL (Gibco® EUA) contendo 10 mL de etanol absoluto gelado. O tubo foi tampado com vitafilm (Royal Pack®, Brasil) e invertido por 5 vezes, causando precipitação do DNA. Após a etapa de precipitação, o DNA foi retirado do tubo falcon com uma pipeta tipo Pasteur e transferido para microtubo de 0,5 mL. Este tubo foi mantido com a tampa aberta em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo o DNA foi ressuspendido em 200 µl de TE e armazenado em um freezer -20 °C.

### **Quantificação do DNA**

Para a quantificação das amostras de DNA extraídas adicionou-se 5µl do material obtido a 1µl de tampão azul de bromofenol. Esta amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% diluída em TAE 1x (Tris 0,089 M, Acetato 0,089 M, EDTA 0,01 M pH 7,5). Para esta técnica utilizou-se um campo elétrico de 148 Volts por aproximadamente 1 hora. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL por cerca de 10 minutos e visualizado sob luz ultravioleta. A dosagem do DNA foi feita por comparação com o padrão de peso molecular ? Hind III (Invitrogen®, Brasil).

## Amplificação Gênica

Seis diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores sintetizados a partir de regiões ao redor do centrômero e nos braços curto e longo do cromossomo Y foram usados na PCR, para a amplificação do DNA e investigação dos seguintes marcadores: (1) SRY, gene localizado na região centromérica, com 242pb; (2) ZFY, gene localizado no braço curto (Yp) com 735pb; (3) DYZ1, uma sequência repetitiva, localizada na parte distal do braço longo (Yq), com 290pb, compreendendo cerca de 40% do total do cromossomo Y; (4) PABY, região do braço curto do cromossomo Y (Yp), com 970 pb; (5) DYS1, sequência localizada no braço longo (Yq) e (6) DYZ3, localizada na região centromérica com 170pb (Figura. 05 e Tabela 05).

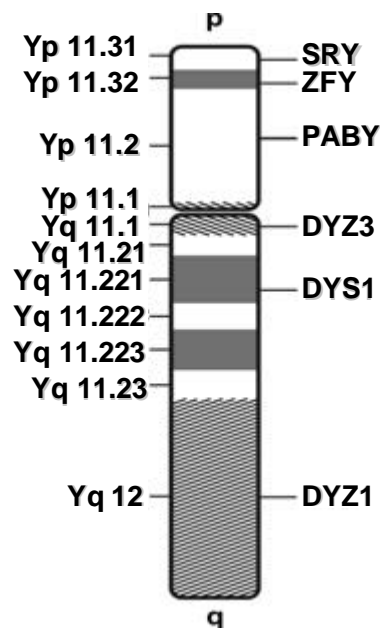


Figura 05. Ideograma demonstrando as localizações das seis regiões do cromossomo Y analisadas no presente estudo.

Tabela 05. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) usadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para identificação de fragmentos Y-específicos.

<b>Loci</b>	<b>Sequências de primers</b>	<b>Tamanho do Amplicom (bp)</b>	<b>Referência</b>
SRY	<b>A</b> 5'- CTAGACCGCAGAGGGCGCCAT-3' <b>B</b> 5'- TAGTACCCACGCCTGCTCCGG-3'	242	12
ZFY	<b>A</b> 5'- CGAATTCATACCGGCGAGAAGCCATACC-3' <b>B</b> 5'- AAAGCTTGTAGACACATCGTTAGGG-3'	735	12
PABY	<b>A</b> 5'- CTACTACCTTTAGAAAAGTAGTATTTTCCC-3' <b>B</b> 5'- GAATTCTTAACAGGACCCATTTAGGATTAA-3'	970	11
DYZ1	<b>A</b> 5'- TTTCTTTTCGCTTGCATTCCAT- 3' <b>B</b> 5' – TGAAATGGACTGGAAAGGAATG-3'	290	11
DYS1	<b>A</b> 5- AATAGAGCCTTATCAGCAGA- 3 ' <b>B</b> 5- AGTCAGTCTGGATGTTTCAG -3'	710	11
DYZ3	<b>A</b> 5'- TGAAAAGTACACAGAAGCTG -3'; <b>B</b> 5'- ACACATCACAAGAACTATG-3'	1000	15
R	<b>A</b> 5' GACTCAAGCCTCTTGCCTTC- 3' <b>B</b> 5' CACAGAGTCCTAGGCAGGTC- 3'	133	12

\* A = Sequência sense

\* B= Anti-sense

Para otimizar a ação dos iniciadores sense e anti-sense, melhorar a amplificação das seqüências de interesse e evitar reações inespecíficas, fez-se uma busca entre os programas de PCR para a escolha das temperaturas mais adequadas para a ação da polimerase e anelamento e definição do número de ciclos ideais para a extensão das fitas. A PCR foi realizada com volume final de 50  $\mu$ l, consistiu-se de: 50  $\mu$ l de PCR Supermix com Taq Platinun (Invitrogen<sup>®</sup>, Brasil), 0,40  $\mu$ l de cada seqüência iniciadora (concentração final de 0,2  $\mu$ M) e 1  $\mu$ l de DNA. Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão da PCR foram realizados em aparelho termociclador (*Gene Amp PCR System 9600 – Perkin Elmer<sup>®</sup>*). O processo de amplificação foi constituído de 30 ciclos com diferentes programas para cada par de *primers* (Tabela 6). Para cada processo de amplificação utilizou-se, além das amostras de DNA das pacientes, amostras de DNA controles: indivíduo normal do sexo masculino (controle positivo), indivíduo normal do sexo feminino (controle negativo), além do exon 5 do gene da rodopsina (PRODIMOL<sup>®</sup>, Brasil) como controle da qualidade do DNA de todas as reações de amplificação.

