

MYLENE NEVES ROCHA

**APLICABILIDADE DA PCR EM TEMPO REAL
NA TRIAGEM DA SÍNDROME DE TURNER**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências da Saúde

São Paulo

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MYLENE NEVES ROCHA

APLICABILIDADE DA PCR EM TEMPO REAL NA TRIAGEM DA SÍNDROME DE TURNER

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Longui

Coorientador: Prof. Dr. Murilo Rezende Melo

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Rocha, Mylene Neves

Aplicabilidade da PCR em tempo real na triagem da síndrome de Turner./ Mylene Neves Rocha. São Paulo, 2009.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de pós-graduação em Ciências de Saúde.

Área de Concentração: Ciências Saúde

Orientador: Carlos Alberto Longui

Coorientador: Murilo Rezende Melo

1. Reação em cadeia da polimerase 2. Síndrome de Turner 3. Técnicas de diagnóstico molecular 4. Triagem neonatal 5. DNA/análise 6. Programas de rastreamento

BC-FCMSCSP/22-09

DEDICATÓRIA

À minha mãe, uma mulher forte e corajosa
a quem devo tudo, inclusive a vida.
À minha avó (mãe velha).

AGRADECIMENTOS

A Deus

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Carlos Alberto Longui*, meu orientador, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela paciência.

Ao *Prof. Dr. Osmar Monte*, Professor Adjunto do Departamento de Ciências Fisiológicas e Vice Diretor do Curso de Medicina da FCMSCSP, que me acolheu em seu departamento, por seu apoio constante ao meu crescimento profissional.

À *Prof^a. Dra. Cristiane Kochi*, Professora Assistente do Departamento de Ciências Fisiológicas da FCMSCSP e Médica Assistente do Departamento de Endocrinologia Pediátrica da ISCMSP, pela incessante ajuda durante todo o trabalho, pelo constante exemplo de dedicação e profissionalismo e pelo apoio nos momentos difíceis.

À *Dra. Claudia Dutra Costantin Faria*, Médica Assistente do Departamento de Endocrinologia Pediátrica da ISCMSP, pelo auxílio na coleta e organização das amostras e por sua amizade.

À *Carla Sant'Anna Corrêa*, estagiária do Laboratório de Medicina Molecular pela imensa colaboração na realização deste trabalho.

À *Flávio Richeti*, biólogo e biotécnico do Laboratório de Medicina Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da FCMSCSP, por seu apoio no laboratório e pela amizade.

Ao *Prof. Dr. Murilo Rezende Melo*, Professor Assistente do Departamento de Ciências Fisiológicas da FCMSCSP.

Aos Professores da Banca do Exame de Qualificação, *Profa. Dra. Soraia Domenice*, *Profa. Dra. Elaine Maria Costa Frade* e *Prof. Dr. Francisco Paulo Martins Rodrigues*, pelas sugestões e críticas de relevada importância.

À *Profª Ting Hui Ching*, assessora estatística da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelo auxílio na realização das avaliações de sensibilidade e especificidade do estudo.

Às equipes da Biblioteca Central, da Pós-Graduação e do NAP, pelo apoio e orientações finais.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), à Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e à Fundação Arnaldo Vieira de Carvalho, pela oportunidade de poder realizar este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro concedido a este trabalho (processo nº 07/54224-6).

Expresso ainda o meu agradecimento sincero a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ST	Síndrome de Turner
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Xp	Braço curto do cromossomo X
Xq	Braço longo do cromossomo X
OMIM	Herança mendeliana humana disponível <i>on-line</i> (<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>)
PAR1	Região pseudo-autossômica principal ou 1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Kb	quilobases
SHOX	Gene homeobox relacionado à baixa estatura (<i>Short stature Homeobox – containing gene</i>)
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
HUMARA	Locus do Receptor androgênico humano (<i>Human Androgen Receptor locus</i>)
HpaII	Enzima de restrição <i>Haemophilus parainfluenzae</i>
QF – PCR	Reação em cadeia da polimerase por fluorescência
STR	Repetições curtas em blocos (<i>Short tandem repeats</i>)
SRY	Região determinante do sexo do cromossomo Y (<i>Sex – Determining Region of Y chromosome</i>)
TPSY	Proteína testicular específica do cromossomo Y (<i>Testis Specific Protein Y</i>)
DAX-1	Gene 1 da região crítica DSS - Hipoplasia adrenal congênita do cromossomo X (<i>Dosage sensitive sex reversal Adrenal insufficiency, X chromosome, gene 1</i>)
SNP	Polimorfismo de base única (<i>single nucleotide polymorphism</i>)

ΔRn	Diferença entre intensidade luminosa do receptor e emissor, antes e depois de uma fase de extensão da PCR
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Ct	Ciclo limite (<i>Cycle threshold</i>)
Tm	Temperatura de dissociação (<i>melting point</i>)
bp	Pares de bases
rpm	Rotações por minuto
<i>ARSE</i>	Gene da Arilsulfatase E
<i>ARSEP</i>	Pseudogene da Arilsulfatase E
<i>GAPDH</i>	Gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
FAM	6-carboxi-fluoresceína (<i>6-carboxyfluorescein</i>)
TAMRA	6-carboxi-tetrametilrodamina (<i>6-carboxytetramethylrhodamine</i>)
VIC	6-carboxi-rodamina (<i>6-carboxyrhodamine</i>)
ROC	Característica de operação do receptor (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
DP	Desvio padrão
CV	Coeficiente de variação
BE	Baixa estatura
TH	Estatura-alvo (<i>target-height</i>)
ZEst	Escore Z de estatura
ID	Número de identificação do paciente
IC	Idade cronológica
<i>ARSE:GAPDH</i>	Resultado do teste molecular obtido por meio da relação dos genes <i>ARSE:GAPDH</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1.1. A Síndrome de Turner	3
1.1.2. Bases Genéticas da Síndrome de Turner	7
1.1.3. Métodos Diagnósticos da Síndrome de Turner	8
1.1.4. Detecção da Síndrome de Turner por Técnicas Moleculares	11
1.1.5. Técnica de Diagnóstico Seleccionada para o Presente Estudo	16
1.1.6. Genes Seleccionados para o Presente Estudo	17
2. OBJETIVO	19
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
3.1. Extração do DNA a partir de Papel-filtro	21
3.2. Extração de DNA a partir de Leucócitos de Sangue Periférico para preparo da curva-padrão	22
3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real	23
3.4. Escolha dos Oligonucleotídeos para PCR em Tempo Real	26
3.5. Preparo da Reação (PCR)	28
3.6. Validação de Curva-padrão	29
3.7. Precisão Intraensaio e Interensaio	31
3.8. Investigação da Presença do Cromossomo Y	32
3.9. Análise Estatística	34
4. RESULTADOS	35
4.1 - Grupo Controle	35
4.2 - Grupo ST 45,X	35
4.3 - Grupo ST com outros cariótipos	36

4.4 - Sensibilidade e Especificidade	40
4.5 - Estigmas Encontrados nas Meninas com Síndrome de Turner	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	48
7. ANEXOS	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
FONTES CONSULTADAS	71
RESUMO	72
ABSTRACT	73
APÊNDICE	74

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Turner (ST) é uma das anormalidades cromossômicas mais comuns, presente em 3% das concepções. Cerca de 99% dos fetos acometidos são abortados espontaneamente, principalmente nos três primeiros meses de gestação. Com uma incidência de 1:2500 a 1:5000 meninas nascidas, a ST é caracterizada citogeneticamente pela presença de um cromossomo X íntegro e perda total ou parcial do segundo cromossomo sexual, o que a difere em relação ao esperado para o genótipo feminino (46, XX) ou genótipo masculino (46, XY) (Lippe, 1991; Gravholt et al, 1996; Stratakis & Rennert, 2005). Tal característica permite a detecção molecular da ST, em virtude da ausência do segundo cromossomo sexual.

Com o advento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, tornou-se possível o desenvolvimento de experimentos capazes de quantificar ácidos nucleicos com especificidade e eficiência (Higuchi, 1993; Ginzinger, 2002). Estas características permitem a utilização de pequenas quantidades de DNA, como as obtidas em amostras de sangue periférico, armazenadas em papéis-filtro, tradicionalmente utilizados nos programas de triagem neonatal (Halsall et al, 2008).

O diagnóstico precoce das doenças é uma importante ferramenta envolvida na eficiência terapêutica, oferecendo ainda a possibilidade de direcionar a investigação para outras anormalidades associadas, mesmo quando nenhum sintoma específico esteja manifesto.

A ST tem alta frequência na população e apresenta como uma das principais alterações fenotípicas, a baixa estatura (Ranke et al, 2007). O diagnóstico clínico é

frequentemente tardio, o que impede medidas preventivas e de tratamento precoce (Sävendhl & Davenport, 2000; Conway, 2004).

Estas características fazem com que um exame de triagem neonatal seja de grande utilidade possibilitando o tratamento adequado da baixa estatura, no início da desaceleração do crescimento, o que secundariamente permite a indução puberal na idade adequada. Com a identificação precoce da síndrome, é possível ainda investigar anormalidades associadas a esta, bem como fornecer às pacientes um acompanhamento multidisciplinar capaz de proporcionar melhor qualidade de vida.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 A Síndrome de Turner

A ST foi descrita pela primeira vez em 1768, pelo anatomista Giovanni Morgagni, que relatou os achados *postmortem* de uma mulher com baixa estatura, a qual apresentava ainda malformação renal e disgenesia gonadal (citado por Elsheik, 2002). O nome da síndrome foi atribuído em homenagem ao endocrinologista americano Henry Hubert Turner, de Oklahoma, que em 1938 publicou artigo na revista *Endocrinology*, intitulado: *A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus*, no qual relatou os casos de sete pacientes, sendo seis adolescentes e um adulto, com características clínicas da síndrome (citado por Schaefer & Riley, 2004). Em seu trabalho, Turner enfatizou a presença da disgenesia gonadal e foi o primeiro a iniciar o tratamento com estrógeno (citado por Elsheikh et al, 2002).

Em 1959, Ford et al, demonstraram por meio da técnica de cariótipo, que as portadoras da síndrome de Turner apresentavam um único cromossomo X íntegro (citado por Fedrizzi et al, 1993).

Entre as nascidas vivas com ST, aproximadamente 50% apresentam monossomia do cromossomo X (45,X) em células do sangue periférico (Ranke & Saenger, 2001). Porém uma parcela das pacientes pode apresentar várias outras anormalidades cromossômicas, incluindo mosaicismos, deleções do braço curto (Xp) ou do braço longo (Xq), isocromossomo do braço longo e, ainda, mosaicismos nos quais está presente o cromossomo Y ou um fragmento deste (Tab. 1). (Lippe, 1991; Álvarez-Nava et al, 2003; Stratakis & Rennert, 2005).

TABELA 1 - Alguns cariótipos encontrados na síndrome de Turner

Cariótipo	Pisa (Itália)		Middlesex (UK)		Rio de Janeiro (BR)	
	n	%	n	%	n	%
45,X	20	34,5	95	48	31	51,7
46,Xr(X)	3	5,2	19	10	-	-
46,Xi(Xq); 45,X/46,X,i(Xq)	7	12,1	36	18	6	10
45,X/46,XX; 45,X/46,XX/47XXX	17	29,3	21	11	14	23,3
45,X/46,XY	2	3,4	11	6	2	3,3
45,X/46,X,r(X)	-	-	-	-	1	1,7
45,X/46,X,ídic(Y)	3	5,2	2	1	-	-
Outras	6	10,3	12	1,5	6	10
Total	58	100	196	100	60	100

Fonte: Modificada de Guimarães et al, 2001 e Bertelloni et al, 2003.

Assim como os cariótipos, as características fenotípicas encontradas na ST também são variadas.

A ST pode apresentar sinais clínicos como: baixa estatura, disgenesia gonadal com ausência de desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, pescoço curto e largo, pele redundante na nuca, baixa implantação posterior dos cabelos, *cúbitus valgus*, tórax alargado, com aumento da distância entre os mamilos, orelhas proeminentes, de baixa implantação e com rotação incompleta, anormalidades renais e cardiovasculares, deficiência cognitiva para algumas atividades, embora a inteligência média seja considerada normal (Lippe, 1991; Fedrizzi et al, 1993). Ainda podem ocorrer: doenças tireoidianas, alopecia, alterações oftalmológicas e auditivas, hipertensão, intolerância aos hidratos de carbono, alterações gastrintestinais, alterações do sistema respiratório, osteoporose,

escoliose, diminuição dos metacarpos, anormalidades ortodônticas, entre outras. (Guimarães et al, 2001; Elsheikh et al, 2002; Sybert & McCauley, 2004; Morgan, 2007).

A baixa estatura, principal característica física da ST, está presente em 95% a 99% das pacientes acometidas (Román et al, 2002; Bertelloni et al, 2003, Guedes et al, 2008). Ranke et al (1983) elaboraram um dos primeiros estudos voltados para o entendimento do crescimento espontâneo em 150 meninas não tratadas. Eles descreveram quatro períodos, que caracterizam o crescimento na ST: (1) restrição de crescimento intrauterino; (2) período de crescimento próximo ao normal até idade óssea em torno de 2 anos; (3) desaceleração progressiva do ritmo de crescimento a partir da idade óssea de 2 a 11 anos; e (4) ausência do estirão puberal, parcialmente compensado pelo atraso na fusão das epífises. A ausência de tratamento pode determinar, na vida adulta, uma perda estatural de até 20 cm, em relação à média populacional (Gravholt, 2001; Bertelloni et al, 2003; Baldin et al, 2005; Hjerrild et al, 2008).

Outra principal característica clínica da ST é a disgenesia gonadal. A falta do segundo cromossomo sexual íntegro e a conseqüente ausência de genes necessários para a manutenção dos folículos ovarianos fazem com que as gônadas se tornem disgenéticas, ou seja, ocorrem alterações nas células germinativas e nas células responsáveis pela produção dos esteróides, permanecendo somente o estroma ovariano e o tecido conjuntivo residual. Os estudos histopatológicos demonstram que o processo natural de degeneração das células germinativas sofre uma aceleração com início precoce já a partir do terceiro mês de vida intrauterina, seguindo até os primeiros anos de vida (Cardoso & Piazza, 2000; Bertelloni et al, 2003; Lipay et al, 2005).

Entre 10% e 20% das pacientes com ST apresentam desenvolvimento puberal espontâneo, porém, 95% a 98% são inférteis (Outi, 1999). Na literatura são relatados casos de pacientes com síndrome de Turner que apresentam função ovariana dentro dos limites normais, permitindo a presença de ciclos menstruais espontâneos e raros casos de gravidez, descritos em 2% a 5% das pacientes (Pérez et al, 1999; Outi, 1999; Hreinsson et al, 2002). Pasquino et al (1997), avaliando um grupo de 522 meninas com ST relataram que 84 apresentaram desenvolvimento puberal espontâneo completo com menarca, sendo que 25 destas eram portadoras de monossomia do cromossomo X e 59 das 84 eram portadoras de mosaicismos.

Na ausência da maioria das características ou falha na identificação clínica dos sinais, o diagnóstico acaba ocorrendo tardiamente (Álamo & Rodríguez, 2001).

O número de meninas com ST diagnosticadas na época do nascimento está apenas entre 10% e 20%, devido ao fato de apresentarem poucos estigmas. Neste período de vida, os principais sinais clínicos que podem auxiliar no diagnóstico são: tamanho pequeno para a idade gestacional, linfedemas de mãos e pés, presença de pele redundante com baixa implantação dos cabelos na nuca, conhecida como “pescoço alado” e “sinal de tridente”, respectivamente (Carvalho et al, 1985; Cardoso & Piazza, 2000; Albisu, 2001; Sybert & McCauley, 2004).

Geralmente é na adolescência que a maior parcela de pacientes com ST busca auxílio médico, pela associação de baixa estatura e falta de desenvolvimento puberal. Cerca de 25% das mulheres não são diagnosticadas até atingirem a idade adulta, o que resulta uma idade média de diagnóstico de 15 anos (Sävendahl & Davenport, 2000; Conway, 2004; Stochholm et al, 2006).

Massa et al (2005), avaliando informações de um banco de dados de crianças tratadas com hormônio de crescimento na Bélgica, concluíram que, de um grupo de

242 meninas, 30% foram diagnosticadas antes da idade de um ano, 48% foram diagnosticadas na infância e 22% foram diagnosticados na adolescência; este grupo teve como idade média de diagnóstico 6,6 anos.

