



ANA PAULA DOS SANTOS

**“ESTUDO DE MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y EM  
INDIVÍDUOS COM DISGENESIA GONADAL E LINHAGEM  
CELULAR 46,XY”**

**CAMPINAS  
2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANA PAULA DOS SANTOS**

**“ESTUDO DE MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y EM  
INDIVÍDUOS COM DISGENESIA GONADAL E LINHAGEM  
CELULAR 46,XY”**

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Andréa Trevas Maciel Guerra  
Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maricilda Palandi de Mello**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ANA PAULA DOS SANTOS E ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A). ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA.

-----  
Assinatura do Orientador

**CAMPINAS  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

S237e Santos, Ana Paula dos, 1986-  
Estudo de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos com disgenesia gonadal e linhagem celular 46,XY / Ana Paula dos Santos. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Andréa Trevas Maciel Guerra.  
Coorientador : Maricilda Palandi de Mello.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cromossomo Y. 2. Deleção cromossômica. 3. Disgenesia gonadal. 4. Mosaicismo. I. Maciel-Guerra, Andrea Trevas, 1960-. II. Mello, Maricilda Palandi de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Screening of Y chromosome microdeletions in individuals with gonadal dysgenesis and 46,XY cell line.

**Palavras-chave em inglês:**

Y Chromosome

Chromosome deletion

Gonadal dysgenesis

Mosaicism

Keyword

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestra em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Andréa Trevas Maciel Guerra [Orientador]

Antônia Paula Marques de Faria

Mônica Barbosa de Melo

**Data da defesa:** 04-06-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**ANA PAULA DOS SANTOS**

---

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA

---

---

**MEMBROS:**

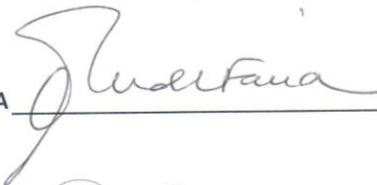
---

1. PROF(A). DR(A). ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA



---

2. PROF(A). DR(A). ANTÔNIA PAULA MARQUES DE FARIA



---

3. PROF(A). DR(A). MÔNICA BARBOSA DE MELO



---

---

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 04/06/2013

---



*Dedico este trabalho à minha família  
Geraldo, Rose, Úrsula e Júnior que  
iluminam cada segundo da minha existência.  
Eu amo vocês.*



## **Agradecimentos**

A Deus, por todos os presentes depositados em meu caminho;

Aos meus pais, verdadeiros heróis, que me socorrem sempre, sem medir esforços;

Aos meus neguinhos, Úrsula e Júnior, amo muito vocês;

A Tuti, por me apoiar e se preocupar sempre;

À minha orientadora, Andréa, e minha à co-orientadora, Maricilda pela oportunidade e confiança;

Aos pacientes e familiares, por contribuírem com o meu estudo;

À Juliana Gabriel e ao grupo GIEDDS, pela contribuição clínica;

Aos funcionários do Laboratório de Citogenética Humana, por contribuírem com a análise dos cariótipos;

Aos dois anjos encontrados em Campinas, Ilária e Társis, por me incentivarem, acreditarem em mim e me ajudarem a ingressar no mestrado;

Às amigas encontradas no CBMEG, que me receberam de braços abertos, principalmente as garotas Cristiane e Helena, pela imensa ajuda em toda a minha correria; foi ótimo ser “amiga de mestrado” de vocês;

Às amigas do laboratório de Citogenética Humana, Tânia, Laiara, Miriam, Ana Laura, Luciana Rezende, Nilma e, novamente, a Ilária, por todas as risadas, todos os conselhos, todas as flores plantadas, e a ajuda em cuidar do nosso “jardim”. Garotas, vocês são ótimas companheiras de trabalho;



À Luciana Bonadia, por toda ajuda com as minhas inúmeras dúvidas e por todas as suas considerações para a minha aula de qualificação;

Aos amigos da “Penha’s *Pension*” - encontrei uma família de adolescentes bem maluquinhos nesse lugar;

Às minhas queridas amigas Daniela, Daniele, Ana Beatriz e Francis; mesmo longe, sei que estamos sempre juntas;

Às bancas de qualificação e defesa, pelas sugestões e contribuições que ajudaram no meu crescimento profissional e elaboração desta tese;

À FAPESP, pelo suporte financeiro ao projeto.