Tabela 06. Descrição dos parâmetros usados nos ciclos de amplificação gênica da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Primers	Temperatura/Tempo de desnaturação	Temperatura/Tempo de anelamento	Temperatura/Tempo de extensão
<i>SRY</i>	94°C – 1 minuto	64 °C - 1 minuto	72°C – 2:30 minutos
<i>ZFY</i>	94°C – 1 minuto	61 °C – 1:30 minutos	72°C – 2:30 minutos
<i>PABY</i>	94°C – 1 minuto	58 °C - 2:30 minutos	72°C – 2:30 minutos
<i>DYZ1</i>	94°C – 1 minuto	58 °C - 2:30 minutos	72°C – 2:30 minutos
<i>DYS1</i>	94°C – 1 minuto	50 °C - 1 minuto	72°C – 2:30 minutos
<i>DYZ3</i>	94°C – 1 minuto	50 °C - 1 minuto	72°C – 2:30 minutos

**Detecção do DNA amplificado**

Para uma melhor visualização das bandas, foram analisadas 10 amostras por detecção. A verificação da amplificação do DNA foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio. Esta técnica foi realizada em Cuba Horizontal 20.25 Life Technologies (Gibco<sup>®</sup> Brasil). O gel foi preparado a partir de 3g de agarose dissolvida em 300 ml de Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris 0,089 M, Borato 0,089 M, EDTA 0,01 M pH 7,5). A mistura foi aquecida em um forno microondas (Cônsul<sup>®</sup>, Brasil) por aproximadamente 3 minutos ou até que a agarose fosse totalmente dissolvida. A solução, quando homogênea e morna, foi então despejada em uma cuba de eletroforese, contendo pentes com canaletas adequada e deixada em repouso por cerca de 20 minutos para que ocorresse a polimerização. Preparou-se um tampão de migração usando-se 1000 mL de Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X e colocado na cuba de eletroforese, cobrindo totalmente o gel de agarose para a homogeneização da temperatura. Com uma micropipeta de 10-20 $\mu$ l, adicionou-se em cada poço uma mistura de 19 $\mu$ l do amplicon e 1 $\mu$ l de tampão de corrida (azul de brofenol 0,1%). Foi utilizado marcador de corrida, DNA Ladder 100 bp (Invitrogen<sup>®</sup>, Brasil) como padrão para a análise das bandas. Ao padrão, também foi adicionado o tampão de corrida. A migração ocorreu a uma voltagem de 138 V por aproximadamente 50 minutos, com pequenas modificações no tempo de corrida, de acordo com o peso molecular de cada primer estudado. Após este período o gel foi transferido para uma cuba contendo uma solução corante composta de brometo de etídio dissolvido em água na concentração de 10mg/ml, e estocada em ambiente escuro durante cerca de 10 minutos ou até o aparecimento das bandas. Após a revelação, o gel foi transferido para um transiluminador (Bio Rad<sup>®</sup>, USA), analisado e fotodocumentado através de câmara digital (Sony T10 7.0, Japão), sob luz ultravioleta.

## Estudos Citogenéticos

A análise de 30 metáfases de cada paciente, por bandamento G e resolução de 400-500 bandas, identificou 27 pacientes (64,2%) com monossomia do cromossomo X (45,X) e 15 com mosaïcismo. Nos casos de mosaïcismo, a reanálise de 50 metáfases detectou 11 (26,8%) pacientes com mosaïcismo 45,X/46,XX; 3 (7,36 %) 45,X/46,X,i(Xq) e 1 (2,43%) com 45,X/46,X,del(Xq). Estes dados estão apresentados na tabela 7.

Tabela 07. Distribuição dos cariótipos compatíveis com a Síndrome de Turner entre as 42 pacientes incluídas no estudo.

<b>Cariótipo</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
45, X	27	64,28
45,X/46,XX	11	26,20
45,X/46,Xi(Xq)	3	7,14
45,X/46,X,del(Xq)	1	2,38
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>100</b>

## Análise das Sequências Específicas

A síntese dos resultados das análises moleculares deste estudo é mostrada na Tabela 8.

Tabela 08. Resultados das análises moleculares das seqüências Y-específicas em 42 pacientes com ST.

Pacientes	Idade	Cariótipo	Seqüências Y-específicas analisadas					
			SRY	ZFY	DYZ1	PABY	DYS1	DYZ3
1	17	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
2	22	45,X	-	-	-	-	-	-
3	3	45,X	-	-	-	-	-	-
4	8	45,X/46,X,i(Xq)	-	-	-	-	-	-
5	12	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
6	12	45,X	-	-	-	-	-	-
7	21	45,X/46,X,i(Xq)	-	-	-	-	-	-
8	13	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
9	18	45,X	-	-	-	-	-	-
10	4	45,X	-	-	-	-	-	-
11	17	45,X	-	-	-	-	-	+
12	12	45,X	-	-	-	-	-	-
13	15	45,X/46,i,(Xq)	-	-	-	-	-	-
14	3	45,X	-	-	-	-	-	-
15	15	45,X	-	-	-	-	-	-
16	16	45,X	-	-	-	-	-	-
17	2	45,X	-	-	-	-	-	-
18	14	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
19	13	45,X	-	-	-	-	-	-
20	25	45,X	-	-	-	-	-	-
21	20	45,X	-	-	-	-	-	-
22	18	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
23	7	45,X	-	-	-	-	-	-
24	4	45,X	-	-	-	-	-	-
25	10	45,X	-	-	-	-	-	-
26	17	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
27	26	45,X/46,XX,del	-	-	-	-	-	-
28	17	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
29	18	45,X	-	-	-	-	-	-
30	16	45,X	-	-	-	-	-	-
31	12	45,X	-	-	-	-	-	-
32	16	45,X	-	-	-	-	-	-
33	11	45,X	-	-	-	-	-	-
34	12	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
35	24	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
36	33	45,X	-	-	-	-	-	-
37	40	45,X	-	-	-	-	-	-
38	18	45,X	-	-	-	-	-	-
39	8	45,X	-	+	-	-	-	-
40	22	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
41	18	45,X/46,XX	-	-	-	-	-	-
42	1 mês	45,X	-	-	-	-	-	-

(+) Pacientes com resultado positivo para a seqüência analisada

(-) Paciente com resultado negativo para a seqüência analisada

Através das análises moleculares foi possível detectar de 2 pacientes (2/42), (4,87%) com as seqüências Y-específicas em suas células, ambas com cariótipo 45, X. A amplificação do gene *ZFY* foi observada em uma destas pacientes, ST39 (Figura 04). Clinicamente, esta paciente apresenta mandíbula pequena, palato em ogiva, dentes sobrepostos, espina bífida, otite aguda, cardiopatias, timidez excessiva, dificuldade no desempenho escolar.