1.1.2 Bases Genéticas da Síndrome de Turner

Estudos realizados em pacientes portadores de deleções parciais em cromossomos sexuais permitiram caracterizar o gene denominado *SHOX* (**S**hort **s**tature **H**omeobo**X**-containing gene - OMIM 312865), considerado fundamental para o desenvolvimento da estatura normal (Rao et al, 1997; Martins et al, 2003, Jorge et al, 2008). Tal gene localiza-se, nos braços curtos dos cromossomos sexuais, na região pseudo-autossômica 1 (PAR 1), nas posições (Xp22.3 e Yp11.3). Os genes localizados na PAR 1 não são inativados no cromossomo X, definindo duas cópias funcionais. Nesta região, os cromossomos X e Y pareiam-se na prófase I masculina, realizando uma permuta (*crossing-over*) obrigatória (Rao et al, 1997; Strachan & Read, 2002).

O gene *SHOX* é um segmento de DNA com 170 kb, que durante sua expressão possui um *splicing* alternativo capaz de codificar uma proteína com 292 aminoácidos (*SHOXa*) ou uma proteína com 225 aminoácidos (*SHOXb*), que diferem na região C-terminal e são expressas em diferentes tecidos (Rao et al, 1997; Hintz, 2002). Uma sequência de 180 pares de bases codifica um resíduo de 60 aminoácidos conhecido como *homeodomain*, que tem capacidade de ligação ao DNA e ação na regulação da transcrição. Em geral, os genes *homeobox* regulam o desenvolvimento embrionário e sua ação inadequada se relaciona ao desenvolvimento de múltiplas doenças (Zaha, 1996; Rao et al, 1997; Hintz, 2002).

Duas cópias do gene *SHOX*, ativas, são fundamentais para o crescimento normal. Na ST existe a presença de somente uma cópia do cromossomo X, portanto as anormalidades esqueléticas estão diretamente ligadas à haploinsuficiência deste gene (Rao et al, 1997).

1.1.3 Métodos Diagnósticos da Síndrome de Turner

Os métodos nos dias de hoje considerados clássicos para o diagnóstico da ST incluem a técnica de cromatina oral, o cariótipo e a *FISH* (Stratakis & Rennert, 2005; Morgan, 2007).

O método de cromatina oral é baseado na identificação do corpúsculo de Barr, ou seja, uma estrutura de cromatina condensada, que representa o cromossomo X inativo (Barr & Berthram, 1949). A cromatina pode ser evidenciada em núcleo de células interfásicas, colhidas por esfregaço da mucosa oral. É um teste simples, e por esse motivo é utilizado na triagem diagnóstica de casos suspeitos (Otto et al, 1998; Valle, 2001). Como inconveniente, há o fato de a cromatina oral ser um método pouco sensível para a detecção de mosaicismos com baixa frequência de linhagem celular 45,X e de aberrações estruturais do cromossomo X. Portanto, a presença do corpúsculo de Barr não dispensa a realização do cariótipo, já que é necessário afastar a presença de mosaicismos com presença de cromossomo Y (Fedrizzi et al, 1993).

O cariótipo, considerado padrão-ouro na confirmação do diagnóstico da ST, consiste na observação morfológica e numérica dos cromossomos. Linfócitos obtidos a partir de sangue periférico ficam em cultura por 72 horas com fito-hemaglutinina (*PHA*), fazendo com que os cromossomos atinjam seu mais alto grau

de compactação na metáfase e possam ser visualizados ao microscópio. Com técnicas de coloração, como, por exemplo, o bandeamento por Giemsa, na qual todos os cromossomos podem ser individualmente identificados, pois cora-se cada par de modo característico, permitindo sua diferenciação (Nussbaum et al 2002; Siegel & Sylbert, 2005; Meng et al, 2005). O cariótipo é um exame valioso, pois permite diagnosticar diversas alterações genéticas, como, por exemplo translocações, deleções, inversões, duplicações e mosaicismos cromossômicos. Porém, é uma técnica trabalhosa, de alto custo, e que requer a experiência do citogeneticista. Requer ainda cuidados na obtenção das amostras, pois a demora entre a coleta e o início da cultura, os erros durante o processamento do material ou mesmo a quantidade insuficiente de material impedem a obtenção de metáfases suficientes para a análise. Sua principal limitação é o fato de poder ser aplicado apenas a células que possam ser induzidas à divisão *in vitro* (Bréga et al, 1998; Fröhling et al, 2002; Siegel & Sylbert, 2005).

A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (*FISH*) associa um método citogenético a uma técnica de biologia molecular, utilizando, como princípio básico, a capacidade de uma fita simples de ácido desoxirribonucléico (DNA) de parear com uma sequência complementar, formando, assim, uma fita dupla (Pinkel et al, 1986; Taucher et al, 2002). Estas sequências complementares de DNA, denominadas sondas, são marcadas com compostos fluorescentes e podem identificar segmentos específicos, distribuídos em todo o cromossomo. A análise é realizada em microscópio, por meio de geração de sinal luminoso, e colorido (Hackel & Varell-Garcia, 1997; Taucher et al, 2002; Martins et al, 2003). A técnica de *FISH* tem se mostrado uma técnica de grande importância, pois auxilia tanto no mapeamento gênico, como na identificação de alterações cromossômicas, nem sempre

identificadas pela citogenética clássica. Neste método, o cromossomo é fixado em uma lâmina, desnaturado e exposto a uma sonda específica, desenhada para hibridizar com a região de interesse na fita simples de DNA. A sonda geralmente é marcada com fluorescência, de forma que possa ser detectada ao microscópio. O DNA de estudo pode ser obtido a partir de amostras de cultura celular originária de tecido fresco, material proveniente de blocos parafinados, materiais celulares obtidos por aspiração ou fluidos corporais, tais como: líquido amniótico, urina ou escarro (Hackel & Varella-Garcia, 1997; César et al, 2002; Siegel & Sylbert, 2005). Este método permite a avaliação de anomalias cromossômicas, tanto numéricas quanto estruturais, sendo possível, também, a avaliação de células interfásicas, o que dispensa a necessidade da cultura celular (Naoum, 2001; Klumb et al, 2002; Martins et al, 2003; Chauffaille, 2003). Possui alta sensibilidade, podendo ser analisadas cerca de 100, 200, ou até 1000 células em um único experimento. A análise é realizada ao microscópio, observando-se a presença de sinal fluorescente, emitido na região de ligação da sonda específica para a alteração que se pretende estudar (Pallota et al, 2000; Naoum, 2001; Chauffaille, 2003). Como inconveniente, a *FISH* é um processo longo, dispendioso, que exige controle rigoroso da qualidade das lâminas e necessidade de um profissional especializado para realização das análises. Neste método, o tamanho do segmento a ser identificado é uma limitação, não sendo possível identificar microdeleções ou mutações de ponto (Pinkel et al, 1986; Siegel & Sybert, 2005).

1.1.4 Detecção da Síndrome de Turner por Técnicas Moleculares

A ST é uma doença importante, e ao longo dos anos, diferentes grupos apresentaram métodos moleculares, a fim de diagnosticar a síndrome.

Gicquel et al (1998) investigaram um grupo de 375 meninas com baixa estatura, utilizando a técnica de Southern blotting. A partir de leucócito de sangue periférico, foi extraído DNA, que foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. Utilizou-se uma sonda específica (M27 β) para mapear o cromossomo X na região Xcen-p11-11. Os sinais de hibridização foram quantificados por análise densitométrica e comparados com DNAs controles de mulheres normais (uma homozigota e uma heterozigota) e de um homem normal. Na presença de um único cromossomo X era observada uma única banda de intensidade reduzida. No caso de mosaicismo, o resultado era observado pela presença de duas bandas de diferentes intensidades. Inicialmente, 20 pacientes apresentaram padrão de restrição considerado anormal, sugerindo a presença da ST. Para esse grupo, foi realizado, então, cariótipo para confirmação dos resultados. Foram identificadas 18 pacientes que apresentavam algum tipo de anormalidade cromossômica, sendo 7 casos de ST 45,X, 10 casos de ST com mosaicismo e 1 caso de Trissomia do cromossomo X, o que demonstrou uma alta incidência de ST na população estudada (4,8%). O teste apresentou boa sensibilidade (94,7%), e boa especificidade (97,7%).

Longui et al, em 2002, optaram por avaliar um gene altamente polimórfico, o gene que codifica o receptor androgênico humano (*HUMARA* - OMIM 313700), localizado no braço longo do cromossomo X, região Xq11-12. O gene do receptor androgênico está localizado fora da região pseudoautosômica do cromossomo X e, portanto, apresenta-se com apenas uma cópia, nos indivíduos do sexo masculino

(XY), e duas cópias, nos indivíduos do sexo feminino (XX). A compensação de dosagem, no sexo feminino, é conseguida, pois o gene está ativo somente em um cromossomo X e inativo no outro, por meio do mecanismo de metilação do DNA. Na presença de um único cromossomo X este se encontra sempre não metilado. Foi realizada a digestão enzimática com a enzima *HpaII*, uma enzima sensível à metilação, seguida de uma reação de PCR que foi analisada por eletroforese (*PCR-RFLP*). Como resultado obteve-se a amplificação somente do segmento localizado no cromossomo metilado, tornando possível a detecção da presença do segundo cromossomo X (inativo). Foram avaliadas, neste estudo, 22 meninas portadoras da síndrome de Turner, acompanhadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, com diagnóstico confirmado pelo cariótipo. Destas, 18 pacientes apresentavam o cariótipo 45,X e 4 pacientes apresentavam o cariótipo 45,X/46,XX. Como resultado, 3 das 18 pacientes apresentaram amplificação do DNA, mesmo após digestão enzimática, sugerindo a presença da linhagem 46,XX em baixa frequência, não identificada pelo exame de cariótipo, devido talvez, ao número limitado de células avaliadas nesta técnica.

A técnica de genotipagem com PCR fluorescente (*QF-PCR*) foi utilizada por Cirigliano et al em 2004. Esse método, que se tornou uma alternativa para análise citogenética no diagnóstico de anormalidades cromossômicas, tem sido utilizado em vários centros de pesquisa na Europa, no diagnóstico pré-natal das principais anormalidades numéricas, tornando possível identificar o número de cópias dos cromossomos X, Y, 21, 18 e 13. É um método rápido (< 24 horas), eficiente, com alta sensibilidade e especificidade. O estudo, que envolveu instituições na Espanha e na Itália, fez uma comparação entre o método *QF-PCR* multiplex e a técnica de citogenética convencional, avaliando 16.746 amostras de fluido amniótico, 625

amostras de vilo coriônico, 123 amostras de sangue fetal e 506 amostras de tecidos de fetos abortados, perfazendo o total de 18.000 amostras analisadas. Para o PCR foram usados vários marcadores cromossômicos, sendo seis STR (*short tandem repeats*) direcionados aos cromossomos X e Y, seis para o cromossomo 21, cinco para o cromossomo 18 e quatro para o cromossomo 13. Também foram utilizadas sequências não-polimórficas do gene *AMXY* (*Amelogenin*) e do gene *SRY* (*Sex Determining Region in chromosome Y*), na tentativa de detectar o sexo fetal. Ao longo do estudo foram incluídos mais 6 marcadores STR para o cromossomo X. Para a reação de PCR, todos os iniciadores *sense* foram marcados com diferentes fluorocromos e a eletroforese capilar foi realizada em sequenciador de DNA automatizado (ABI 310), sendo os resultados analisados pelo *software GeneScan*. De 18.000 amostras coletadas em 17.986 casos (99,9%) foi possível extrair DNA e realizar PCR com sucesso. Para síndrome de Turner foi possível diagnosticar 55 dos 56 casos de cariótipo 45,X e, no caso de mosaicismos, 12 dos 25 casos analisados foram detectados, confirmando dados anteriores apontando a dificuldade do método nesta detecção. Do total de 800 casos de anormalidades cromossômicas, 746 foram detectados, conferindo ao teste uma sensibilidade de 93,2% e especificidade de 100%.

Em um estudo anterior, durante a tese de mestrado Rocha (2005), baseado na metodologia utilizada inicialmente por Longui et al, (2002) avaliou-se amostras de sangue armazenadas em papel filtro de 304 recém nascidos com fenótipo do sexo feminino. A coleta das amostras em papel filtro FTA, por punção de calcanhar foi realizada simultaneamente com o programa de triagem neonatal implantado de forma rotineira na Maternidade da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Após a extração de DNA, procedeu-se restrição enzimática, utilizando a

endonuclease *HpaII* (sensível à metilação), seguida da amplificação por PCR, utilizando iniciadores direcionados ao exon 1 do gene do Receptor Androgênico (RA). A integridade do DNA digerido foi avaliada pela coamplificação do gene *DAX-1* (*DSS reversal, adrenal hypoplasia congenita on the X chromosome, gene 1* - OMIM 300473). Inicialmente, 223 das 304 amostras apresentaram resultados normais, ou seja, a amplificação de bandas correspondentes aos genes *RA* e *DAX-1*, afastando a possibilidade de ST 45,X. As 81 amostras que não amplificaram o fragmento correspondente ao gene *RA* foram submetidas à repetição dos procedimentos (extração, digestão e PCR). Como resultado, em 65 das 81 amostras, o PCR foi considerado normal, e 16 das 81 mantiveram resultados suspeitos, o que exigiria a reconvocação para nova coleta. Em 15 das 16 amostras, utilizando o mesmo papel filtro da coleta inicial, foi possível realizar estudo por genotipagem (*GeneScan*). Utilizando-se a metodologia proposta por Kochi (2004), analisamos o número de repetições CAG, presentes no exon 1 do gene do receptor androgênico. O número de repetições em indivíduos normais varia entre 8 e 31, com média de 20 repetições na população caucasiana, e 90% das mulheres são heterozigotas, embora essa frequência seja influenciada pela etnia e raça. Após avaliação das 15 amostras de pacientes consideradas suspeitas, apenas 1 caso confirmou a presença de alelo único, sugerindo a presença de um único cromossomo X, ou que os dois alelos possuíam o mesmo número de repetições CAG, não sendo um resultado informativo. Nos outros 14 casos avaliados, foi possível observar diferentes tamanhos de fragmentos, o que confirma a presença de dois cromossomos X.

Em estudo coordenado por Meng, em 2005, utilizou-se a genotipagem por pirosequenciamento baseada na detecção de SNP (*single nucleotide polymorphisms*), para triagem da ST. Com o auxílio do banco de dados *dbSNP*, foi

selecionado um painel de 22 SNPs com heterozigose maior do que 25% para o cromossomo X. Para o cromossomo Y foi selecionado um painel com 8 SNPs. Foram analisadas amostras de DNA de 25 casos de ST, confirmados por cariótipo, nos quais foram realizados PCR, utilizando iniciadores marcados. O pirosequenciamento permitiu análise quantitativa, baseada na intensidade do sinal dos diferentes alelos. A combinação de pelo menos quatro marcadores foi capaz de identificar 100% dos 13 casos de mosaicismo. Foi possível, ainda, identificar todos os casos de ST 45,X, com a utilização de marcadores que demonstraram a perda de heterozigose.

Em 2007, Figueiredo et al, utilizando a técnica de genotipagem (*GeneScan*) através da análise do número de repetições CAG no exon 1 do gene do receptor androgênico, avaliaram amostras de 64 meninas com baixa estatura, sendo que o exame de cariótipo foi realizado em 30 das 64 meninas. Pela genotipagem, 9 pacientes foram classificadas como homozigotas e 21 como heterozigotas. No grupo homozigoto, 6 das 9 eram pacientes com cariótipo 45,X e 3 das 9 tinham cariótipo 46,XX. Já no grupo heterozigoto, 17 das 21 eram pacientes com cariótipo 46,XX e 4 das 21 eram pacientes com ST, apresentando algum tipo de mosaicismo. E esse teste apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 85% no diagnóstico de pacientes com ST. Na tabela 2 é possível visualizar um resumo de todos os métodos citados.

Tabela 2 - Detecção da ST por técnicas moleculares

Métodos	Amostras	Vantagens	Desvantagens
Southern Blotting Gicquel et al, 1998	375 (♀ Baixa Estatura) Sangue/DNA	Sensibilidade (94,7%) Especificidade (97,7%)	Tempo Radioativo Larga Escala (\$\$)
Pirosequenciamento Meng et al, 2005	25 (♀ST) DNA	Detecção (100% dos casos)	Marcadores (30) Equipamento específico
QF-PCR (GeneScan) Cirigliano et al, 2004	17.986 Diversos*	Sensibilidade (93,2%) Especificidade (100%) Tempo (<24 horas)	Marcadores (22) Larga escala (\$\$)
PCR-RFLP Longui et al, 2002	22 (♀ ST) Sangue/DNA	Mosaicismo (Baixa Frequência)	Sangue /Transporte
PCR-RFLP Rocha et al, 2005	304 (♀RN) Sangue em PF/DNA	PF/Transporte	PF específico
GeneScan Figueiredo et al, 2007	64 (♀ Baixa Estatura) Sangue/DNA	Sensibilidade (100%) Especificidade (85%) Tempo (<24 horas)	NÃO (mosaicos) Sangue/Transporte

Diversos* = Fluido amniótico, vilo coriônico, sangue fetal e tecido de fetos abortados;
RN = Recem nascido.