## Resumo

As disgenesias gonadais parcial (DGP) e mista (DGM) caracterizam-se por ambiguidade genital e presença de gônada disgenética associada a testículo disgenético ou dois testículos disgenéticos. Na DGP o cariótipo é 46,XY; na DGM, há mosaico 45,X/46,XY ou suas variantes (mais de duas linhagens e(ou) anomalias estruturais do cromossomo Y). Esses mosaicos podem determinar, ainda, fenótipo feminino com síndrome de Turner (ST), distúrbio da diferenciação do sexo ovotesticular (DDS OT) e esterilidade em homens com genitais normais. Independentemente do fenótipo gonadal e genital, esses indivíduos apresentam outros sinais clínicos decorrentes da linhagem 45,X, como baixa estatura, dismorfismos, anomalias cardíacas e renais e diversas afecções adquiridas. Nos últimos anos surgiram evidências de ligação entre microdeleções do Y e o mosaicismo com linhagem 45,X. Há, ainda, indicações de que a instabilidade cromossômica trazida por essas deleções possa ser mais pronunciada nas gônadas. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de microdeleções do Y em indivíduos com DGP e naqueles com mosaico 45,X/46,XY ou suas variantes e diferentes fenótipos. A casuística constou de 15 indivíduos com DGP e 15 com mosaicismo, dos quais a maioria apresentava DGM (11 casos). Foram analisados 38 *sequence tagged sites* (STS) cobrindo a região específica masculina (*MSY, male specific region*) em Yp, centrômero e Yq por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) *multiplex* e individual. Todos os STS investigados nos indivíduos com DGP tiveram amplificação positiva, porém havia STS de Yq ausentes em seis indivíduos com mosaicismo e DGM, dos quais dois sem alterações estruturais de Y evidentes ao cariótipo. Essas deleções se localizavam em regiões contendo genes relacionados à espermatogênese (AZFb e AZFc - *azoospermia factor*). A ausência de deleções nos indivíduos com DGP não confirma a hipótese de que a instabilidade desse cromossomo nas gônadas seja uma das causas dessa afecção. Por outro lado, as deleções encontradas no segundo grupo indicam, em alguns casos, associação entre alterações estruturais do Y detectáveis somente a nível molecular e o surgimento de mosaicismo. Caso sejam criados no sexo masculino e busquem procedimentos de fertilização *in vitro*, há risco de que esses indivíduos transmitam cromossomos Y instáveis na divisão celular.



## Abstract

Partial and mixed gonadal dysgenesis (PGD and MGD) are characterized by genital ambiguity and the finding of either a streak gonad and a dysgenetic testis or two dysgenetic testes. In PGD there is a 46,XY karyotype, whereas in MGD there is a 45,X/46,XY mosaic or its variants (more than two lineages and/or structural abnormalities of the Y chromosome). These mosaics are also compatible with a female phenotype and Turner syndrome, ovotesticular disorder of sex development, and infertility in men with normal external genitalia. Regardless of the gonadal and genital phenotypes, these individuals present other clinical features associated with the 45,X cell line, including short stature, dysmorphism, cardiovascular and renal anomalies and various acquired diseases. During the last few years, evidences of a link between Y microdeletions and 45,X mosaicism have been reported. There are also indications that the instability caused by such deletions might be more significant in germ cells. The aim of this work was to investigate the presence of Y chromosome microdeletions in individuals with PGD and in those with 45,X/46,XY mosaicism or its variants and variable phenotypes. Our sample comprised 15 individuals with PGD and 15 with mosaicism, most of them with a MGD phenotype (n=11). Thirty-eight sequence tagged sites (STS) spanning the male specific region (MSY) on the Y chromosome (Yp, centromere and Yq) were analyzed by multiplex PCR and some individual reactions. All STS showed positive amplifications in the PGD group. Conversely, in the group with mosaicism, six individuals with MGD had been identified with Yq microdeletions, two of them did not have structural abnormalities of the Y chromosome recognized by routine cytogenetic analysis. The deleted STSs were located within AZFb and AZFc (Azoospermia Factor) regions, which harbor several genes responsible for spermatogenesis. Absence of deletions in individuals with PGD does not confirm the hypothesis that instability of the Y chromosome in the gonads could be one of the causes of such condition. However, deletions identified in the second group indicate that mosaicism may be associated with Y chromosome abnormalities detectable only at the molecular level. If patients with mosaicism and Y microdeletions reared as males decide to undergo *in vitro* fertilization, Y chromosomes which tend to be unstable during cell division may be transmitted to offspring.