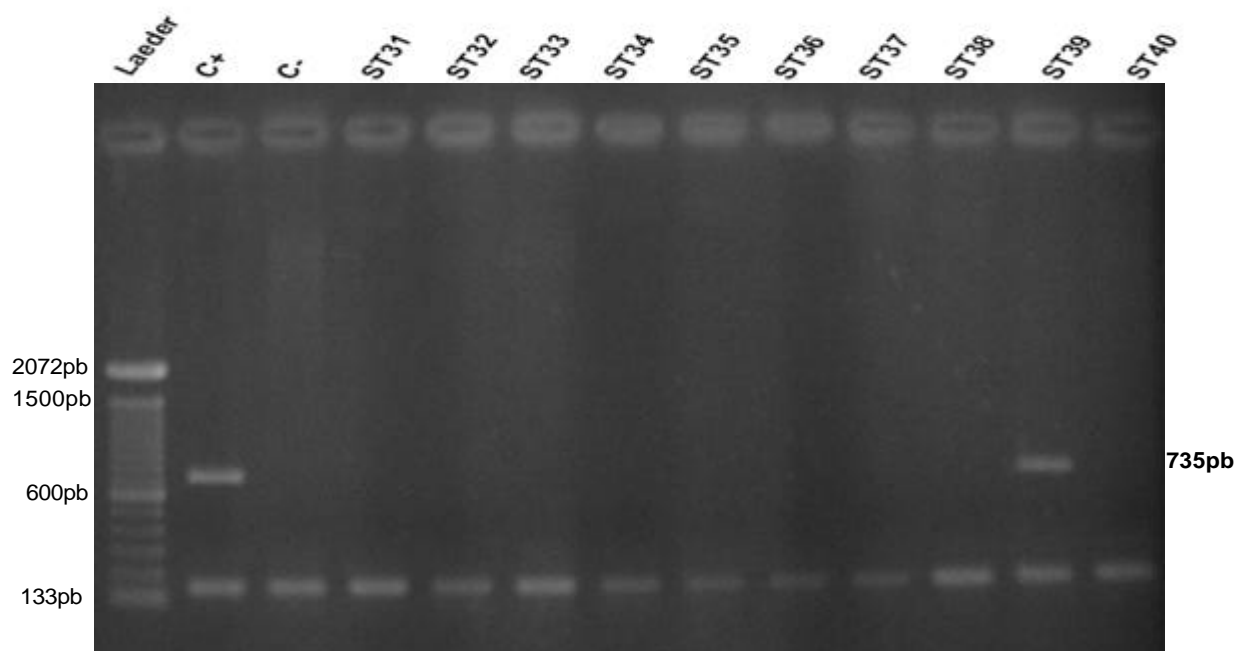


Figura 06. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das pacientes ST31 a ST40 do fragmento ZFY demonstrando positividade na amostra da paciente ST39. A canaleta 1 apresenta o padrão de pesos moleculares e as canaletas 2 e 3 os controles positivo (C<sup>+</sup>) e negativo (C<sup>-</sup>) da reação. O *primer* do gene da rodopsina (133pb), mostrado em todas as canaletas foi usado como controle da qualidade do DNA em todas as reações.



A amplificação da seqüência *DYZ3* foi observada em uma das pacientes (ST11), também com cariótipo 45,X (Figura 05). Esta paciente apresenta tendência a quelóides, maxilar estreito e dentes sobrepostos, espina bífida, deformidade dos pés, otite aguda, rim em ferradura e grande dificuldade no desempenho escolar.

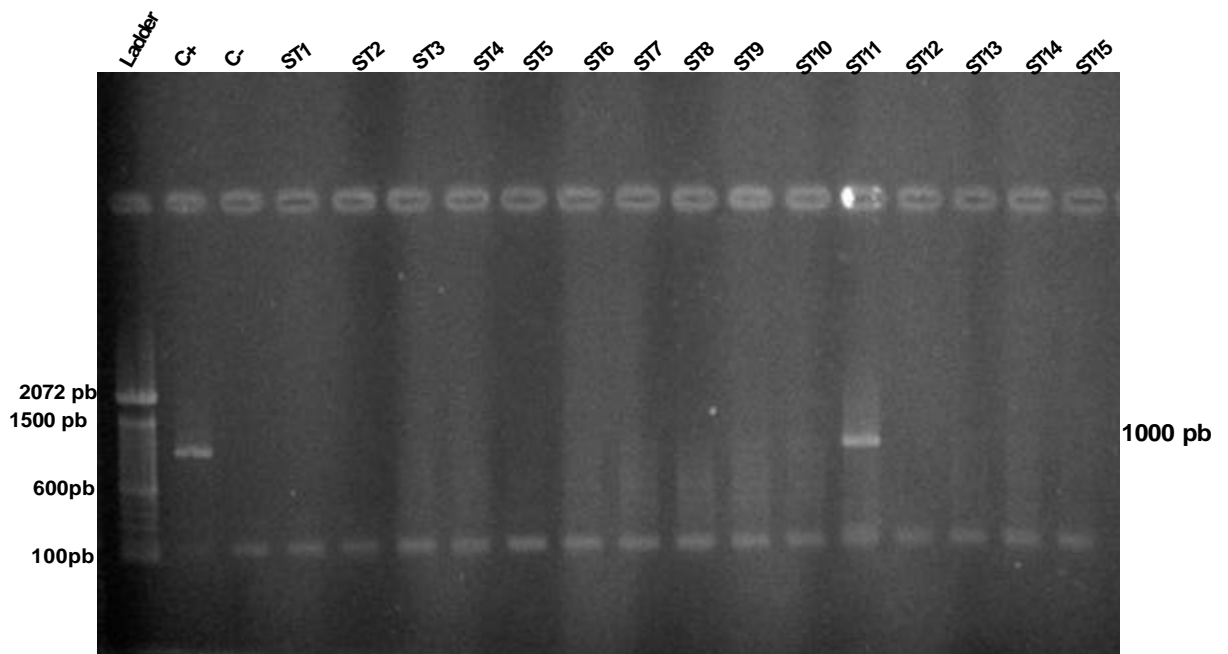


Figura 07. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das pacientes ST01 a ST15 para a análise do fragmento *DYZ3* demonstrando positividade na amostra da paciente ST11 para este fragmento. A canaleta 1 apresenta o padrão de pesos moleculares e as canaletas 2 e 3 os controles positivo (C<sup>+</sup>) e negativo (C<sup>-</sup>) da reação. O *primer* do gene da rodopsina (133pb), mostrado em todas as canaletas foi usado como controle da qualidade do DNA em todas as reações.