1.1.5 Técnica de Diagnóstico Seleccionada para o Presente Estudo

Aprimorada a partir dos trabalhos pioneiros sobre a cinética do PCR por Higuchi et al (1993), a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real revolucionou a quantificação de DNA e RNA, tornando esse processo rápido, preciso e com boa reprodutibilidade. A técnica de PCR em tempo real é capaz de quantificar a concentração de produto de PCR gerado durante cada ciclo da reação (Ginziger, 2002). Para isso é necessária uma metodologia capaz de detectar o acúmulo de produto de PCR através de uma plataforma de instrumentação que contenha um termociclador conectado a um sistema óptico para a excitação de fluorescência e

captura de emissão, juntamente com um software que possibilite a aquisição e análise final dos resultados (Gibson et al 1996; Novais & Pires-Alves, 2004). Maiores detalhes a respeito do funcionamento da técnica encontram-se em métodos.

1.1.6 Genes Selecionados para o Presente Estudo.

Para o presente estudo foi selecionado o gene *ARSE* (Arilsulfatase E) localizado na região pseudoautosômica do cromossomo X (Xp22.3), portanto presente em duas cópias nos indivíduos de sexo feminino (46,XX). Presente no cromossomo Y (Yq11.21) existe um gene homólogo não funcional denominado de *ARSEP* (pseudogene). Dessa forma, indivíduos do sexo masculino com cariótipo 46,XY também possuem duas cópias identificáveis (*ARSE* e *ARSEP*) (Fig. 1) (Meroni et al, 1996; Lahn & Page, 1999).

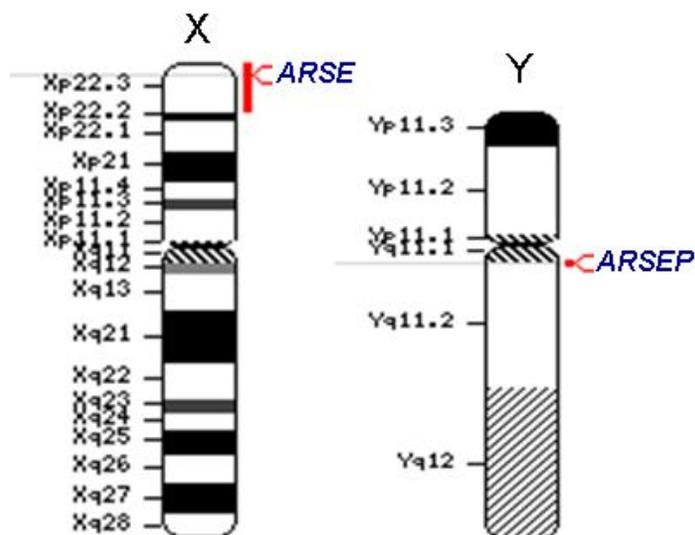


FIGURA 1 – Representação da localização do gene *ARSE* (cromossomo X) e de seu homólogo não funcionante *ARSEP* no cromossomo Y.

Como gene normalizador, foi selecionado o *GAPDH*, que se encontra localizado no braço curto do cromossomo 12 (12p13.31-p31). Este gene codifica a gliceraldeído-3-fostato desidrogenase, uma enzima que participa do metabolismo dos carboidratos, sendo expresso em múltiplos tecidos. Apresenta-se em duas cópias nos indivíduos normais, possibilitando o ajuste dos resultados para a quantidade de DNA ou RNA empregada em cada amostra (Zimmermann et al, 2002; Jhonson et al, 2004).

A característica de perda parcial ou total do segundo cromossomo sexual pode potencialmente ser utilizada no diagnóstico molecular da ST. Utilizando-se genes que apresentam duas cópias nos cromossomos sexuais, corrigidas pela quantidade do gene normalizador, também em duas cópias, é possível, após a amplificação por PCR em tempo real, identificar a quantidade de cópias do gene em estudo.

2. OBJETIVO

Desenvolver um método molecular quantitativo, baseado na PCR em tempo real, que possibilite a identificação de pacientes com síndrome de Turner a partir de amostras de sangue periférico armazenado em papel-filtro.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo conforme o parecer de número 138/2005 (Apêndice).

O grupo de estudo foi composto por 135 pessoas do sexo feminino, divididas entre pacientes e controles, provenientes do Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Departamento de Pediatria e Puericultura da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Como pacientes foram incluídas 57 meninas com diagnóstico de ST, dentre as quais 25 apresentavam cariótipo 45,X e 32 apresentavam outros cariótipos (Tab. 3). Os dados clínicos e laboratoriais individuais das pacientes estão descritos nos anexos 1, 2, 3 e 4.

O grupo controle foi composto de 78 mulheres, sendo 61 mães de pacientes, 5 avós e 12 pacientes acometidas de outras doenças endócrinas, nas quais não havia suspeita de anormalidade dos cromossomos sexuais (sendo: 3 casos de obesidade, 1 carcinoma papilífero de tireóide, 1 adenoma de tireóide, 1 hipotireoidismo, 1 hiperplasia adrenal congênita, 1 aceleração constitucional do crescimento e puberdade, 1 puberdade precoce central, 1 craniofaringeoma, 1 diabetes insipidus central e 1 caso de hipercolesterolemia familiar) (Anexo 5).

TABELA 3 – Cariótipos das pacientes com ST do presente estudo

Cariótipo	Nº de casos	%
45,X	25	44,6
45,X/46,XX	9	16,0
45,X/46,X+mar	7	12,5
45,X/46,Xi(Xq)	5	8,9
46,Xi(Xq)	3	5,4
45,X/46Xr(X)	2	3,6
45,X/46,Xi(Xp)	2	3,6
45,X/46XY	1	1,8
45,X/47,XXX	1	1,8
46,Xdel(X)(p22)	1	1,8
Total	56	100,0

3.1 Extração de DNA a partir de Papel Filtro

A coleta de sangue foi realizada por punção digital, sendo o mesmo armazenado em papel-filtro usado rotineiramente no programa nacional de triagem neonatal. A coleta foi realizada durante consulta médica ambulatorial. O papel-filtro foi encaminhado para o Laboratório de Medicina Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, onde, após secagem por cerca de 3 horas, em posição horizontal, as amostras foram armazenadas individualmente em embalagens plásticas.

No momento da extração de DNA do papel preenchido com sangue, foram retirados, por punção, quatro discos de 2mm, os quais foram transferidos para um

microtubo com capacidade de 1,7mL. Inicialmente, os discos com sangue foram lavados por incubação, a 55°C, durante 30 minutos, com 180 µL de reagente de purificação *MGM® Pureplus* (Nº Catálogo 23020100, MGM Assessoria Biológica®, Curitiba, Paraná, Brasil). Procedeu-se a uma segunda lavagem, com o tempo de incubação reduzido para 15 minutos. Em seguida, foi realizada uma série de três lavagens com água destilada *UltraPure™* (Nº catálogo 10977-015, *Gibco™ Invitrogen Corporation, Faraday Avenue, Carlsbad, CA, USA*), cada uma com incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, com o objetivo de retirada de hemácias, obtendo um sobrenadante de cor mais clara. Foi, então, adicionado ao tubo o volume de 30 µL de água destilada *UltraPure™* e incubou-se a uma temperatura de 80°C, por 20 minutos. Este sobrenadante, contendo o DNA em suspensão foi recuperado e transferido para um novo microtubo. Este procedimento está descrito detalhadamente no anexo 6.

3.2 Extração de DNA a partir de Leucócitos de Sangue Periférico para preparo de Curva-Padrão

A quantificação gênica para verificação de presença ou ausência de um segundo cromossomo sexual foi baseada em curva-padrão, construída a partir de diluições seriadas de DNA obtido a partir de amostra de sangue periférico de mulher normal (46,XX), confirmado por cariótipo. Após coleta do sangue em tubo BD Vacutainer™ com k_3 EDTA (Becton, Dickison, Juiz de Fora, MG, Brasil), a amostra foi processada pelo método para extração de DNA de Lahiri & Nurberger, 1991 - modificado por Cavalli, 1996 e Salazar, 1997 (anexo 7). Resumidamente, realizou-se uma hemólise com o uso de uma solução contendo Triton (0,27%), seguida pela lise

dos leucócitos com NaCl (400 mM) e SDS a 1%. A precipitação das proteínas foi realizada utilizando-se NaCl a 5M e a precipitação do DNA foi obtida com o uso de etanol absoluto. O produto final da extração foi ressuspensão em água *UltraPure™* para biologia molecular.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

Para a realização da PCR em tempo real, existem, atualmente diferentes sistemas disponíveis no mercado, sendo um dos mais utilizados o sistema de sonda *TaqMan®* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Esse sistema, baseado na atividade exonuclease 5' → 3' da *Taq* DNA polimerase utiliza uma sonda fluorescente não extensível. A sonda Taqman é desenhada para hibridizar com a sequência alvo, localizada entre os iniciadores (*primers*). A sonda é marcada com dois fluoróforos, um em cada uma de suas extremidades. Na extremidade 5' ocorre emissão de fluorescência (*reporter*) que enquanto a sonda está íntegra, é absorvida pela molécula presente na extremidade 3' (*quencher*). A proximidade do inibidor (*quencher*) reduz bastante a fluorescência emitida pelo emissor (*reporter*), por meio da transferência da energia fluorescente. Durante a fase de extensão da PCR, a *Taq* DNA polimerase, por sua atividade exonuclease 5' → 3', cliva a sonda, reduzindo a transferência de energia do *reporter* para o *quencher*, resultando em aumento de sinal fluorescente, o qual é captado pelo equipamento (Fig. 2) (Holland et al, 1991; Heid et al 1996; Ginzinger, 2002).

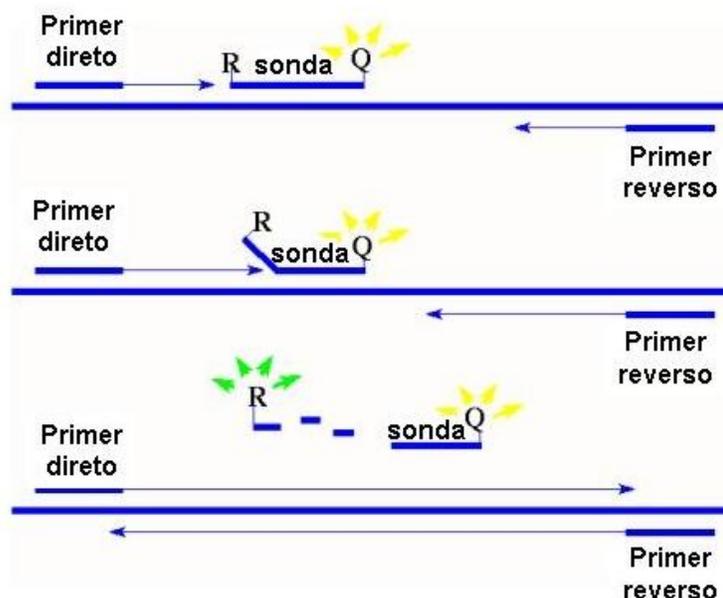


FIGURA 2 – Representação do princípio da PCR em tempo real. A sonda intacta emite apenas fluorescência basal. Com a atividade da *Taq* polimerase, a sonda é clivada e o fluorocromo emissor (R, “reporter”) afasta-se do inibidor (Q, “quencher”), que perde a capacidade de absorver sua energia, permitindo, assim, um aumento da emissão de fluorescência.

O equipamento para PCR em tempo real possui uma câmara CCD (*charged-coupled device*) que monitora continuamente a intensidade de fluorescência presente em cada um dos 96 poços. A captação de sinal ocorre durante 25 milissegundos a cada 8,5 segundos, durante a PCR. Um algoritmo computacional calcula a diferença na quantidade de emissão de fluorescência do emissor (*reporter*) com a absorção pelo inibidor (*quencher*), produzindo um valor chamado ΔR_n (R/Q). Portanto o ΔR_n reflete a quantidade de sonda hibridizada que foi clivada pela *Taq* DNA polimerase. O algoritmo calcula a média dos valores ΔR_n coletados nos três últimos ciclos de extensão, produzindo uma representação gráfica *amplification plot*, na qual, na abscissa, estão representados os números de ciclos e, na ordenada,

está representado o sinal de fluorescência (Gibson et al, 1996; Heid et al 1996, Ginzinger, 2002).

Durante os ciclos iniciais (1 a 15) da amplificação por PCR, os valores de ΔRn permanecem em linha basal (*baseline*), ou seja, o sinal é acumulado, mas fica abaixo dos limites de detecção do aparelho. A cada ciclo da reação de PCR durante o qual a *Taq* DNA polimerase sintetiza novas cadeias, sondas correspondentes serão clivadas, resultando em aumento de sinal fluorescente. Os sinais medidos durante os ciclos da PCR são utilizados para demarcar uma linha de corte (*threshold*). A linha de corte é calculada pelo programa, sendo baseada na variabilidade da emissão de fluorescência da linha basal. Isto determina uma linha de corte que corresponde a dez desvios-padrão, acima da média da emissão dos ciclos iniciais. Adicionada a linha de corte, forma-se uma intersecção com a curva de amplificação detectada acima da linha de corte, que corresponde à fase exponencial da reação de PCR. Este ponto é utilizado para definir o ciclo limite (*threshold-cycle* ou *Ct*) de uma amostra. O *Ct* é definido como o número do ciclo da PCR, no qual o sinal fluorescente torna-se significativamente maior do que a fluorescência de base (Fig. 3) (Gibson et al, 1996; Heid et al, 1996; Ginzinger et al, 2002).

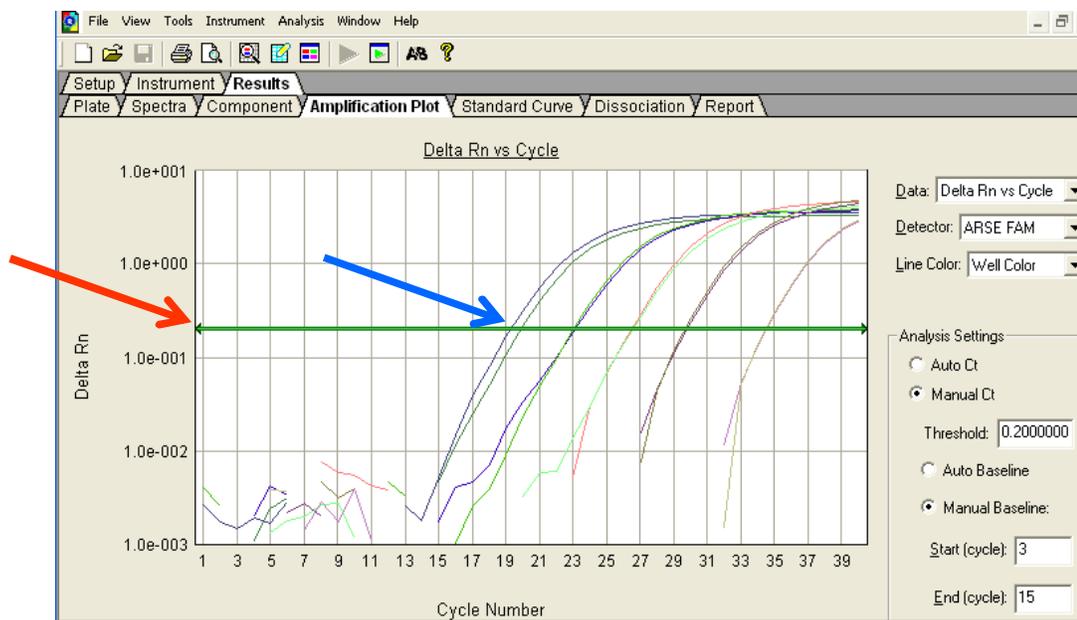


FIGURA 3 – Gráfico de amplificação de curva-padrão por PCR em tempo real. A seta vermelha indica a linha de corte, definida como dez desvios-padrão acima da fluorescência média observada nos ciclos iniciais (canto inferior direito). A seta azul indica o Ct da amostra mais concentrada, na intersecção de sua curva de amplificação com linha de corte. O Ct é expresso em relação ao ciclo da reação onde ocorre a intersecção.

3.4 Escolha dos Oligonucleotídeos para PCR em Tempo Real

O desenho dos iniciadores da reação, bem como da sonda para o gene *ARSE*, foram baseados em sequência depositada no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=300180>).

Utilizando o programa computacional *Primer Express* versão 1.5 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) foi possível localizar as sequências de iniciadores e sondas em conformidade com as recomendações do fabricante do termociclador para tempo real utilizado neste estudo (*Applied Biosystems, 2001*).

A sonda foi desenhada de modo a evitar a formação de estrutura secundária entre ela e a região alvo, bem como longas repetições de um único nucleotídeo (especialmente a guanina) ou de híbridos: sonda/iniciadores.

Os iniciadores foram escolhidos com T_m entre 58-60°C, de forma a se evitarem longas repetições de um único nucleotídeo (especialmente mais de quatro guaninas). A presença de mais de duas guaninas e/ou citosinas entre os cinco nucleotídeos na extremidade 3' dos iniciadores também foi evitada. Os iniciadores sense e antisense ficaram o mais próximo possível da sonda, e a temperatura de anelamento da reação foi estabelecida em 5°C abaixo do T_m dos iniciadores.

ARSE (sequência de orientação 5' → 3'):

- ◆ Iniciador Sense: TTGTGACGCCTGTGTTCCA
- ◆ Iniciador Antisense: GGCAGACCTTTCTTCCATAGCA
- ◆ Sonda: 6-FAMTMCCAGAGGGAGCCGGT-MGB
- ◆ Tamanho do produto: 60 pb

Em nosso estudo o gene *GAPDH* foi escolhido como normalizador. A sonda e os iniciadores foram os mesmos utilizados por Zimmermann et al, em 2002.

GAPDH (sequência de orientação 5' → 3'):

- ◆ Iniciador Sense: CCCCACACACATGCACTTACC
- ◆ Iniciador Antisense: CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT
- ◆ Sonda: VIC®AAAGAGCTAGGAAGGACAGGCAACTTGGC -TAMRA
- ◆ Tamanho do produto: 97 pb

Todos os iniciadores foram sintetizados pela *Invitrogen™ Life Technologies* (Carlsbad, CA, USA) e as sondas foram sintetizadas pela *Applied Biosystems* (Foster City, CA, USA).

3.4 Preparo da Reação (PCR)

A pipetagem dos reagentes para preparo do “mix” da PCR em tempo real (Tab. 4) foi realizada em fluxo laminar (livre de ácidos nucléicos), a fim de proteger os reagentes de contaminação de experimentos anteriores. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas. Em cada experimento foram avaliados ainda 5 pontos da curva padrão e um controle negativo (NTC = *No template control*) ao qual foi adicionada água e não DNA, servindo como controle negativo da amplificação, de forma a controlar contaminações.

TABELA 4 - Protocolo duplex *ARSE:GAPDH* para PCR em tempo real

Componente	Volume/Tubo (mL) por reação
<i>TaqMan</i> ® Universal PCR Master Mix 2X	2.5
Primer ARSE sense (30 uM)	0.2
Primer ARSE antisense (30 uM)	0.2
Sonda <i>TaqMan</i> ® ARSE(6-FAM) (25 uM)	0.2
Primer GAPDH sense (30 uM)	0.5
Primer GAPDH antisense (30 uM)	0.5
Sonda <i>TaqMan</i> ® GAPDH(VIC)(25 uM)	0.5
Água <i>Ultrapure</i> ™ livre de RNase, DNase	9.37
Total	25.0

TaqMan®, *Applied Biosystems* (Foster City, CA, USA).

Os tubos foram colocados no termociclador (*7500 Real Time PCR System, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA*), onde foi realizada uma programação dos parâmetros em programa computacional (*SDS - Sequence Detection System version 1.2, 7500 Systems SDS Software, Applied Biosystem*).

Foram utilizadas condições de termociclagem universais para amplificação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo.

O programa computacional controla a captação dos sinais luminosos por células fotoelétricas, correlacionando a fluorescência medida com o ciclo da programação da temperatura. Ao término da reação (duração de aproximadamente 150 minutos), o programa calcula o Ct de cada amostra e mostra o gráfico das reações, com representação colorida diferenciando os tubos.

Os valores de Ct das amostras são corrigidos pelos valores de Ct da curva-padrão de cada gene, permitindo assim calcular as quantidades absolutas de expressão gênica em cada amostra.

O cálculo da quantidade relativa do gene *ARSE* em relação ao gene *GAPDH* foi obtido pela relação *ARSE:GAPDH* que teoricamente, deve ser próximo de 1, em indivíduos normais e próximo de 0,5, na ST 45,X.

3.6 Validação de Curva-padrão

Foi realizada, então, uma diluição seriada do DNA com água *UltraPure™*, na proporção de 1:9, resultando nos pontos com as seguintes identificações 10^6 (DNA inicial), 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 equivalentes celulares arbitrários. Os volumes totais foram

divididos em alíquotas de 5µL e mantidos congelados a -20°C até a realização da PCR em tempo real.

Em cada experimento foram incluídas as diluições seriadas do DNA. A figura 4 mostra um exemplo da curva-padrão dos dois genes, realizado em triplicata para cada ponto. Na figura 5 é possível observar a distribuição de todos os pontos das curvas ao longo do trabalho.

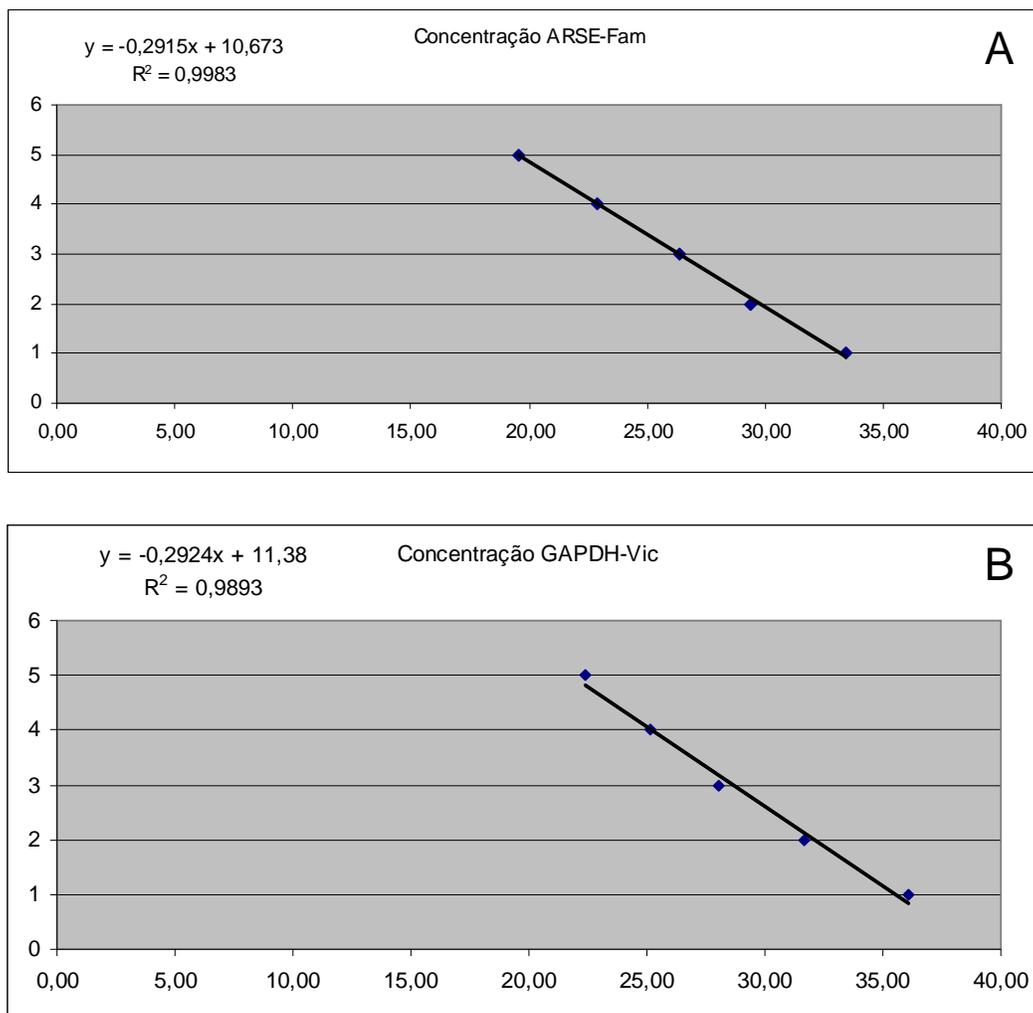


FIGURA 4 – Curvas-padrão dos genes *ARSE* (A) e *GAPDH* (B) durante experimento para validação, com as respectivas linhas de tendência e as equações de regressão linear com coeficiente de determinação.

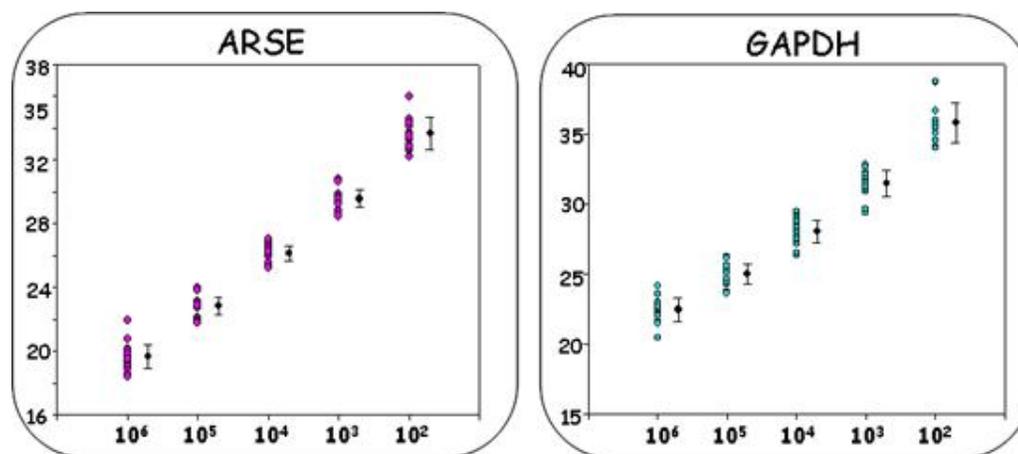


FIGURA 5 – Distribuição de todos os pontos das curvas-padrão dos genes *ARSE* e *GAPDH* das 10 placas que compuseram o trabalho, demonstrando que a distribuição se manteve constante.

3.7 Precisão Intraensaio e Interensaio

Para verificar a precisão intraensaio a mesma amostra do controle normal (46,XX) foi avaliada em dias diferentes, no primeiro dia o experimento consistiu de 12 repetições e no segundo dia de 8 repetições.

Para avaliação da variação interensaio a amostra do controle normal (46,XX) foi avaliada em ensaios realizados em 6 dias diferentes.

Para esses ensaios foram calculados: média, desvio-padrão, coeficiente de variação, erro padrão e a média do coeficiente de variação dos experimentos. Os resultados estão descritos nos anexos 8 e 9.

3.8 Investigação da Presença de Cromossomo Y.

As pacientes com síndrome de Turner que apresentavam risco de presença de cromossomo Y ou fragmento do mesmo (45,X e 45,X/46X+mar) foram investigadas através de técnica de PCR, utilizando iniciadores sintetizados pela *Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)*, direcionados aos genes *SRY* e *TSPY* (*Testis Specific Protein Y - encoded - OMIM 480100*), com as seguintes sequências:

SRY (sequência de orientação 5' → 3'):

- ◆ Sense: ACCTCGAGAATTCGTCGGTGTGAGGGCGGAGAAATGC
- ◆ Antisense: GAGCTCGAGAATTCGTAGCCAATGTTACCCGATTGTC

Tamanho do produto: 808 pb

TSPY (sequência de orientação 5' → 3'):

- ◆ Iniciador Sense: AGGGCTCGCTGACCTACC
- ◆ Iniciador Antisense: AGAAGCCAGGGACGCTCT

Tamanho do produto: 465 pb

Como gene controle foi utilizado o *GAPDH* (sequência de orientação 5' → 3'):

- ◆ Iniciador Sense: TCTCCAGAACATCATCCCTGCCTC
- ◆ Iniciador Antisense: TGGGCCATGAGGTCCACCACCCTG

Tamanho do produto: 384 pb

Para a reação de PCR, em tubos diferentes, foram adicionados às amostras de DNA 20 pmoles dos iniciadores *sense* e *antisense* de cada um dos genes, em conjunto com 200 μmoles de cada dNTP, 2,5 μL do tampão de enzima (100mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0.01 w/v gelatina) 10X, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Nº Catálogo N801-0055, *GeneAmp - PCR reagent kit with AmpliTaq DNA polymerase PERKIN ELMER, Branchburg, New Jersey, USA*). O volume final da reação foi de 30μL.

A PCR foi realizada em termociclador (*GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystem, Foster City, CA, USA*), no qual as condições de amplificação foram: desnaturação inicial do DNA a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto, finalizando-se com uma extensão a 72°C por 10 minutos. As condições foram idênticas para todos os genes.

Ao final da reação de PCR foram adicionados, a cada amostra 3 μL do tampão de corrida 10X *Blue Juice Gel Loading Buffer* (Nº Catálogo 10816015, *Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% com adição de brometo de etídeo na concentração de 0,5 mg/mL (Nº Catálogo 3011E, *Research Organics Inc. Cleveland, OH, USA*). Após uma hora o resultado da corrida eletroforética foi observado com o uso de luz ultravioleta em aparelho Mini-Transiluminador (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*), sendo a imagem digitalizada através de câmera *Kodak Digital Science (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA)*.

3.9 Análise Estatística

Os programas utilizados foram: o SPSS for Windows, versão 15.0 (Wacker Drive, Chicago, IL, USA), para cálculo de Curva ROC e gráficos de distribuição, e SigmaStat for Windows, versão 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) para as análises descritivas.

RESULTADOS

4.1 Grupo Controle

O grupo controle foi composto por 78 mulheres, sendo que foi possível obter-se informação quanto à idade em 72 delas, cuja média resultou em 36,9 anos \pm 12,7 anos, mediana de 38,0 anos (variação de 9,8 a 70,9 anos). A estatura foi disponível em 69 mulheres, sendo em média de 156,1 cm \pm 7,3 cm (variação de 139,6 a 173,2). A média do escore Z de estatura foi de -1,0 cm \pm 1,1 cm, mediana -1,1 cm (variação de -3,6 a 1,5 cm). Após a realização da PCR em tempo real encontramos os valores da relação *ARSE:GAPDH* com média de 1,05 \pm 0,20, mediana de 1,02 (variação de 0,74 a 1,56), e os seguintes percentis: p5= 0,77; p10 = 0,86; p25 = 0,89; p75 = 1,20; p90 = 1,35 e p95 = 1,37. Os dados clínicos e laboratoriais dos controles encontram-se em detalhes no anexo 5.

4.2 Grupo ST 45,X

O grupo avaliado foi composto por 25 meninas com média de idade de 16,1 anos \pm 5,4 anos, mediana de 17,6 anos (variação de 2,3 a 28 anos). A média do escore Z de estatura foi de -3,5 cm \pm 1,4 cm, mediana -3,6 cm (variação de -6,8 a 0,1 cm). Os resultados da relação *ARSE:GAPDH* foram em média 0,46 \pm 0,10, mediana de 0,45 (variação de 0,26 a 0,65) e os seguintes percentis: p5 = 0,29; p10 = 0,30; p25 = 0,38; p75 = 0,53; p90 = 0,58 e p95 = 0,62. Uma amostra foi descartada por não apresentar DNA com qualidade suficiente para o teste.

Todas as meninas desse grupo foram avaliadas quanto à presença de cromossomo Y, por PCR. Utilizando iniciadores direcionados ao gene *SRY*, 24 das 25 meninas apresentaram resultados negativos e somente uma apresentou resultado positivo para o *SRY*. Para o gene *TSPY*, 22 das 25 meninas avaliadas apresentaram resultados negativos e somente 3 das 25 apresentaram resultados positivos para este gene.

4.3 Grupo ST com outros cariótipos

Inicialmente foram analisadas 32 pacientes, com quadro clínico sugestivo de ST com outros cariótipos. Uma paciente foi retirada do estudo por apresentar cariótipo 46,XX, na repetição do exame. A idade média encontrada foi de 15,3 anos \pm 5,0 anos, mediana de 15,2 anos (variação de 4,8 a 24,2 anos). A média do escore Z de estatura foi de -3,0 cm \pm 1,3 cm, mediana de -2,9 cm (variação de -5,3 a 1,8 cm). Os resultados da relação *ARSE:GAPDH* apresentaram média de 0,66 \pm 0,20, mediana de 0,59 (variação de 0,40 e 1,14) e os seguintes percentis: p5 = 0,40; p10 = 0,43; p25 = 0,50; p75 = 0,82; p90 = 0,94 e p95 = 1,00. A avaliação de presença de cromossomo Y, por PCR direcionado à amplificação dos genes *SRY* e *TSPY*, foi realizada somente nas 7 meninas que apresentaram o cariótipo 45,X/46,X+mar. Somente 1 das 7 apresentou resultado positivo para os dois genes.

Utilizando o teste de *Mann-Whitney*, foi realizada a comparação dos resultados encontrados nos três grupos (média, desvio-padrão, mediana, p25 e p75), o resultado encontrado mostrou significância estatística ($p < 0,001$) (Fig 6).