Análises moleculares têm sido cada vez mais utilizadas como uma ferramenta fundamental na avaliação clínica de diversas doenças, incluindo a ST. Nesta, o aumento do risco de desenvolvimento de tumores gonadais, especialmente gonadoblastoma, tem sido relacionado à presença de fragmentos do cromossomo Y. Estima-se que cerca de 90% dos pacientes com gonadoblastoma possuem material de cromossomo Y na sua constituição genética. A maioria destes indivíduos apresenta fenótipo feminino com algum grau de virilização. Logo, a detecção de seqüências específicas deste cromossomo, nestas pacientes, é relevante na identificação daquelas com risco de gonadoblastoma e prevenção do desenvolvimento deste tumor. A pesquisa destes marcadores deve ser realizada tão logo o diagnóstico citogenético da ST seja estabelecido, desde que não tenha sido identificada a presença do cromossomo Y íntegro ou algum de seus marcadores. Na verdade, estes marcadores ou seqüências Y-específicas nem sempre são detectadas com técnicas de citogenética clássicas e dependem, portanto, de uma refinada avaliação molecular, ainda não disponível em todos os serviços de assistência à saúde.

Em Mato Grosso, Junqueira *et al* (2005) estudou 17 pacientes com a ST e verificaram que 41,1% destas apresentavam cariótipo 45,X. Dentre estas pacientes, todas incluídas no presente estudo, em apenas seis havia sido realizado pesquisa para identificar possível existência de fragmentos do cromossomo Y. Além disso, nesta busca, foram utilizadas apenas três seqüências Y-específicas (*SRY*, *DYS1* e *TSPY*) e nenhum resultado positivo foi encontrado. No presente estudo, uma destas pacientes com resultado anteriormente negativo para as seqüências *SRY*, *DYS1* e *TSPY*, apresentou positividade para a seqüência *DYZ3*. Este fato reforça a importância da investigação de um maior número de seqüências Y-específicas na ST.

As análises moleculares de seis diferentes fragmentos do cromossomo Y em 42 pacientes, com idade entre 1 mês e 40 anos, sem nenhum sinal de virilização, revelaram a presença das seqüências *ZFY* e *DYZ3* em 02 destas (4,8%) no presente estudo, ambas com cariótipo 45,X. Este resultado é concordante com a maioria dos estudos realizados com este objetivo, dimensionando a ocorrência de material do cromossomo Y entre 2 e 8% dos casos investigados. O emprego da técnica PCR para investigar 14 regiões do cromossomo Y em 40 pacientes com ST e cariótipo 45,X, de distintos centros médicos na Turquia, com idade entre 1 e 25 anos, permitiu a identificação de 02 (5%) com fragmentos Y na sua constituição genética (46). Em estudo mais antigo, incluindo 40 pacientes francesas com ST, cariótipo 45,X e mosaicismo, uma prevalência de 2,5% da seqüência *SRY* foi relatada (47). Em estudo maior, realizado na Áustria, incluindo 208 portadoras da ST com idade entre 2 e 39 anos, investigando oito diferentes fragmentos do cromossomo Y por PCR, foram identificadas 06 pacientes (3%) com presença de material do cromossomo Y (41).

Um estudo brasileiro, realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, também investigando oito seqüências Y-específicas em 122 pacientes com ST, com uma idade média 12,2 anos, sem nenhum sinal de virilização, cariótipo 45,X, mosaicos ou outras anomalias estruturais do cromossomo X, detectou 4 pacientes (3,3%) com pelo menos uma seqüência Y-específica (35). Duas destas pacientes (3,6%) apresentaram os fragmentos *SRY*, *TSPY* e *DYZ3* do cromossomo Y. Em um estudo chileno incluindo 58 meninas com ST, com cariótipos 45,X e mosaico, foram analisadas as seqüências *SRY*, *TSPY* e *DZ3*, do sangue periférico através da técnica de PCR e foram detectadas todas as seqüências estudadas em 04 (6,8%) destas pacientes (48).

Duas pacientes (4%) apresentaram seis das oito seqüências do cromossomo Y, investigadas por PCR e FISH em um estudo com 50 pacientes com cariótipo 45,X, em Londres, Inglaterra (34). A investigação de duas seqüências Y-específicas, SRY e TSPY, por PCR multiplex, em 30 pacientes russas, com idade entre 12 e 25 anos, detectou positividade em 05 delas (16,6%) (37). Uma prevalência de 7,6% dos fragmentos do cromossomo Y foi encontrada na Venezuela em um estudo incluindo 52 pacientes com ST, de origem étnica mestiça e cariótipo 45,X. Neste estudo foram analisadas cinco seqüências Y-específicas e quatro destas, ZFY, DYZ3, DYS19 e TSPY foram encontradas em pelo menos uma das quatro pacientes com resultado positivo (49).

A pesquisa das seqüências ZFY e SRY pela técnica de PCR em 50 pacientes mexicanas, com cariótipo 45,X e idade entre 3 e 24 anos, detectou 04 pacientes (8%) com estas seqüências (50). Esta mesma prevalência (8%) da seqüência DYZ3, pesquisada por meio da PCR foi encontrada em outro estudo, realizado na Itália, incluindo 171 pacientes com idade entre 1 e 34 anos e cariótipo em mosaico (51). A investigação dos fragmentos SRY, ZFY e DYZ3 em 36 pacientes brasileiras, sem nenhum sinal de virilização e idade média de 18 anos, identificou 02 pacientes (8,3%) com a presença das três seqüências analisadas (12). Na cidade do México, em estudo incluindo 107 portadoras da ST, cariótipo 45, X, de origem étnica mestiça e idade entre um mês e 34 anos, fragmentos SRY, ZFY e PABY foram identificados em 10 pacientes (9,3%) (33). Destas pacientes com resultado positivo, duas foram diagnosticadas com tumor gonadal, indicando um risco de 33% de pacientes com ST e seqüências Y-específicas positiva desenvolverem gonadoblastoma (52).