	Controle	45,X	Outros
$\bar{X}(DP)$	1,04 (0,21)	0,46 (0,10)	0,66 (0,20)
Mediana	1,01	0,45	0,59
p25-p75	0,89-1,20	0,38-0,54	0,50-0,82

FIGURA 6 - Comparação entre os grupos pelo teste *Mann-Whitney*.

Como resultado da análise molecular para a qual foi calculada a relação *ARSE:GAPDH* é possível observar a dispersão dos resultados encontrados nos três grupos através da figura 7.

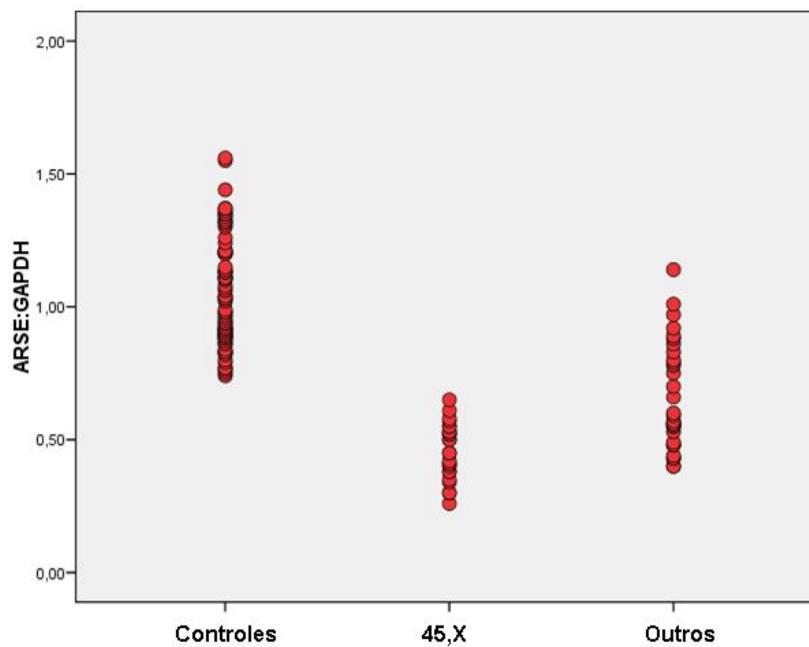


FIGURA 7 - Dispersão dos valores de *ARSE:GAPDH* para controles, pacientes com ST 45,X e pacientes que apresentam outros cariótipos.

Com o objetivo de se estabelecer um ponto de corte para os valores da relação *ARSE:GAPDH*, que permitisse diferenciar as pacientes com ST dos indivíduos normais, foi realizada análise de curva ROC. Comparando-se os valores do grupo 45,X com os do grupo controle a área sobre a curva foi de 1 com intervalo de confiança de 95%. Realizamos a análise da curva ROC utilizando, da mesma forma os valores encontrados no grupo ST com outros cariótipos com os do grupo controle, a área sobre a curva foi de 0,905 com intervalo de confiança de 95% (amplitude 0,839 a 0,971). Selecionamos o ponto de corte utilizado foi de 0,7. Nas figuras 8 e 9 é possível observar a distribuição dos grupos.

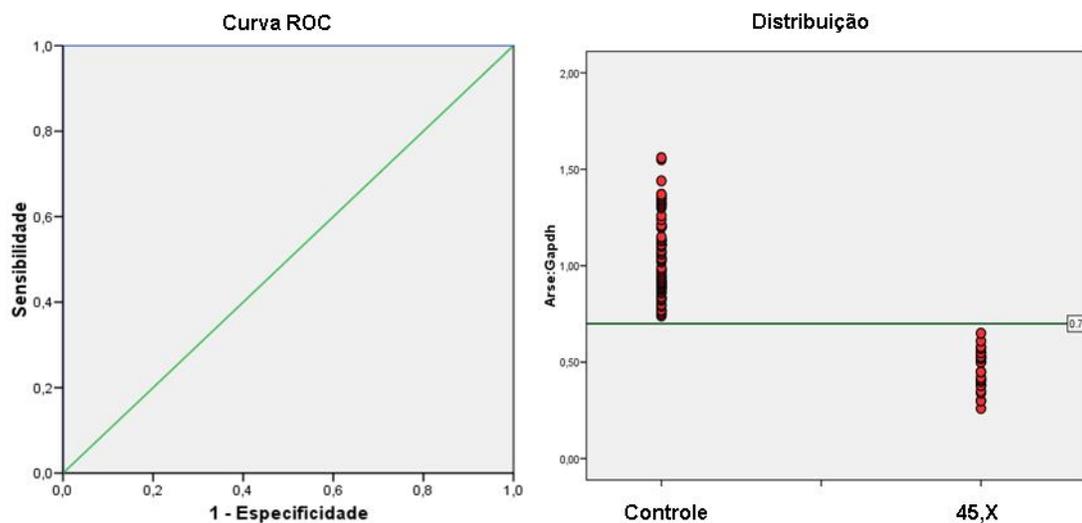


Figura 8 - À esquerda é possível observar a curva ROC para os valores de ST 45,X versus os controles. À direita é possível observar como ficam distribuídos os valores da relação *ARSE:GAPDH* para controles, e ST45,X, acima e abaixo do ponto de corte 0,7.

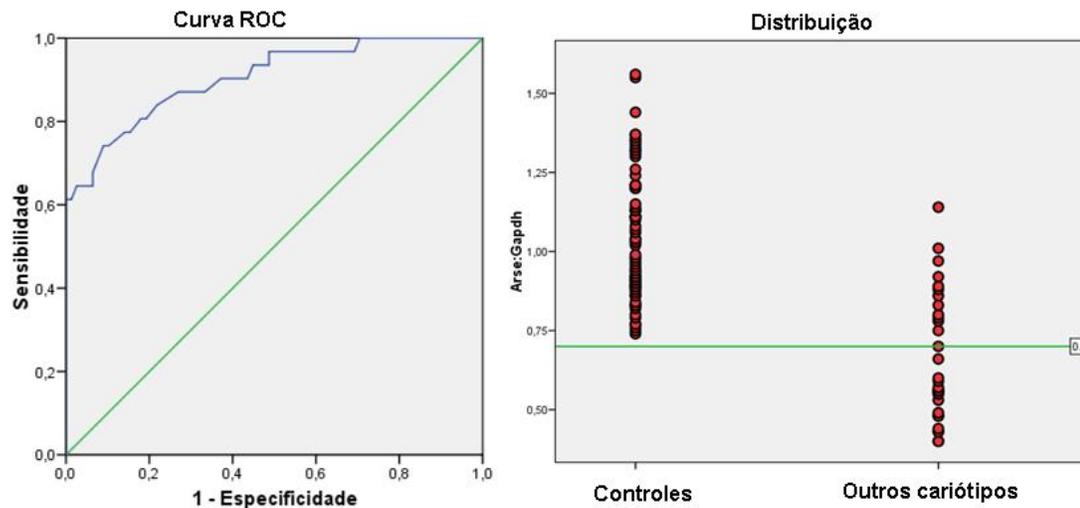


FIGURA 9 – À esquerda a curva ROC para os resultados do grupo ST com outros cariótipos versus os controles, à direita é possível observar a distribuição dos valores da relação *ARSE:GAPDH*, para controles, e mosaicos acima e abaixo do ponto de corte 0,7.

Para os dois casos de controles que apresentaram inicialmente resultados abaixo do ponto de corte, o teste foi repetido a partir da extração de DNA. Neste segundo momento, o resultado encontrado foi de acordo com o esperado para o grupo, ou seja, os valores encontrados eram $\geq 0,7$.

Das 32 meninas avaliadas, que pertenciam ao grupo mosaico, 13 delas apresentaram resultados acima do ponto de corte escolhido, com a realização da curva ROC. Nestas 13, o valor médio encontrado para a relação *ARSE:GAPDH* foi de $0,87 \pm 0,23$, mediana de 0,86 (variação de 0,70 e 1,14). (Tab. 5).

TABELA 5 - Pacientes com ST e outros cariótipos que apresentaram resultados falso-negativos

ID	Cariótipo	Frequência (%)		Metáfases Contadas	SRY	TSPY	ARSE:GAPDH
		45,X	Outros				
26	45,X/46,X+mar	50	50	10	+	+	0,83
31	45,X/46,X+mar	16	84	32	-	-	0,86
38	45,X/46,XX	25	75	20	nr	nr	0,92
42	45,X/46,XX	17	83	29	-	-	1,14
37	45,X/46,XX	7	93	30	nr	nr	0,97
36	45,X/46,XX	7	93	40	nr	nr	0,89
41	45,X/46,XX	5	95	40	nr	nr	0,80
35	45,X/46,XX	4	96	50	nr	nr	1,01
40	45,X/46,XX	2	98	50	nr	nr	0,79
53	46,Xdel(X)(p22)	0	100	25	nr	nr	0,88
55	46,Xi(Xq)	0	100	NC	nr	nr	0,75
44	45,X/46,XY	43	57	30	+	+	0,78
52	45,X/47,XXX	89	11	28	nr	nr	0,70

ID = Número de identificação do paciente; NC = não consta no prontuário; nr = não realizado PCR
 ARSE:GAPDH = Resultado do teste molecular por PCR em tempo real.

4.4 Sensibilidade e Especificidade

Quando comparadas as amostras controles com as amostras ST 45,X, foi verificado que o teste apresenta uma sensibilidade de 100% e especificidade de 100%. Com valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 100% (Tab 6).

TABELA 6 - Análise 2 X 2 para Controles e ST 45,X

Teste	Doente (+)	Controle (-)	Total
< 0,7 (Doente) (+)	25 ^(VP)	0 ^(FP)	25 ^(VP + FP)
≥ 0,7 (Normal) (-)	0 ^(FN)	78 ^(VN)	78 ^(FN + VN)
Total	25	78	103

VP = Verdadeiro positivo; FN = Falso negativo; FP = Falso Positivo; VN = Verdadeiro Negativo

Na avaliação, comparando-se o grupo controle com o grupo mosaico, o teste apresenta uma sensibilidade de 58% e especificidade de 100%. Neste caso, o valor preditivo positivo é de 100% e o valor preditivo negativo é de 86% (Tab. 7).

TABELA 7 - Análise 2 X 2 para Controles e ST Mosaicos

Teste	Doente (+)	Controle (-)	Total
< 0,7 (Doente)	18 ^(VP)	0 ^(FP)	18 ^(VP + FP)
≥ 0,7 (Normal)	13 ^(FN)	78 ^(VN)	91 ^(FN + VN)
Total	31	78	109

VP = Verdadeiro positivo; FN = Falso negativo; FP = Falso Positivo; VN = Verdadeiro Negativo

4.5 Estigmas Encontrados nas Meninas com Síndrome de Turner

Com referência aos estigmas apresentados pelas pacientes, em consulta aos prontuários foram encontradas as seguintes informações obtidas retrospectivamente (Tab. 8).

Tabela 8 – Estigmas descritos em prontuários de pacientes com ST.

Estigma	45,X (n=25)	Mosaico (n=31)
Baixa Implantação das Orelhas	13	12
Baixa Implantação do Cabelo	18	15
Cabelo em Tridente	09	10
Cúbito Valgo	19	24
Deformidade de Mandelung	0	02
Epicanto	01	03
Hipertelorismo Mamário	22	21
Nevus	06	05
Olhos Amendoados	02	01
Palato em Ogiva	22	24
Pescoço Alado*	09	03
Pescoço Curto	0	02
Pterígio Coli	09	10
Quarto ou Quinto Metacarpo curto	15	18
Rotação Incompleta do Pavilhão Auricular	02	02

Para os estigmas encontrados foi realizado o teste z de proporções, que demonstrou como única diferença significativa o aumento da frequência de pescoço alado nas pacientes 45,X, em relação ao grupo mosaico. Os dados mostrados na tabela acima sofrem a potencial limitação de não terem sido obtidos de forma sistemática prospectiva. (* P=0,031)

5. DISCUSSÃO

Com uma incidência de 1:2500 a 1:5000 meninas nascidas vivas, a ST é uma das anormalidades cromossômicas com elevada frequência, mas que ainda é de diagnóstico clínico muito tardio (Gravholt, 1996; Gicquel et al, 1998). O diagnóstico precoce da ST, porém, torna possível o tratamento adequado da baixa estatura, o que, secundariamente, permite a indução puberal na idade adequada. Possibilita, ainda, a investigação de anormalidades associadas, como as cardiopatias congênitas, malformações renais, anomalias das vias aéreas superiores e conduto auditivo, alterações autoimunes, bem como identificação de marcadores que reconheçam maior risco de tumores gonadais. Com a identificação precoce da síndrome, medidas específicas também podem ser instituídas para a prevenção da osteoporose e da obesidade, detecção precoce da resistência insulínica e do diabetes mellitus, reduzindo o risco de complicações cardiovasculares. Novos métodos de preservação da função gonadal tornam o diagnóstico precoce da ST ainda mais importante, por abrir novas perspectivas em relação à fertilidade nestas pacientes. Em conjunto, tais medidas procuram estabelecer metas para proporcionar melhor qualidade de vida para as meninas afetadas pela síndrome.

Tanto a elevada incidência da ST quanto a possibilidade de tratamento são critérios que qualificam a ST para inclusão em programas de triagem neonatal (PTN). Um PTN visa a estabelecer o diagnóstico e o início de tratamento em tempo hábil, a fim de evitar ou reduzir a morbidade e a mortalidade, melhorando a qualidade de vida do indivíduo (Souza et al, 2002; Brandalize & Czeresnia, 2004). Para isso, é necessário o desenvolvimento de um método diagnóstico com boa

sensibilidade e especificidade, custo/benefício viável e que possa ser aplicado em larga escala, possibilitando sua aplicação na identificação neonatal da doença.

Em estudo anterior, Rocha (2005), com o objetivo de diagnosticar meninas com ST, utilizou o “teste em 3 passos”, que consta de duas digestões enzimáticas consecutivas, seguidas de genotipagem. Embora com resultados satisfatórios, tal teste apresentou limitações significativas, tais como a elevada taxa de repetição de exames na amostra (27%) e tempo relativamente longo de realização do teste (30 horas). No “teste em 3 passos”, as pacientes homozigotas para o número de repetições CAG se mostraram não informativas, o que correspondeu a 6% das mulheres estudadas.

Neste estudo atual, ainda trabalhando com amostras de sangue armazenadas em papel filtro, procurou-se utilizar a técnica de PCR em tempo real quantitativa, visando maior sensibilidade e especificidade de detecção, bem como maior rapidez.

A utilização de amostras de sangue, armazenadas em papel filtro, facilita tanto o armazenamento quanto o transporte, permitindo sua implantação em programas de triagem neonatal. Após adequada padronização da extração de DNA, foi possível obter qualidade satisfatória da amostra para amplificação por PCR em tempo real. Diferente do trabalho anterior, que utilizou amostras de sangue colhido em papel filtro *FTA® GeneCard*, o papel filtro utilizado neste estudo foi do mesmo tipo utilizado tradicionalmente nos programas de triagem neonatal S&S903 (*Schleicher & Schuell* nº 903), tornando mais simples a incorporação deste método num programa de triagem neonatal ampliado.

Das 135 amostras em papel filtro, uma (0,7%) foi excluída por falha na coleta e armazenamento, valor este dentro do esperado pelas recomendações técnicas de programas oficiais de triagem neonatal (<5%) (Brasil, Ministério da Saúde, 2004).

A amplificação por PCR em tempo real é um método de rápida realização. Em aproximadamente 6 horas é possível extrair o DNA e analisar 42 pacientes em uma única placa. O custo estimado (calculado em novembro/2008) do teste para cada amostra em duplicata é de R\$ 16,30 (dezesesseis reais e trinta centavos) (anexo 8), custo este compatível com outras doenças incluídas nos programas ampliados. Portanto, acreditamos ser um valor viável, mesmo que sejam incluídos gastos com pessoal e taxas operacionais. O valor pago para testes moleculares em diagnóstico pré-natal pela tabela do SUS é cerca de R\$ 60,00 (Brasil, Ministério da Saúde, 2004).

Considerando-se que duas pacientes do grupo controle apresentaram resultados falso-positivos e que, na repetição do teste efetuado na mesma amostra, os dois resultados foram normais, acredita-se que algum fator da extração ou amplificação tenha influenciado o resultado final. Portanto, é recomendável que, frente a um teste positivo, a mesma amostra seja reavaliada antes da convocação da paciente.

Nossos dados demonstraram que, utilizando a relação *ARSE:GAPDH* com o ponto de corte de 0,7, todos os casos de ST 45,X são detectados pelo teste de triagem.

Com referência ao ponto de corte, este pode ainda ser ajustado para maior identificação de casos de ST com outros cariótipos, por exemplo, optando por um ponto de corte de 0,92, seria possível identificar 27 dos 31 casos, determinado ao teste uma sensibilidade de 87%, especificidade de 73%, o valor preditivo negativo seria então de 95% e o valor preditivo positivo de 48%. Neste caso o ponto de corte induziria a um aumento do número de casos falso positivos (29/78), o que não seria adequado para um programa de triagem populacional.

Do grupo de meninas com ST e outros cariótipos (n=32), encontramos em 13 resultados falso-negativos (Tab. 5). Em 9 das 13 (ID= 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 53 e 55), a frequência de células 46,XX encontrada no cariótipo foi elevada, em geral acima de 75%. Em outros 2 dos 13 casos (ID=44 e 26), nos quais também se encontraram resultados falso-negativos, as pacientes apresentavam cariótipo com presença de cromossomo Y, ou marcador cromossômico, nos quais detectou-se, por PCR, a presença dos genes *SRY* e *TSPY*. Nestes casos, o resultado molecular se deve ao fato de os iniciadores utilizados amplificarem segmentos presentes tanto no gene *ARSE* como no pseudogene *ARSEP*, portanto, identificando tanto a presença do cromossomo X, quanto a presença do cromossomo Y. Em outro caso adicional com resultado falso-negativo (ID=52), o cariótipo apresentou duas linhagens celulares em equilíbrio 45,X e 47,XXX, mantendo a dosagem gênica semelhante à de um indivíduo 46,XX.

Em uma das 13 pacientes deste grupo (ID = 53), a análise citogenética foi 46,Xdel(X)(p22). Tal paciente apresenta baixa estatura (escore Z de estatura = -3,48). A deleção da região terminal do braço curto do cromossomo X, identificada nesta paciente, pode ter determinado a perda do gene *SHOX*, localizado distalmente na região Xpter-p22.32. A amplificação do gene de interesse *ARSE*, de localização mais proximal na região Xp22.3, pode ter sido mantida pela manutenção da região PAR 1 (Fig. 10).

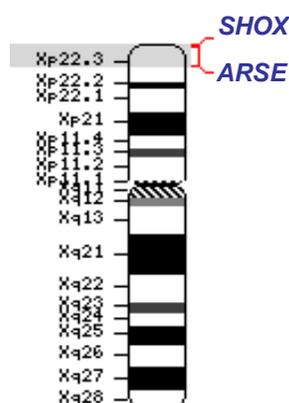


Figura 10- Localização do gene *SHOX* e *ARSE* no cromossomo X

Uma paciente (ID=31), com cariótipo 45,X/46X+mar e amplificação negativa para os genes *SRY* ou *TSPY*, apresentou resultado do teste de triagem normal, compatível com indivíduos 46,XX. Nesta paciente, apenas 16% das células eram 45,X e o restante das células possuem um marcador (provavelmente originado do cromossomo X). Este caso poderia representar a manutenção do gene *ARSE* no fragmento marcador, presente na maior parte das células.

As 13 pacientes correspondem a 9,6% do grupo total e a 23,2% do grupo de doentes avaliadas. Isto representa uma limitação, do método aqui proposto, em identificar a ST com outros cariótipos que não sejam 45,X. Tal limitação poderia ser contornada com o acréscimo de um par de iniciadores que reconheçam uma sequência não presente no cromossomo Y, mas, sim, uma sequência localizada no braço longo do cromossomo X.

Portanto, a técnica aqui apresentada foi capaz de identificar 100% dos casos de ST 45,X (25/25), 97% dos casos controles (76/78) na primeira reação e 100% dos controles, quando realizada a repetição, e 56% (18/32) dos casos de ST com outros cariótipos. Desta forma, além de apresentar boa sensibilidade e especificidade, este método de triagem mostrou-se rápido e de custo viável.

6. 6. CONCLUSÕES

- 1) A quantificação relativa dos genes *ARSE:GAPDH* utilizando amostras de sangue armazenadas em papel-filtro é um método rápido, simples, sensível e específico, com custo viável e passível de automação, tornando-se potencialmente aplicável na triagem da síndrome de Turner 45,X.

- 2) A aplicabilidade do método no reconhecimento de mosaicismos do cromossomo X ainda requer adaptações para permitir adequada sensibilidade e especificidade.

7. ANEXOS

Anexo 1 - Dados Clínicos das Pacientes com Síndrome de Turner (45,X) por Consulta a Prontuários.

ID	DIAG INICIAL	IC (anos)	IC DIAG (anos)	EST (cm)	ZEST	PESO (kg)	ZPESO	Emãe (cm)	Epai (cm)	TH (cm)	ZTH	Pnasc (g)	Cnasc (cm)
1	ST	20,33	13,16	135,50	-3,24	37,60	-1,20	152,00	170,00	154,50	-1,28	1980,00	43,00
2	NC	18,33	16,25	139,50	-3,59	20,80	-14,66	159,30	170,00	162,60	-0,11	2900,00	NC
3	BE	11,25	8,16	115,50	-2,52	21,00	-1,60	168,00	176,50	170,20	1,07	3750,00	49,00
4	NC	17,92	14,91	130,50	-4,87	34,20	-3,12	160,00	165,00	160,50	-0,44	3000,00	NC
5	NC	10,75	9,41	112,00	-3,88	21,50	-2,18	148,00	160,50	NC	NC	2750,00	47,00
6	BE	17,58	1,41	118,50	-3,34	29,30	-0,96	157,00	175,00	164,00	0,10	2850,00	49,00
7	BE (ST)	18,75	13,58	122,40	-5,53	25,50	-4,67	159,80	156,00	155,90	-1,15	2950,00	47,00
8	ST	13,08	6,00	141,00	-2,97	38,00	-1,52	161,00	167,00	157,50	-0,78	2100,00	48,00
9	NC	18,67	12,91	124,60	-4,57	28,10	-3,11	157,50	160,00	156,80	-1,02	2750,00	51,00
10	ST	17,17	12,25	121,80	-4,14	28,50	-2,40	NC	NC	NC	NC	2050,00	NC
11	ST	15,25	5,50	96,00	-3,47	14,00	-2,73	149,00	167,40	156,60	-1,05	2690,00	41,00
12	ST	20,67	3,75	90,00	-2,12	13,00	-1,33	154,00	170,00	160,00	-0,52	2650,00	47,00
13	ST	6,25	1,25	68,50	-2,84	7,45	-3,33	150,00	172,00	159,00	-0,67	2600,00	45,00
14	NC	13,08	12,00	124,50	-3,56	23,00	-3,80	156,50	160,00	156,20	-1,09	2000,00	45,00
15	ST	17,00	14,08	116,10	-6,82	31,00	-3,30	146,50	150,00	146,20	-2,63	2900,00	45,00
16	ST	20,92	16,58	141,00	-3,37	33,00	-5,10	160,00	161,00	158,50	-0,75	2500,00	40,00
17	ST	19,50	15,00	135,50	-4,11	35,00	-3,02	155,00	160,00	155,50	-1,21	3500,00	NC
18	NC	18,75	9,50	112,80	-3,79	24,00	-1,49	145,80	171,00	151,90	-1,72	2680,00	44,00
19	ST	18,33	0,03	47,00	-1,98	2,95	-1,45	157,70	178,00	165,80	0,39	2880,00	46,00
20	BE (ST)	15,33	8,58	107,50	-4,27	17,80	-3,12	141,70	169,50	153,60	-1,50	2180,00	42,00
21	ST	2,33	2,33	83,00	-1,48	11,00	-1,37	163,00	168,00	163,50	0,02	2350,00	41,00
22	ST	20,08	14,00	141,50	-3,10	57,00	0,53	167,50	184,00	173,80	0,61	2000,00	43,00
23	ST	28,00	9,50	107,00	-4,86	16,00	-4,71	144,00	NC	NC	-0,21	1450,00	38,00
24	NC	16,58	13,50	131,40	-4,13	29,20	-3,32	166,00	155,00	158,50	-0,75	NC	NC
25	ST	8,08	0,91	74,00	0,10	9,90	0,38	159,30	172,00	163,00	0,05	3140,00	50,00

ID = N° de identificação da paciente; DIAG = Diagnóstico; BE = Baixa estatura; ST = Síndrome de Turner; IC = Idade cronológica;

EST = Estatura; Emãe = Estatura da mãe; Epai = Estatura do pai; TH = estatura alvo; Pnasc = Peso de nascimento;

Cnasc = Comprimento de nascimento; cm = centímetros; NC = Não consta no prontuário.

Anexo 2 - Resultados Laboratoriais das Pacientes com Síndrome de Turner (45,X)

ID	Cariótipo	Nº Metáfases Contadas	ARSE:GAPDH	SRY	TSPY
1	45,X	20	0,26	NEG	POS
2	45,X	20	0,30	NEG	NEG
3	45,X	25	0,30	NEG	NEG
4	45,X	15	0,34	NEG	NEG
5	45,X	22	0,35	NEG	NEG
6	45,X	30	0,38	POS	POS
7	45,X	28	0,38	NEG	NEG
8	45,X	NC	0,40	NEG	NEG
9	45,X	22	0,41	NEG	NEG
10	45,X	25	0,41	NEG	NEG
11	45,X	16	0,42	NEG	NEG
12	45,X	11	0,45	NEG	NEG
13	45,X	15	0,45	NEG	NEG
14	45,X	30	0,50	NEG	NEG
15	45,X	30	0,50	NEG	NEG
16	45,X	22	0,52	NEG	NEG
17	45,X	29	0,52	NEG	NEG
18	45,X	28	0,53	NEG	NEG
19	45,X	11	0,53	NEG	NEG
20	45,X	25	0,55	NEG	NEG
21	45,X	NC	0,55	NEG	POS
22	45,X	30	0,57	NEG	NEG
23	45,X	20	0,58	NEG	NEG
24	45,X	30	0,61	NEG	NEG
25	45,X	15	0,65	NEG	NEG

ID = N° de Identificação do paciente;

ARSE:GAPDH = Resultado do teste molecular por PCR em tempo real;

NEG = Negativo; POS = Positivo; NC = não consta no prontuário.

Anexo 3 - Dados Clínicos das Pacientes com Síndrome de Turner (Outros cariótipos)

ID	DIAG INICIAL	IC (anos)	IC DIAG (anos)	EST (cm)	ZEST	PESO (kg)	ZPESO	Emãe (cm)	Epai (cm)	TH (cm)	ZTH	Pnasc (g)	Cnasc (cm)
26	NC	12,58	9,83	114,10	-2,74	23,70	-0,94	145,00	167,20	154,10	-1,42	NC	NC
27	NC	13,75	6,25	103,50	-2,70	14,00	-3,50	154,00	175,00	162,50	-0,13	2750,00	45,00
28	ST/ DGH	19,00	10,83	121,30	-3,09	25,60	-2,03	160,00	170,00	163,00	-0,05	NC	NC
29	NC	9,67	6,33	103,70	-2,72	18,00	-1,14	162,50	174,00	166,20	0,45	2550,00	46,00
30	BE	24,17	12,00	123,50	-3,66	29,00	-2,08	151,00	180,00	163,50	0,02	2800,00	50,00
31	BE	15,42	11,50	120,10	-3,72	27,40	-2,12	147,70	160,00	151,80	-1,77	NC	NC
32	Turner	15,25	8,83	121,00	-1,85	41,00	1,70	154,00	159,00	154,50	-1,36	2450,00	47,00
33	BE	19,92	15,00	128,00	-5,28	27,50	-5,72	160,00	170,00	163,00	-0,05	NC	NC
34	BE	16,00	6,08	104,50	-2,21	17,70	-1,06	150,00	172,00	159,00	-0,67	3100,00	49,00
35	BE	7,25	5,61	105,50	-1,33	18,00	-0,50	151,00	167,00	157,00	-0,98	2800,00	48,00
36	BE	14,25	8,16	113,50	-2,72	16,70	-3,35	146,50	166,00	154,20	-1,40	2950,00	49,00
37	DM1	20,25	12,66	149,00	1,81	45,50	1,58	150,00	160,00	153,00	-1,59	3300,00	NC
38	BE	14,33	5,16	97,50	-2,55	14,30	-2,09	156,00	175,00	163,50	0,02	3120,00	47,00
39	BE	6,08	12,25	128,70	-3,82	36,00	-1,25	159,00	155,00	155,00	-1,29	2000,00	44,00
40	BE	12,50	10,66	124,00	-2,63	34,00	-0,30	160,00	170,00	163,00	-0,05	2800,00	NC
41	BE	4,83	0,66	61,00	-2,75	6,00	-2,66	167,30	163,00	163,30	-0,01	3130,00	47,00
42	NC	15,75	11,58	123,00	-3,36	24,50	-2,91	155,50	168,00	159,80	-0,55	2400,00	47,00
43	ST	8,58	1,66	77,00	-1,50	9,30	-2,03	166,00	182,00	172,00	1,34	3570,00	46,00
44	BE	10,25	4,91	99,50	-1,75	15,70	-1,00	152,00	176,00	162,00	-0,21	3150,00	51,00
45	ST	14,00	14,00	137,30	-3,52	41,80	-0,97	152,00	169,00	158,50	-0,75	2260,00	41,00
46	NC	12,33	7,66	110,50	-2,79	18,00	-2,23	157,50	165,00	159,20	-0,63	2700,00	49,00
47	BE	23,75	11,58	123,00	-3,42	24,50	-2,97	152,00	161,00	154,50	-1,36	NC	NC
48	ST	15,00	9,75	114,60	-3,62	21,00	-2,64	163,50	170,00	164,80	0,22	3065,00	47,00
49	ST	12,58	7,33	106,40	-3,31	18,00	-1,98	159,90	169,00	162,40	-0,14	2780,00	NC
50	BE	16,75	10,58	121,50	-2,93	23,50	-2,44	155,00	163,00	157,00	-0,98	2980,00	51,00

Continuação

ID	DIAG INICIAL	IC (anos)	IC DIAG (anos)	EST (cm)	ZEST	PESO (kg)	ZPESO	Emãe (cm)	Epai (cm)	TH (cm)	ZTH	Pnasc (g)	Cnasc (cm)
51	NC	16,92	4,00	81,00	-4,98	10,20	-4,41	148,00	NC	NC	NC	2240,00	45,50
52	ST	21,25	11,00	125,50	-2,59	29,70	-1,22	NC	165,00	NC	NC	2000,00	44,00
53	BE	16,58	12,41	128,10	-3,48	27,40	-2,80	155,00	170,00	160,50	-0,44	3100,00	47,00
54	ST	20,42	16,33	130,20	-5,04	27,50	-7,76	160,00	162,00	159,00	-0,67	NC	NC
55	BE	22,17	13,75	129,10	-4,63	32,20	-2,70	170,00	165,00	165,50	0,33	2560,00	NC
56	ST	21,42	12,83	120,50	-4,90	23,50	-4,42	149,00	164,00	154,50	-1,36	2500,00	50,00

ID = N° de identificação da paciente; DIAG = Diagnóstico; BE = Baixa estatura; ST = Síndrome de Turner; IC = Idade cronológica; EST = Estatura; Emãe = Estatura da mãe; Epai = Estatura do pai; TH = Estatura alvo; Pnasc = Peso de nascimento; Cnasc = Comprimento de nascimento; NC = Não consta no prontuário

Anexo 4 - Resultados Laboratoriais das Pacientes ST (Mosaicos)

ID	Cariótipo	Frequência	Nº Metáfases Contadas	ARSE:GAPDH	SRY	TSPY
26	45,X/46,X+mar	[50%]:[50%]	10	0,83	POS	POS
27	45,X/46,X+mar	NC	16	0,56	NEG	NEG
28	45,X/46,X+mar	[40%]:[60%]	30	0,57	NEG	NEG
29	45,X/46,X+mar	[83%]:[17%]	40	0,49	NEG	NEG
30	45,X/46,X+mar	[94%]:[06%]	32	0,43	NEG	NEG
31	45,X/46,X+mar	[16%]:[84%]	32	0,86	NEG	NEG
32	45,X/46,X+mar	NC	NC	0,56	NEG	NEG
33	45,X/46,Xr(X)	[80%]:[20%]	30	0,55	NEG	NEG
34	45,X/46,Xr(X)	[33%]:[67%]	20	0,56	NEG	NEG
35	45,X/46,XX	[04%]:[96%]	50	1,01	nr	nr
36	45,X/46,XX	[07%]:[93%]	40	0,89	nr	nr
37	45,X/46,XX	[07%]:[93%]	30	0,97	nr	nr
38	45,X/46,XX	[25%]:[75%]	20	0,92	nr	nr
39	45,X/46,XX	[57%]:[43%]	7	0,66	nr	nr
40	45,X/46,XX	[02%]:[98%]	50	0,79	nr	nr
41	45,X/46,XX	[05%]:[95%]	40	0,80	nr	nr
42	45,X/46,XX	[17%]:[83%]	29	1,14	NEG	NEG
43	45,X/46,XX	[98%]:[02%]	NC	0,40	NEG	NEG
44	45,X/46,XY	[43%]:[57%]	30	0,78	POS	POS
45	45,X/46Xi(Xp)	[05%]:[95%]	40	0,53	NEG	NEG
46	45,X/46Xi(Xp)	[15%]:[85%]	20	0,48	NEG	NEG
47	45,X/46Xi(Xq)	[03%]:[97%]	30	0,43	nr	nr
48	45,X/46Xi(Xq)	[56%]:[44%]	18	0,55	nr	nr
49	45,X/46Xi(Xq)	[72%]:[28%]	32	0,59	nr	nr
50	45,X/46Xi(Xq)	NC	NC	0,44	nr	nr

Continuação

ID	Cariótipo	Frequência	Nº Metáfases Contadas	ARSE:GAPDH	SRY	TSPY
51	45,X/46Xi(Xq)	[89%]:[11%]	37	0,40	nr	nr
52	45,X/47,XXX	[89%]:[11%]	28	0,70	nr	nr
53	46,Xdel(X)(p22)	NC	25	0,88	nr	nr
54	46,Xi(Xq)	NC	NC	0,60	nr	nr
55	46,Xi(Xq)	NC	NC	0,75	nr	nr
56	46,Xi(Xq)	NC	NC	0,48	nr	nr

ID = N° de identificação da paciente; MC = N° de metáfases contadas; ARSE:GAPDH = Resultado do teste molecular por PCR em tempo real; NEG = Negativo; POS = Positivo; nr = Não realizado PCR para detecção de cromossomo Y.