A análise de cinco seqüências Y-específicas em 114 pacientes dinamarquesas com ST, cariótipo 45, X ou mosaico, idade entre 1 e 66 anos, sem sinal de virilização mostrou a presença de pelo menos uma das seqüências em 14 (12,2%). Estas pacientes com resultados positivos foram ainda investigadas através de outros quatro marcadores específicos de outras seqüências do cromossomo Y, e, em dez delas, estes fragmentos foram identificados (53). Larsen *et al* (1995) estudando quatro fragmentos do cromossomo Y pela técnica de PCR em 40 pacientes também dinamarquesas, com ST e monossomia do cromossomo X, observaram mosaicismo oculto em 06 destas (15%) (54). Estes resultados permitem especular uma maior prevalência de seqüências Y- específicas nas pacientes com ST daquela região.

Embora a prevalência de seqüências do cromossomo Y tenha sido estimada entre 2,3% a 15% das pacientes com ST, percebe-se que a real freqüência depende muito dos métodos utilizados e do tecido analisado (1,15,21,48,51,53). Alguns grupos têm encontrado uma porcentagem de pacientes com ST e seqüências Y-específicas positivas ainda maior (12,34,46,47,56,57). No conjunto destes estudos, a freqüência de seqüências Y-específicas encontrada em pacientes com esta síndrome varia na amplitude de 0 a 60% (15,21,34,48,56,58,59). Fatores como seleção de pacientes, raça, número de metáfases analisadas na avaliação citogenética, tamanho da amostra, metodologia aplicada e diferentes marcadores moleculares usados parecem contribuir para esta diferença tão ampla (15, 26,41,48,51,56). Vale ainda ressaltar que o mosaicismo oculto pode não ser detectado no sangue periférico, mas pode estar presente em amostras de outros tecidos de diferentes origens embrionárias (31,60). Logo, a prevalência pode ainda depender do tecido ou tecidos analisados. Neste contexto, a análise adicional de células de tecidos de diferentes origens embrionárias como linfócitos da mesoderme e células do epitélio bucal

da ectoderme, através da PCR ou outras técnicas de biologia molecular, pode permitir uma definição mais precisa do diagnóstico (56).

Na prática clínica, fatores importantes a serem considerados na investigação de fragmentos do cromossomo Y nos indivíduos com ST são o tipo e o número de tecidos analisados. Embora os linfócitos do sangue periférico seja geralmente o tecido escolhido para estas análises, outros podem também ser investigados. Kocova *et al* (1993) estudaram, na Pensilvânia (USA), as seqüências *SRY* e *DYZ3*, por PCR, nas células do sangue periférico de 18 pacientes com ST e encontraram positividade apenas para a seqüência *SRY* em 03 pacientes (16%), duas com cariótipo 45,X e uma 45,X/46,XX (58). Estas mesmas seqüências foram estudadas, também no sangue periférico de outras 90 pacientes no Japão. As pacientes incluídas também tinham cariótipo 45,X ou mosaico e a presença da seqüência *SRY* foi detectada em 11 (12,2%) e a *DYZ3* em 12 destas (13,3%) (31). Uma prevalência de 3,1% das seqüências *SRY* e *DYZ3* foi encontrada na Alemanha em um estudo incluindo 53 pacientes com ST, idade entre 2 e 32 anos e cariótipo 45,X ou mosaico. Neste estudo, o tecido analisado foi também o sangue periférico, e duas pacientes, com cariótipos 45,X e 46,Xi(Xq), apresentaram positividade (3,7%) (57).

A investigação por PCR dos fragmentos *SRY*, *ZFY* e *DYZ3* do sangue periférico de 36 pacientes brasileiras, identificou 02 pacientes (8,3%) com a presença das três seqüências analisadas (12). Em um outro estudo brasileiro, na cidade de São Paulo, incluindo 20 pacientes com ST e cariótipo 45,X, a seqüência *SRY* foi encontrada nas células do sangue periférico em 04 casos (25%), uma freqüência maior que as dos estudos anteriormente citados. Neste mesmo estudo o fragmento *DYZ3* foi também detectado em 20% das amostras analisadas. As seqüências *SRY*, *DYZ1*, *DYZ3* e *PABY* foram investigadas nos linfócitos de 14 pacientes inglesas, detectando a seqüência *DYZ3* em 14

destas (100%), a seqüência *SRY* em 13 (93%) e a *PABY* em apenas 02 (14%). Nenhuma paciente do estudo apresentou a seqüência *DYZ1* (59). Este último dado demonstra uma prevalência de seqüências Y-específicas maior que nos estudos anteriores, apesar da análise ter sido feita em um único tecido.

Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade de resultados diferentes quando se analisa diferentes tecidos. Mosaicismo pode não ser detectado nos linfócitos, mas estar presentes em amostras de tecidos de outras origens embrionárias, como a mucosa bucal, pele ou raiz do cabelo (13,34). As seqüências *SRY* e *DYZ3* foram investigadas em biópsia de pele, além do sangue periférico, de 18 pacientes com ST, encontrando-se a seqüência *SRY* em 03 pacientes (16%), duas com cariótipo 45,X e uma, 45,X/46,XX (58). Em um estudo brasileiro, incluindo 20 pacientes com ST e cariótipo 45,X, as seqüências *SRY* e *DYZ3* foram investigadas nas amostras da mucosa oral e raiz do cabelo. Sete destas pacientes apresentaram seqüências Y-específicas em pelo menos um dos tecidos estudados. A seqüência *SRY* foi encontrada nas células da raiz do cabelo em 06 destas (30%) dos casos e nas células da mucosa oral em 04 (20%), freqüência maior que as dos estudos anteriormente citados. O fragmento *DYZ3* foi detectado também em 04 pacientes (20%) das amostras destes tecidos. Com estes resultados os autores sugeriram que a análise de fragmentos do cromossomo Y seja feita em diferentes tecidos, uma vez que o mosaicismo oculto pode não ser detectado quando se analisa apenas o sangue periférico (15).

Hanson *et al* (2002) analisaram as seqüências *SRY*, *DYZ3* e *DYZ1* de 12 pacientes suecas com ST nos linfócitos e células da mucosa oral. Em 5 delas (42%) não se verificou diferença na freqüência de células Y-positivas nestes tecidos, uma vez que todas elas apresentaram as seqüências analisadas em ambos os tecidos. Analisou-se então o tecido

ovariano destas 5 mulheres e observou-se células Y-positivas neste tecido em todas as pacientes, indicando que apesar de a abordagem de múltiplos tecidos aumentar as chances de identificação de mosaicismo oculto, os linfócitos podem ser usados isoladamente como bons preditores da presença do material do cromossomo Y nos tecidos ovarianos (13).