Anexo 5 - Dados Clínicos e Laboratoriais dos Controles

ID	DIAGNÓSTICO	IC (anos)	EST (cm)	ZEST	ARSE:GAPDH
1C	Carcinoma Papilífero de Tireóide	21,75	160,00	-0,50	0,74
2C	Mãe	40,75	161,00	-0,34	0,75
3C	Tia (mãe)	54,33	160,00	-0,50	0,76
4C	Mãe	40,42	152,50	-1,65	0,77
5C	Mãe	45,17	158,00	-0,81	0,77
6C	Mãe	38,08	NC	NC	0,79
7C	Mãe	53,50	153,00	-1,58	0,80
8C	Mãe	49,17	153,70	-1,58	0,82
9C	HCSR	9,83	143,00	0,84	0,83
10C	Avó de DGH	63,75	160,00	-0,50	0,83
11C	Mãe de BE	37,00	160,00	-0,50	0,83
12C	Mãe	29,91	161,50	-0,34	0,84
13C	Mãe de BE familiar	30,83	148,50	-2,27	0,86
14C	Mãe	37,91	147,00	-2,50	0,86
15C	Mãe de BE com Síndrome de Kabuki	38,67	154,50	-1,35	0,87
16C	Mãe	33,33	154,80	-1,35	0,88
17C	Mãe	40,50	166,00	0,41	0,88
18C	Mãe	34,83	152,00	-1,65	0,89
19C	Pocraniofaringioma (DGH)	15,75	139,60	-3,54	0,89
20C	Mãe	39,08	165,00	0,25	0,89
21C	Mãe	38,50	167,00	0,56	0,89
22C	Mãe	38,42	159,00	-0,66	0,90
23C	Mãe de BE	NC	154,50	-1,35	0,90
24C	Mãe de ST (Mosaico)	37,92	155,50	-1,20	0,91
25C	Mãe	42,67	160,00	-0,50	0,91
26C	Mãe	35,50	155,00	-1,20	0,91

Continuação

ID	DIAGNÓSTICO	IC (anos)	EST (cm)	zEST	ARSE:GAPDH
27C	Avó	70,92	NC	NC	0,92
28C	Puberdade Precoce Central	12,50	143,60	-1,53	0,92
29C	Mãe	NC	155,00	-1,20	0,92
30C	Hipercolesterolemia	14,42	146,50	-2,26	0,93
31C	Mãe de ST	42,42	155,00	-1,20	0,94
32C	Obesidade	15,50	158,80	-0,53	0,94
33C	Mãe	30,83	155,00	-1,20	0,95
34C	Mãe	36,50	173,20	1,53	0,96
35C	Adenoma de Tiróide	20,25	157,70	-0,86	0,97
36C	Mãe de BE familiar	43,08	147,50	-2,39	0,98
37C	Mãe de Doença Graves	54,08	160,00	-0,50	0,98
38C	Mãe de DGH	40,58	164,00	0,10	0,99
39C	Mãe	38,00	160,00	-0,50	1,02
40C	Mãe de BE	37,75	151,60	-1,80	1,03
41C	Mãe	36,42	168,00	0,72	1,03
42C	Mãe	32,50	154,70	-1,35	1,04
43C	Obesidade	15,50	168,00	0,88	1,04
44C	Mãe	39,92	162,00	-0,20	1,06
45C	Mãe HAC (Mutaçao Q318X)	28,33	156,20	-1,09	1,07
46C	Mãe de BE	39,00	142,00	-3,26	1,08
47C	Avó	58,83	NC	NC	1,10
48C	Mãe	26,17	NC	NC	1,11
49C	Mãe de BE	43,75	141,50	-3,34	1,11
50C	Mãe	50,83	157,00	-0,97	1,11
51C	Mãe	50,83	NC	NC	1,11
52C	Avó	57,00	152,00	-1,74	1,13
53C	Mãe de BE	NC	154,00	-1,43	1,13

Continuação

ID	DIAGNÓSTICO	IC (anos)	EST (cm)	ZEST	ARSE:GAPDH
54C	Mãe de BE	33,83	148,90	-2,20	1,13
55C	Mãe	47,42	155,00	-1,27	1,14
56C	Mãe de ACCP	43,92	163,00	-0,04	1,15
57C	Obesidade + IR + Toxoplasmose	15,25	157,20	-0,75	1,20
58C	Avó	55,33	166,00	0,41	1,20
59C	Mãe de BE	NC	160,00	-0,50	1,20
60C	Mãe de ST	30,91	156,00	-1,12	1,21
61C	Mãe de DM + IRC	33,50	NC	NC	1,21
62C	Mãe	35,17	NC	NC	1,21
63C	Mãe	NC	149,00	-2,19	1,24
64C	Mãe	37,25	157,50	-0,89	1,26
65C	Diabetes Insípidos Central	22,83	151,00	-1,89	1,30
66C	Mãe	NC	156,00	-1,12	1,31
67C	ACCP	15,75	150,00	-1,92	1,32
68C	Mãe de BE	46,33	NC	NC	1,32
69C	Mãe	15,33	141,70	-3,17	1,33
70C	Tia (mãe)	40,92	167,00	0,57	1,34
71C	Mãe	50,75	144,00	-2,96	1,35
72C	Mãe	42,92	NC	NC	1,35
73C	Mãe de ST	38,58	159,90	-0,52	1,36
74C	Mãe	39,08	170,00	1,03	1,37
75C	Mãe de BE	36,92	159,00	-0,66	1,37
76C	Obesidade	15,75	154,00	-1,30	1,44
77C	Mãe	43,17	164,50	0,18	1,55
78C	Mãe de BE	30,42	157,60	0,87	1,56

ID = N° de identificação do controle; IC = Idade cronológica; EST = Estatura, ARSE:GAPDH = Resultado do teste molecular por PCR em tempo real; DGH = Deficiência de Hormônio de Crescimento; HCSR = Hiperplasia Congênita da Supra Renal; BE = Baixa Estatura; HAC = Hiperplasia Adrenal Congênita; ACCP = Aceleração Constitucional do Crescimento e Puberdade; IR = Insuficiência Renal

Anexo 6 - Método para Extração de DNA a partir de papel filtro com MGM® PurePlus

1. Remover, utilizando um perfurador, quatro discos (círculos) de aproximadamente 2 mm do cartão SS903 seco e colocar em tubo de 1,7 mL.
2. Adicionar 180 µL de reagente de purificação MGM® PurePlus (MGM Assessoria Biológica)
3. Incubar por 30 minutos a 55°C.
4. Com auxílio de pipeta, aspirar todo o reagente e descartar.
5. Adicionar 180 µL de reagente de purificação MGM® *PurePlus*
6. Incubar por 15 minutos a 55°C.
7. Adicionar 200 µL de água destilada *Ultrapure™* para biologia molecular (*Gibco™ Invitrogen Corporation*) deixar por 5 minutos à temperatura ambiente.
8. Com auxílio de pipeta, aspirar toda a água e descartar.
9. Repetir os passos 7 e 8 mais duas vezes.
10. Adicionar 30 µL de água destilada *Ultrapure™* para biologia molecular
11. Incubar a 80° C (bloco térmico) por 20 minutos.
12. O DNA em suspensão (sobrenadante) deve ser transferido para um novo tubo e está pronto para o uso.

Anexo 7 - Extração de DNA a partir de Sangue Periférico

(Método de Lahiri & Nurberger, 1991 - modificado por Cavalli 1996 - Salazar 1997)

Preparar previamente:

- Sangue colhido em tubo DB Vacutainer com EDTA (Nº catálogo 8002015, Becton, Dickson Ind Cirúrgica, Juiz de Fora, MG, Brasil).
 - Estabilizar sangue à temperatura ambiente (~15 a 20 minutos).
 - Ligar bloco térmico, fixando temperatura em 65 °C.
1. Adicionar 600 µl de sangue em tubo de microcentrífuga, com capacidade para 2 mL, e adicionar 900 µl de solução TTKM1.
 2. Centrifugar a 5000 rotações por minuto (rpm), por 5 minutos em microcentrífuga Eppendorf (Nº catálogo 5415C, *Brinkmann Instruments, Inc, Cantiage Road, Westbury, NY, USA*).
 3. Descartar o sobrenadante.
 4. Repetir os passos 1 e 2 por mais duas vezes ou até que não hajam mais hemácias no precipitado.
 5. Lavar o precipitado com 1mL de solução TKM1, agitando suavemente para a retirada do Triton.
 6. Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos.
 7. Ressuspender o precipitado em 200µl de TKM2 e adicionar 20µl SDS a 10%.
 8. Incubar a 65°C por 15 minutos, em bloco térmico previamente aquecido (Nº catálogo 110001-2, *Boeckel Scientific, Pennsylvania Blvd. Feasterville, PA, USA*)
 9. Adicionar 60µl NaCl 5M.
 10. Realizar agitação por vortex durante 30 segundos.
 11. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente.

12. Recuperar cuidadosamente o sobrenadante, transferindo-o para outro tubo de microcentrífuga, com capacidade para 1,7 mL, e desprezar o precipitado.
13. Adicionar 1 mL de etanol absoluto e, por inversão, precipitar o DNA.
14. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente.
15. Descartar o sobrenadante.
16. Adicionar 500 µL de etanol a 70% e, por inversão, lavar o precipitado.
17. Centrifugar novamente a 13000 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente.
18. Descartar o sobrenadante e deixar o precipitado secar, com o tubo invertido sobre papel toalha.
19. Ressuspender o DNA em 50µl de água destilada *Ultrapure™* para biologia molecular (Nº catálogo 10977-015, *Gibco™ Invitrogen Corporation, Faraday Avenue, Carlsbad, CA, USA*).

TKM1

	Concentração final	Para 1 litro
Tris-HCl , pH 7,6.....	10 mM	1.58 g
KCl	10 mM	0.75 g
MgCl	10 mM	0.95 g
EDTA	2 mM	4 mL

TTKM1

	Concentração final	Para 1 litro
Tris-HCl , pH 7,6.....	10 mM	1.58 g
KCl	10 mM	0.75
MgCl	10 mM	0.95 g
EDTA	2 mM	4 mL
Triton-X	0,27%	2.7 mL

TKM2

	Concentração final	Para 1 litro
Tris-HCl , pH 7,6.....	10 mM	1.58 g
KCl	10 mM	0.75 g
MgCl	10 mM	0.95 g
EDTA	2 mM	4 mL
NaCl	400 mM	23.40 g

Anexo 8 - Cálculo de Variação Intraensaio

Média do CV% = 0,62

Exp 1	Ct ARSE	Ct GAPDH
Tubo1	24,66	26,4
Tubo2	24,48	26,08
Tubo3	24,56	25,99
Tubo4	24,53	26,24
Tubo5	24,88	26,27
Tubo6	24,34	25,91
Tubo7	24,56	26,32
Tubo8	24,56	26,13
Tubo9	24,72	26,08
Tubo10	24,82	26,33
Tubo11	24,83	26,31
Tubo12	24,84	26,54
Média	24,65	26,22
DP	0,17	0,18
CV%	0,69	0,69
DP(x)	0,20	0,20

Exp 2	Ct ARSE	Ct GAPDH
Tubo1	25,53	27,48
Tubo2	25,42	27,26
Tubo3	25,40	27,47
Tubo4	25,64	27,16
Tubo5	25,37	27,22
Tubo6	25,36	27,44
Tubo7	25,64	28,21
Tubo8	25,70	28,00
Média	25,51	27,53
DP	0,14	0,38
CV%	0,54	1,38
DP(x)	0,19	0,49

DP = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação ($DP \div \text{média} \cdot 100$);

DP(x) = Intervalo de Variação ($CV \div \sqrt{n}$) utilizada para "n" pequenos.

Anexo 9 - Cálculo de Variação Interensaio

Média CV% = 0,89

Exp 1	Ct ARSE	Ct GAPDH
Tubo1	24,66	26,4
Tubo2	24,48	26,08
Tubo3	24,56	25,99
Tubo4	24,53	26,24
Tubo5	24,88	26,27
Tubo6	24,34	25,91
Tubo7	24,56	26,32
Tubo8	24,56	26,13
Tubo9	24,72	26,08
Tubo10	24,82	26,33
Tubo11	24,83	26,31
Tubo12	24,84	26,54
Média	24,65	26,22
DP	0,17	0,18
CV%	0,69	0,69
DP(x)	0,20	0,20

Exp 2	Ct ARSE	Ct GAPDH
Tubo1	25,53	27,48
Tubo2	25,42	27,26
Tubo3	25,40	27,47
Tubo4	25,64	27,16
Tubo5	25,37	27,22
Tubo6	25,36	27,44
Tubo7	25,64	28,21
Tubo8	25,70	28,00
Média	25,51	27,53
DP	0,14	0,38
CV%	0,54	1,38
DP(x)	0,19	0,49

Exp 3	Ct ARSE	Ct GAPDH
Tubo1	25,04	27,41
Tubo2	25,06	27,33
Tubo3	26,70	29,09
Tubo4	26,65	28,87
Tubo5	25,95	29,49
Tubo6	26,05	28,75
Média	25,91	28,49
DP	0,73	0,90
CV%	2,82	3,17
DP(x)	1,15	1,30

Exp 4	Ct ARSE	Ct GAPDH
Tubo1	24,92	27,3
Tubo2	24,72	27,18
Média	24,82	27,24
DP	0,14	0,08
CV%	0,57	0,31
DP(x)	0,40	0,22

Exp 5	Ct ARSE	Ct GAPDH
Tubo1	25,43	27,87
Tubo2	25,39	28,03
Média	25,41	27,95
DP	0,02	0,08
CV%	0,08	0,29
DP(x)	0,06	0,20

Exp 6	Ct ARSE	Ct GAPDH
Tubo1	26,58	29,42
Tubo2	26,35	29,01
Média	26,47	29,22
DP	0,16	0,29
CV%	0,61	0,99
DP(x)	0,43	0,70

DP = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação ($DP \div \text{média} \cdot 100$); DP(x) = Intervalo de Variação ($CV \div \sqrt{n}$) utilizada para “n” pequenos.

Anexo 10 - Custo do teste molecular (PCR em tempo real) por duplicata**EXTRAÇÃO DE DNA PF**

Item (quantidade utilizada)	Unitário (R\$)	Unid/Paciente	por pac (R\$)	Apresentação
Papel filtro MGM (1 Círculo)	2,00	1	2,00	caixa 50 - 3 discos (1 disco/paciente - R\$ 300,00)
Tubo de 1,7 mL (2 tubos)	0,05	2	0,10	caixa 500 (R\$ 23,38)
Ponteiras de 200 ul (9 ponteiras)	0,20	9	1,80	rack com 96 ponteiras (R\$ 19,09)
Ponteiras de 100 ul (2 ponteiras)	0,20	2	0,40	rack com 96 ponteiras (R\$ 19,09)
Reagente MGM (360 ul)	0,90	1	0,90	frasco com 100 ml (~278 extrações - R\$ 250,00)
H2O ultrapure Invitrogen (630 ul)	0,13	1	0,13	frasco com 500 ml (~793 extrações - R\$ 101,20)

R\$ 5,33**PCR em Tempo-Real**

Item (quantidade utilizada)	unitario (R\$)	Unid/Paciente	x2 (duplicata)	Apresentação
Master mix 2X (13 ul por tubo)	2,23	2	4,46	frasco de 5ml (~380 reações - R\$ 846,85)
Ponteira de 200 (1 por mix)	0,20	1	0,20	rack com 96 ponteiras (R\$19,09)
Tubo de 1,7 ml (1 por mix)	0,05	1	0,05	caixa com 500 (R\$23,38)
Primer ARSE sense (0,2ul/tubo)	0,01	2	0,02	frasco 50Mm (~8000 reações - R\$ 62,70)
Primer ARSE antisense (0,2ul/tubo)	0,01	2	0,02	frasco 50Mm (~8000 reações - R\$ 72,60)
Sonda ARSE (0,2ul por tubo)	0,53	2	1,06	frasco 6000pmol (~1200 reações - R\$ 634,96)
Primer GAPDH sense (0,5ul/tubo)	0,02	2	0,04	frasco 50Mm (~3200 reações - R\$ 63,30)
Primer GAPDH antisense (0,5ul/tubo)	0,02	2	0,04	frasco 50Mm (~3200 reações - R\$ 69,30)
Sonda GAPDH (0,5ul/tubo)	1,33	2	2,66	frasco 6000pmol (~480 reações - R\$ 634,96)
H2O ultrapure (2ul/tubo)	0,01	2	0,02	frasco com 500 ml (R\$ 101,20)
Tubo óptico de 0,2ml (2/paciente)	0,30	2	0,60	caixa com 2000 unidades (R\$ 556,25)
Tampa óptica (2/ paciente)	0,10	2	0,20	caixa com 2400 unidades (R\$ 226,52)
Ponteira de 10ul (7 ponteiras/paciente)	0,20	7	1,40	rack com 96 ponteiras (R\$ 19,09)
Ponteira de 100 ul (1 por mix)	0,20	1	0,20	rack com 96 ponteiras (R\$ 19,09)

R\$ 10,97**R\$ 16,30**

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álamo PG, Rodríguez IC. Síndrome de Turner com isocromosoma X: diagnóstico tardío [Carta]. *An Med Interna* 2001; 18(3):167-68.

Albisu Y. Síndrome de Turner: del genotipo al fenotipo [monografía online] Donostia: Espanha; 2001. Disponível em: <http://www.svnp.es/Documen/turner.htm>

Álvarez-Nava F, Soto M, Sánchez MA, Fernández E, Lanes R. Molecular analysis in Turner syndrome. *J Pediatr* 2003; 142:336-40.

Baldin AD, Armani MCA, Morcillo AM, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Maciel-Guerra ATM, et al. Proporções corporais em um grupo de pacientes brasileiras com síndrome de Turner. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49:529-535.

Barr ML, Bertram LF, A morphological distinction between neurons of the male and the female and the behavior of the nucleolar satellite during accelerate nucleoprotein synthesis. *Nature* 1949; 163:676-77.

Bertelloni S, Baroncelli GI, Fruzzetti F, Spinelli C, Simi P, Saggese G. Growth and puberty in Tyrnes's syndrome. *J Ped Endocrinol Metab* 2003; 16(2): 307-15.

Brandalize SRC, Czeresnia D. Avaliação do programa de prevenção e promoção da saúde de fenilcetonúricos. *Rev Saúde Pública* 2004;38(2):300-06.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal. Brasília (DF); Ministério da Saúde; 2004.

Bréga SM, Vassilieff I, Almeida A, Mercadantes A, Bissacot, Cury PR, Freire-Maia DV. Clinical, cytogenetic and toxicological studies in rural workers exposed to pesticides in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Cas Saúde Pub* 1998; 14(3):109-15.

Cardoso AA, Piazza MJ. Disgenesias gonadais – revisão de literatura. *Femina* 2000; 28(4):193-99.

Carvalho JAM, Silva AS, Freitas EM, Maira SAL. O diagnóstico da síndrome de Turner no período neonatal. *Pediatria Moderna* 1985; 20(1):29-34.

César ACG, Silva AE, Tjara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. *Arq Gastroenterol* 2002; 39(4)253-59.

Chauffaille MLLF. Molecular-cytogenetic variant in chronic myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25(3):153-39.

Cirigliano V, Voglino G, Cañadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. *Mol Human Rep* 2004; 10(11): 839-46.

Conway GS. Considerations for transition from paediatric to adult endocrinology: women with Turner's syndrome. *Growth Horm & IGF Research* 2004; 14:77-84.

Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass JAH. Turner's syndrome in adulthood. *Endocrin Rev* 2002; 23(1):120-40.

Fedrizzi P, Basso FS, Kern Filho N, Mandelli NCB. Síndrome de Turner: uma atualização. *Rev AMRIGS* 1993; 37(3): 187-91.

Figueiredo CC, Kochi C, Longui CA, Rocha MN, Richeti F, Evangelista NMA, et al. Size of the exon 1-CAG repeats of the androgen receptor gene employed as molecular marker in the diagnosis of Turner syndrome in girls with short stature. *Genetics and Molecular Research* 2008, 7 (1):43-49.

Fröhling S, Skelin S, Liebbisch C, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2002; 20(10):2480-85.

Gibson UEM, Heid, CA, Willians PM. A novel method for real time quantitative rt-pcr. *Genome Res* 1996; 6:995-01.

Gicquel C, Gaston V, Cabrol S, Le Bouc Y. Assessment of Turner's syndrome by molecular analysis of the X chromosome in growth-retarded girls. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(5):1472-76.

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative pcr: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30:503-12.

Gravholt CH, Juul S, Naeraa RW, Hansen J. Prenatal and posnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study. *BMJ* 1996; 312:16-

Gravholt CH. Medical problems of adult Turner's syndrome. *Horm Res* 2001; 56(1): 44-50.

Guedes AD, Bianco B, Callou EQ, Gomes AL, Lipay MVN, Verreschi ITN. O hormônio de crescimento na síndrome de Turner: dados e reflexões. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52(5):757-64.

Guimarães MM, Guerra CTG, Alves STF, Cunha CSA, Marins LA, Barreto LFM et al. Intercorrências clínicas na sínrome de Turner. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2001; 45(4):331-38.

Hackel C, Varella-Garcia M. Interphase cytogenetics using fluorescente in situ hybridization: an overview of its application to diffuse and solid tissue. *Braz J Genet* 1997; 20(1):97-06.

Halsall A, Ravetto P, Reyes Y, Thelwell N, Davidson A, Gaut R, Little S. The quality of DNA extracted from liquid or dried blood is not adversely affected by storage at 4 degrees C for up to 24 h. *Int J Epidemiol.* 2008;37 Suppl 1:i7-10

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative pcr. *Genome Res* 1996; 6:986-94.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic pcr análise: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11:1026-30.

Hintz RL. SHOX mutations. *Rev Endoc Metabolic Disorders* 2002; 3:263-67.

Hjerrild BE, Mortensen KH, Gravholt CH. Turner syndrome and clinical treatment. *British Med Bulletin* 2008; 86:77-93.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:7276-80.

Hreinsson JG, Ojala M, Fridström M, Borgström B, Rasmussen C, Lundqvist M, et al. Follicles are found in the ovaries of adolescent girls with Turner's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002. 87:3618-23.

Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J, Leshane ES, Ramirez I, Weber WD, et al. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time pcr. *Clin Chem* 2004; 50(3):516-21.

Jorge AA, Nishi MY, Funari MF, Souza SC, Arnhold IJ, Mendonça BB. Short stature caused by SHOX gene haploinsufficiency: from diagnosis to treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(5):765-73.

Kochi C. Avaliação da origem parental do cromossomo X na determinação da estatura de pacientes com síndrome de Turner através da análise das variações do número de repetições CAG do receptor androgênico. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2004.

Klumb CE, Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24(2):111-25.

Lahn BT, Page DC. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 1999; 286:964-967.

Lipay MNV, Bianco B, Verreschi ITN. Disgenesias gonadais e tumores: aspectos genéticos e clínicos. *Arq Brás Endocrinol Metab* 2005; 49(1):60-70.

Lippe B. Turner syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1991;20(1):121-52.

Longui CA, Rocha MN, Martinho LCAP, Gomes GG, Miranda RE, Lima TAS, Melo MB, Monte O. Molecular detection of XO – Turner syndrome. *Genet Mol Research* [periódico online] 2002; [23 setembro 2002];3(1): 266-270. Disponível em: <http://www.funcpecrp.com.br>

Martins RRS, Ramos HIB, Llena Jr. JC, Almeda JCC. Investigação clínica e genética em meninas com baixa estatura idiopática. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; 47(6):684-94.

Massa G, Verlinde F, De Schepper J, Thomas M, Bourguignon LP, Craen M, de Zegher F, François I, Du Caju M, Maes M, Henrichs C et al., Trends in age at diagnosis of Turner syndrome *Arch Dis Child* 2005; 90:267-68.

Meng H, Hager K, Rivkees SA, Gruen JR. Detection of Turner syndrome using High-throughput quantitative genotyping. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:3419-22.

Meroni G, Franco B, Archidiacono N, Messali S, Andolfi G, Rocchi M, Ballabio A. Characterization of a cluster of sulfatase genes on Xp22.3 suggests gene duplication in an ancestral pseudoautosomal region. *Human Mol Genet* 1996; 5(4):423-31.

Morgan T. Turner syndrome: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2007; 76:405-10.

Naoum PC. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2001; 23(2):15-23.

Novais CM, Pires-Alves M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (pcr). *Rev Biot Cien & Desen* [periódico on-line] 2004; [citado 10 agosto 2007] 33:10-13. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genética médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.139-23.

Otto PG, Otto PA, Frota-Pessoa O. Genética humana e clínica. São Paulo: Rocca; 1998. 333p.

Outi H. Pregnancies in women with Turner's syndrome. *An Medic* 1999; 31(2):106-10. Available from: <http://gateway.ut.ovid.com/gw1/ovidweb.cgi> (09 nov.2004)

Pallota R, Ramos E, Ribeiro MR. Metodologia diagnóstica e tratamento da recaída após transplante de medula óssea em pacientes com leucemia promielocítica aguda. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; 22(3):414-18.

Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, Municchi G. Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(6):1810-3.

Pérez FS, Varela OLV, Durán RSP. Menstruación espontánea em la disgenesia gonadal turneriana: a propósito de 6 pacientes. *Rev Cubana Endocrinol* 1999; 10(2):140-45.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:2934-38.

Ranke MB, Pflüger H, Rosendahl W, Stubbe P, Enders H, Bierich JR, et al. Turner syndrome: spontaneous growth in 150 cases and review of the literature. *Eur J Pediatr*. 1983;141(2):81-8.

Ranke MB, Saenger P. Turner's syndrome. *Lancet*. 2001; 358(9278):309-14.

Ranke MB, Lindberg A, Ferrández Longás A, Darendeliler F, Albertsson-Wikland K, Dunger D, et al. KIGS International Board. Major determinants of height development in Turner syndrome (TS) patients treated with GH: analysis of 987 patients from KIGS. *Pediatr Res*. 2007; 61(1):105-10.

Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet*. 1997;16(1):54-63.

Rocha MN. Projeto piloto para um programa de detecção neonatal da síndrome de turner 45,X. Tese (Mestrado) São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2005.

Román R, Vallejos ME, Muñoz M, Schneider R, Yaulton R, Henriquez C, Cassorla F. Síndrome de Turner: crecimiento y descripción clínica em 83 niñas chilenas. *Rev Med Chile* 2002; 130:977-84.

Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RDC. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998; 44:1748-50.

Sävendahl L, Davenport ML. Delayed diagnoses of Turner's syndrome: proposed guidelines for change. *J Pediatr*. 2000;137(4):455-9.

Schaefer BG, Riley HD. A tribute to Henry H. Turner, MD (1892-1970) a pioneer endocrinologist. *The Endocrinologist* 2004; 14(4):179-84.

Siegel DH, Sybert VP. Understanding aneuploidy. *Pediatric Derm* 2005; 22(3):270-75.

Strachan T, Read AP. *Genética molecular humana*. 2ª ed. Porto Alegre: ArtMed; 2002. 576p.

Stratakis CA, Rennert OM. Turner syndrome – an update. *The endocrinology* 2005; 15(1):27-36.

Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW, Gravholt CH. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):3897-902.

Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciência & Saúde Coletiva* 2002; 7(1):129-37.

Sybert VP, McCauley E. Medical progress: Turner's syndrome. *NEJM* 2004; 351(12):1227-38.

Taucher SC, Fuentes AM, Paulos A, Pardo A. Múltiple FISH y múltiple BAND: técnicas de citogenética molecular em cinco casos. *Rev Mec Chile* 2002; 130(5):511-18.

Valle, FC. Práticas de citologia e genética. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.p.118-65.

Zaha A. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336p.

Zimmermann B, Holzgreve W, Wenzel F, Hahn S. Novel Real-Time quantitative pcr teste for trisomy 21. *Clin Chem* 2002; 48:362-63.

FONTES CONSULTADAS

Avanzi O, Longui CA, Campos CAH, Malheiros CA, Lancelotti CLP, Macéa JR et al. Normalização para apresentação de dissertações e teses. Faculdades de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (Pós-graduação). São Paulo 2004; 26p

Ferreira, ABH. Miniaurélio: o minidicionário da língua portuguesa. 7ª ed. Curitiba: Positivo; 2008. 895p.

OMIM. *Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

RESUMO

A síndrome de Turner (ST), caracterizada pela perda total ou parcial do segundo cromossomo sexual, atinge aproximadamente 1 em cada 5000 meninas nascidas vivas. O reconhecimento precoce da ST permite a terapia adequada para baixa estatura e indução puberal na idade habitual. O diagnóstico neonatal permite ampliar a investigação para as malformações congênitas, minimizando ou evitando sequelas. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um método molecular que possibilite a identificação de pacientes com ST, a partir de amostras de sangue colhidas em papel-filtro. Para isso, foram analisadas 78 controles, 25 meninas com ST cariótipo 45,X e 32 meninas com ST com outros cariótipos. Após extração de DNA, as amostras foram submetidas a um protocolo duplex de PCR em tempo real quantitativa, utilizando iniciadores e sondas direcionados aos genes *ARSE* (duas cópias em mulheres normais) e *GAPDH* (duas cópias em mulheres normais). Estabelecendo-se como normal uma relação *ARSE::GAPDH* foi possível confirmar como normais 97% (76/78) dos controles e identificar como doentes (<0,7) 100% dos casos de ST 45,X e 56% (18/32) dos casos de ST com outros cariótipos. Avaliando os resultados encontrados nos grupos controle e ST 45,X o teste apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 97,4%, valor preditivo positivo de 92,3% e valor preditivo negativo de 100%. Portanto concluímos que a quantificação relativa dos genes *ARSE::GAPDH* em amostras de sangue armazenadas em papel-filtro é um método rápido, simples, sensível e específico, com custo viável e passível de automação, o que o torna potencialmente aplicável na triagem neonatal da síndrome de Turner 45,X ou na avaliação de grupos de risco como meninas com baixa estatura.

ABSTRACT

Turner syndrome (TS) is characterized by complete or partial loss of the second sex chromosome. It occurs in approximately 1 out of 5000 girls born alive. Early recognition of TS allows appropriate therapy of short stature and pubertal induction at usual age. The neonatal diagnosis of TS permits the active investigation of associated congenital malformations, minimizing or avoiding sequels. The aim of this study was to develop a molecular method for the diagnosis of TS employing blood samples stored on filter paper. We evaluated 78 female controls, 25 TS girls with cariotype 45,X and 32 TS patients with other cariotypes. After DNA extraction, samples were submitted to a quantitative real-time PCR, using primers and probes directed to *ARSE* gene (two copies in normal women) and to the control gene *GAPDH* (two copies in normal women). Based on control group the normal *ARSE:GAPDH* ratio was established with a cut-off value of 0.7. Abnormal *ARSE:GAPDH* ratio ($< 0,7$) was present in 100% of the TS 45,X patients, and in 56% of TS with other cariotypes. This cut-off value presented a sensitivity of 100% and specificity of 97.4% in detecting TS with a positive predictive value of 92.3% and a negative predictive value of 100%. We conclude that the determination of the *ARSE:GAPDH* ratio in blood samples stored on paper filter is a fast, simple and specific method, with viable cost and feasible automation, which makes it potentially applicable in a neonatal screening program for the diagnosis of Turner syndrome 45,X. Additionally it can be used in the evaluation of risk groups such as that of girls with short stature.

APÊNDICE

Aprovação do Comitê de Ética da ISCMSP.



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
 Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo –SP
 PABX (11) 21767000 Ramais: 5502/5710 – Fax- 2176.7041 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 29 de julho de 2005.

Projeto nº138/05
 Informe este número para
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a). Sr.(a).

Dr.(a). Murilo Rezende Melo
 Departamento de Ciências Fisiológicas

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia **15/06/2005** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa:

“Um novo método para triagem neonatal das síndromes de turner e klinefelter por PCR em tempo real ”, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado inclusive o TCLE;**
- Com pendência** modificações ou informação relevante a serem atendidas em 60 dias (enviar as alterações em duas cópias)
- Retirado**, por não ser reapresentado no prazo determinado;
- Não aprovado:** e

Aprovado inclusive TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa-ISCMSP

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](#)