A pesquisa de material do cromossomo Y tem sido recomendada por vários autores para pacientes com ou sem evidência de virilização ou quando for encontrado um marcador cromossômico de origem indeterminada. A presença de material do cromossomo Y em pacientes com a ST pode ser investigada citogeneticamente, contudo, abordagens moleculares, como PCR e FISH, especialmente a combinação destas duas técnicas, tornaram-se imprescindíveis. A sensibilidade da técnica aplicada na identificação de mosaicismo oculto em pacientes com a ST é fator extremamente importante (15,58). Apesar da técnica de PCR ser a mais utilizada, a investigação por FISH com sonda para o cromossomo Y permite análises mais acuradas, evidenciando a possibilidade de alterações cromossômicas ou a presença de um segundo cromossomo sexuais, ou parte deste, nas células destas pacientes.

Em estudo, incluindo 18 pacientes, utilizando PCR e detecção por gel de agarose e Southern blot, duas seqüências Y-específicas (*SRY* e *DYZ3*) foram encontradas. Duas pacientes (11,1%) tinham a seqüência *SRY* nas análises por gel de agarose e 06 (33,3%) quando a detecção dos produtos de PCR foi feita pela técnica de Southern blot. Todas as pacientes tiveram resultados negativos para a seqüência *DYZ3* (58). Outro estudo, avaliando fragmentos do cromossomo Y em 40 pacientes, detectou mosaicismo oculto em 06 pacientes (15%) pela técnica de PCR e gel de agarose e em apenas uma paciente quando as amostras foram analisadas por Southern blot (54). As seqüências Y-



específicas, *SRY*, *DYZ1*, *DYZ3* e *PABY* foram investigadas por FISH, em 14 pacientes inglesas, detectando-se a presença da seqüência *DYZ3* em 100% destas. A seqüência *SRY* foi detectada em 13 (93%) e a *PABY* em apenas 02 (14%). Nenhuma das pacientes apresentou a seqüência *DYZ1* (59). Hanson *et al* (2002) analisaram, também pela técnica de FISH, as seqüências *SRY*, *DYZ3* e *DYZ1* em linfócitos e mucosa oral de 20 pacientes suecas com ST e em 5 delas (25%) foram detectadas as três seqüências analisadas, 06 (50%) foram positivas para as seqüências *SRY* e *DYZ3*, mas tiveram resultado negativo para *DYZ1*, 11 (92%) foram positivas apenas para *SRY* e uma paciente apresentou resultado positivo apenas para a seqüência *DYZ3*, em ambos os tecidos analisados (13).

Em estudo incluindo 107 portadoras da ST mexicanas, os fragmentos *SRY*, *ZFY* e *PABY* foram investigados pela combinação das técnicas PCR e FISH. Foram identificadas 10 pacientes (9,3%) com resultados positivo pelo menos uma destas seqüências (33). Um estudo incluindo 50 pacientes inglesas, utilizando também a combinação das técnicas PCR e FISH para investigar oito seqüências Y-específicas, e detectaram seis das oito seqüências investigadas em duas pacientes (34). A técnica de FISH, neste caso, foi usada para confirmar os casos positivos detectados por PCR. Robinson *et al*, (1999), avaliaram 14 pacientes com ST, também através da combinação das técnicas de PCR e FISH. O uso de 12 sondas específicas para análise estrutural de anormalidades no cromossomo Y nestas pacientes, através da técnica de FISH, mostrou positividade para pelo menos uma das sondas. Logo pode-se inferir que tanto a PCR como FISH possuem uma boa sensibilidade na detecção de fragmentos Y-específicos na ST.

### ***Considerações Finais***

A investigação de seqüências Y-específicas em pacientes com a Síndrome de Turner tem hoje um papel fundamental na abordagem terapêutica mais adequada para uma melhor compreensão da relação entre os genes do cromossomo Y e o desenvolvimento de tumores gonadais. Testes moleculares possuem um alto nível de aplicabilidade e benefícios no prognóstico, prevenção e intervenções precoces no tratamento. Investigação de seqüências do cromossomo Y por meio da técnica de PCR tem sido recomendada para todas as pacientes com ST. A detecção do cromossomo Y íntegro, ou parte deste, por meio de técnicas de biologia molecular tem sido indicada para nortear o prognóstico do gonadoblastoma e a indicação de gonadectomia profilática. Até o momento, nenhum trabalho usando PCR para investigar a presença de fragmentos deste cromossomo em pacientes de Mato Grosso com a ST havia sido realizado. O presente estudo reforça a assertiva de que a investigação de material do cromossomo Y é importante para as pacientes com a ST. Todavia, ainda há grande diferença na freqüência de seqüências cromossomo Y-específicas nos mais variados estudos, de acordo com o número de paciente, diferentes populações, técnicas utilizadas e tecidos analisados. O baixo número de indivíduos com diagnóstico de ST, e quase que ausência de investigação de seqüências do cromossomo Y no estado de Mato Grosso, indica a necessidade de implantação de um serviço de referência multidisciplinar para o atendimento destas pacientes. Este trabalho abre caminho e estimula a introdução da biologia molecular na caracterização das seqüências Y-específicas em pacientes com ST.

## **Conclusões**

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- A maior frequência cariotípica encontrada neste estudo foi a monossomia do cromossomo X (45,X), seguida de cariótipos em mosaico.
- A técnica de citogenética clássica, cariótipo com bandas, não identificou nenhuma sequência Y-específicas nas pacientes avaliadas no presente estudo.
- Dos seis marcadores cromossomo Y-específicos investigados, as seqüências *DYZ3* e *ZFY* foram detectadas nas pacientes ST11 e ST39, respectivamente.
- Reação em Cadeia da Polimerase é mais eficaz na detecção de fragmentos em pacientes com ST do que a técnica de citogenética clássica.

1. Domenice S, Costa MFE, Corrêa RV, Mendonça BB. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual. *Arq Bras Endocrinol.* 2002;46:433-43.
2. Damiani D, Setian N, Kuperman H, Manna TD. Genitália Ambígua: Diagnóstico Diferencial e Conduta. *Arq Bras Endocrinol.* 2001;45:37-47.
3. Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WN, Forrest H, Roy JR, Stewart JS, *et al.* Chromosomal sex in the syndrome of testicular feminization. *Lancet.* 1959;2:591-2.
4. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature.* 1991;351:117-21.
5. Santoro N. Mechanism of premature ovarian failure. *Ann Endocrinol.* 2003;64:87-92.
6. Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. Menino ou menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo. São Paulo: Editora Manole Ltda; 2002. p.123-99.
7. Hiort O, Holterhus PM. The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol.* 2000;142:101-10.
8. Wachtel SS, Koo S, Boyse EA. Evolutionary conservation of H-Y antigen. *Nature.* 1975; 2:254-70.

9. Damiani D, Setian N, Kuperman H, Manna TD. O enigma da determinação gonadal: O que existe além do cromossomo Y? *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000;44:248-56.
10. Tagliarini EB, Assumpção MR, Scolfaro MR, Mello MP, Maciel-Guerra ATG, Guerra J, *et al.* Mutations in SRY and WT1 genes required for gonadal development are not responsible for XY partial gonadal dysgenesis. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:17-25.
11. Bashamboo A, Bhatnagar S, Kaur A, Sarhadi JRS, Ali S. Molecular Characterization of a Y-derived marker chromosome and identification of indels in the DYS1 region in a patient with stigmata of Turner Syndrome. *Science.* 2003;84:219-25.
12. Mendes JRT, Strufaldi MWL, Delcelo R, Moisés RCMS, Vieira JG, Galera MF, *et al.* Verreschi IT. Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism. *Clin Endocrinol.* 1999;50:19-26.
13. Hanson L, Bryman I, Janson PO, Jakobsen AM, Hanson C. Fluorescence in situ hybridization analysis and ovarian histology of women with Turner syndrome presenting with Y-chromosomal material: a correlation between oral epithelial cells, lymphocytes and ovarian tissue. *Hereditas.* 2002;137:1-6.
14. Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology.* 1938;23:566-74.

15. Bianco B, Lipay MVN, Melaragno MI, Guedes AD, Verrechi ITN. Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006;19:1113-7.
16. Kim JW, Cho EH, Kim YM, Kim JM, Han JY, Park SY. Detection of cryptic Y chromosome mosaicism by coamplification PCR with archived cytogenetic slides of suspected Turner syndrome. *Exp Mol Med.* 2000;32:38-41.
17. Elsheikh M, Conway GS, Wass JA. H. Medical problems in adult women with Turner's syndrome. *Ann Med.* 1999;31:99-105.
18. Hall JG. Detection of Y-specific sequences in patients with Turner syndrome. *Am J Med Genet.* 2002;1:114-7.
19. Gicquel C, Gaston V, Cabrol S, Lê Bouc, Y. Assessment of Turner's Syndrome by Molecular Analysis of the X Chromosome in Growth-Retarded Girls. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1472-6.
20. Frias JL, Davenport ML. Committee on genetics, section on Endocrinology. Health supervision for children with Turner syndrome. *Pediatrics.* 2003;111:692-702.
21. Lipay MVN, Bianco B, Ieda TNV. Disgenesias Gonadais e Tumores: Aspectos Genéticos e Clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005;49:60-7.

22. Zinn AR, Page DC, Fisher EM. Turner syndrome: The case of the missing sex chromosome. *Trends Genet.* 1993;9:90-3.
23. Lippe B. Turner Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996;75:1289-92.
24. Stratakis CA, Rennert OM. Turner syndrome: molecular and cytogenetics, dysmorphology, endocrine, and other clinical manifestations and their management. *The Endocrinologist.* 1994;4:442-53.
25. Beiguelman B. *Citogenética Humana.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. p. 301-328.
26. Held KR, Kerber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, Seemanova E, *et al.* Mosaicism in 45,X Turner syndrome: Does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet.* 1992;3:288-94.
27. Hook EB, Warburton D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet.* 1983;1:24-7.
28. Hassold T, Beham F, Leppert M. Cytogenetic and molecular analysis of sexchromosome monosomy. *Am J Hum Genet.* 1988;42:534-41.
29. Carothers AD, Frackiewicz A, De Mey R, Collyer S, Polani PE, Osztovcics M, *et al.* A collaborative study of the aetiology of Turner syndrome. *Ann Hum Genet.* 1980;43:355-68.

30. Ferguson-Smith MA, Yates JR. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative European study on 52 965 amniocenteses. *Prenat Diagn.* 1984;4:5-44.
31. Yorifuji T, Muroi J, Mamada M, Uematsu A, Kawai M, Momoi T, *et al.* Analysis of the SRY gene in Turner syndrome patients with Y chromosomal material. *J Med Genet.* 2001; 11:38-41.
32. Fisher EM, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Lawrence JB, *et al.* Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell.* 1990;63:1205-18.
33. Canto P, Chesnaye E, López M, Cervantes A, Chávez B, Vilchis F, *et al.* A mutation in the 5' non-high mobility group box region of the SRY gene in patients with Turner syndrome and Y mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:1908-11.
34. Quilter CR, Taylor K, Conway GS, Nathwani N, Delhanty JD. Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome. *Ann Hum Genet.* 1998;45:99-106.
35. Nishi MY, Domenice S, Medeiros MA, Mendonça BB, Billerbeck AEC. Detection of Y-specific sequences in 122 patients with Turner Syndrome: Nested PCR is not a reliable Method. *Am J Med Genet.* 2002;107:299-305.



36. Lobaccaro JM, Medlej R, Berta P, Belon C, Galifer RB, Guthmann JP, *et al.* PCR analysis and sequencing of the SRY sex determining gene in four patients with bilateral congenital anorchia. *Clin Endocrinol.* 1993; 38:197-201.
37. Osipova GR, Karmanov ME, Kozlova SI, Evgrafov OV. PCR detection of Y-specific sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome: Clinical implications and limitations. *Am J Med Genet.* 1998;76:283-7.
38. Chu CE., Connor JM. Molecular Biology of Turner's Syndrome. *Arch Dis Child.* 1995; 72:285-6.
39. Fernandez-Garcia R, Garcia-Doval S, Costoya S, Pasaro E. Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of 'hidden' mosaicism. *Clin Genet.* 2000;3:201-8.
40. Chu CE. Y-chromosome mosaicism in girls with Turner's syndrome. *Clin Endocrinol.* 1999;50:17-8.
41. Vlask I, Plochl E, Kronberger G, Bergendi E, Rittinger O, Hagemn K S, *et al.* Screening of patients with Turner syndrome for "hidden" Y-mosaicism. *Klin Padiatr.* 1999; 211:30-4.
42. Moorhead PS, Nowell PC, Mellmann WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome Preparations of leukocytes cultered from peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960;20:616-8.

43. Sanches O, Escobar JI, Yunis JJ. A simple G banding technique. *Lancet*.1973; 2:269-74.
44. Lahiri DK, Nurnberg JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nuc Acids Res*.1991;19:44-54.
45. Junqueira, E.A.O. Síndrome de Turner: Aspectos Clínico-epidemiológico em usuárias do Sistema Único de Saúde do Estado de Mato Grosso [Dissertação de mestrado].Mato Grosso: Universidade Federal de Mato Grosso; 2005.
46. Semerci CN, Satioglu-Tufan NL,Turan S, Bereket A,Yilmaz TBE, Kayserili H, *et al*. Detection of Y Chromosomal Material in Patients with a 45,X Karyotype by PCR Method. *Tohoku J Exp Med*. 2007;211:243-9.
47. Medlej R, Lobaccaro JM, Berta P, Belon C, Leheup B, Toublanc JE, *et al*. Screening for Y-derived Sex Determining Gene SRY in 40 Patients with Turner Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75:1289-91.
48. Mancilla EE, Poggi H, Repetto G, Rumié H, García H, Ugarte F, *et al*. Y Chromosome Sequences in Turner's Syndrome: Association with Virilization and Gonadoblastoma. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2003;16:1157-63.
49. Alvarez-Nava F, Soto M, Sanchez MA, Fernandes E, Lanes R. Molecular Analysis in Turner Syndrome. *J Pediatric*. 2003;89:336-9.

50. Lopez M, Canto P, Aguinaga M, Torres L, Cervantes A, Alfaro G, *et al.* Frequency of Y chromosomal material in Mexicans patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet.* 1998;76:120-4.
51. Mazzanti L, Cicognani A, Baldazzi L, Bergamaschi R, Scarano E, Strocchi S, *et al.* Gonadoblastoma in Turner syndrome and Y-chromosome derived material. *Am J Med Genet* 2005;135:150-4.
52. Canto P, Kolfman-Alfaro S, Jiménez AL, Soderlund D, Barron C, Reyes E, *et al.* Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X Karyotype and Y chromosome sequences. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;150:70-2.
53. Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, Müller J. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner Syndrome and Y Chromosome Material: A population Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3199-202.
54. Larsen T, Gravholt CH, Tillebeck A, Larsen H, Jensen MB, Nielsen J, *et al.* Parental origin of the X chromosome mosaicism and screening for "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clin Genet.* 1995;48:6-11.
55. Coto E, Total JF, Menendez MJ, Hernando I, Plasencia A, Benavides A, *et al.* PCR-based study of the presence of Y-chromosome sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet.* 1995; 57:393-6.
56. Nazarenko SA, Timoshevsky VA, Sukhanova NN. High frequency of tissue specific mosaicism in Turner syndrome patients. *Clin Genet* .1999;56:59-65.

57. Binder G, Koch A, Wajs E, Ranke MN. Nested Polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's Syndrome: Is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:3532-6.
58. Kocova M, Siegel SF, Wenger SL, Lee PA, Trucco M. Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet.* 1993;42:140-3.
59. Robinson DO, Dalton P, Jacobs PA, Mosse K, Power MM, Skuse DH, *et al.* A molecular and Fish analysis of structurally abnormal Y chromosomes in patients with Turner syndrome. *J Med Genet.* 1999;36:279-84.
60. Ali S, Hasnain SE. Molecular dissection of the human y chromosome. *Gene.* 2002; 283:1-10.



## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE SEQÜÊNCIAS DO CROMOSSOMO Y EM PACIENTES BRASILEIRAS COM SÍNDROME DE TURNER

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Ficha nº \_\_\_\_\_

### IDENTIFICAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Natural de: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Mãe: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Pai: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

Encaminhado por: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Queixa principal e duração: \_\_\_\_\_

História da Moléstia atual:

---



---



---



---



---

Interrogatório sobre outros aparelhos:

---



---



---



---

Antecedentes Patológicos:

---



---



---



---

Dados sobre a Gestação e Parto:

\_\_\_\_\_ G; \_\_\_\_\_ P; \_\_\_\_\_ A.

Gestação	1	2	3	4	5	6	7	8
Condição								
Parto								
Sexo								
Peso								
Estatura								
Idade								

Pré-Natal (consultas; exames; medicamentos):

---



---



---



---

Parto: \_\_\_\_\_ Apresentação: \_\_\_\_\_ Idade Gestacional: \_\_\_\_\_

PN: \_\_\_\_\_ Est.: \_\_\_\_\_ PC: \_\_\_\_\_ Apgar: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Intercorrências Neonatais:

---



---



---



---

Alta com: \_\_\_\_\_ dias

Desenvolvimento Neuro-Psico-Motor:

Riso social: \_\_\_\_\_ Sustentou cabeça: \_\_\_\_\_ Sentou com apoio: \_\_\_\_\_

Sentou sem apoio: \_\_\_\_\_ Engatinhou: \_\_\_\_\_ Andou: \_\_\_\_\_

1<sup>as</sup> palavras: \_\_\_\_\_ Fala fluente: \_\_\_\_\_

DPM atual e escolaridade \_\_\_\_\_

---



---

História familiar

Antecedentes Patológicos:

---



---



---

Consangüinidade:           (    )Sim                           (    )Não

Heredograma:

Exames complementares já realizados:

---



---



---

### EXAME FÍSICO

#### Exame Físico Geral:

FC: \_\_\_\_\_ FR: \_\_\_\_\_ T: \_\_\_\_\_ PA: \_\_\_\_\_

---



---



---

#### Exame Físico Morfológico:

	Medida	%		Medida	%
<b>Peso</b>			<b>Estatura</b>		
<b>PC</b>			<b>SS</b>		
<b>SI</b>			<b>SS/SI</b>		


Descrição do Fenótipo:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Hipótese Diagnóstica:

---

---

Conduta:

---

---

---

---

---

Retornar em: \_\_\_\_\_









# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)