# *LISTA DE ABREVIATURAS*



## Lista de Abreviaturas

**a:** anos

**AB:** abdominal

**AG:** ambiguidade genital

**AZF:** Fator de Azoospermia

**BPY2:** gene *Basic charge, Y-linked, 2*

**CBMEG:** Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

**CI:** canal inguinal

**CDY1:** gene *Chromodomain protein, Y-linked, 1*

**d:** dias

**D:** direita

**DDS:** Distúrbios da Diferenciação Sexual

**DAX1:** gene *Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region*

**DAZ1:** gene *Deleted in azoospermia 1*

**DDG:** Distúrbios da Diferenciação Gonadal

**DDS OT:** Distúrbio da Diferenciação Sexual Ovotesticular

**del:** deleção

**DGM:** Disgenesia Gonadal Mista

**DGP:** Disgenesia Gonadal Parcial

**DMRT1:** gene *Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1 and 2*

**DMRT2:** *Doublesex and mab-3 related transcription factor 2*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico



**dNTP:** Desoxirribonucleotídeos Tri-fosfatados (dCTP, dGTP, dATP, dTTP)

**E:** esquerda

**EDAS:** *Electrophoresis Documentation and Analysis System*

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético

**EIF1AY:** gene *Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked*

**F:** feminino

**FCM:** Faculdade de Ciências Médicas

**FISH:** Hibridação *in situ* por fluorescência do inglês *Fluorescence In Situ Hybridization*

**GIEDDS:** Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo

**MOS:** Mosaico, sigla do segundo grupo da casuística

**FOXL2:** gene *Forkhead Transcription Factor 2*

**FSH:** Hormônio folículo-estimulante

**GD:** gônada disgenética

**HAM:** hormônio anti-mülleriano

**HCl:** Ácido clorídrico

**hGH:** Hormônio de crescimento humano do inglês *human Growth Hormone*

**H<sub>2</sub>O:** água

**idic:** isodicêntrico

**kb:** quilobase

**LH:** Hormônio luteinizante do inglês *Luteinizing Hormone*

**LHX9:** *LIM homeobox 9*

**M:** masculino ou Molar

**m:** meses

**mar:** marcador



**MgCl<sub>2</sub>**: Cloreto de magnésio

**mL**: mililitro

**mM**: Milimolar

**NaCl**: Cloreto de sódio

**Na<sub>2</sub>EDTA**: etilenodiaminotetracético dissódico.

**NB**: não biopsiado

**NR0B1**: gene *Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*

**NR5A1**: gene *Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1*

**MSY**: *Male-specific region*

**O**: ovário

**P**: meato peniano

**PAR**: região pseudoautossômica do inglês *Pseudoautosomal region*

**pb**: pares de base

**PCR**: Reação em Cadeia da Polimerase do inglês *polymerase chain reaction*

**PE**: meato penoescrotal

**pH**: potencial hidrogeniônico

**PRY**: gene *PTPN13-like, Y-linked*

**rpm**: Rotação por minuto

**RBMY1A1**: gene *RNA binding motif protein, Y-linked, family 1, member A1*

**RPS4Y2**: gene *ribosomal protein S4, Y-linked 2*

**RSPO1**: gene *R-spondin*

**SDS**: dodecil sulfato de sódio

**SF1**: *Steroidogenic factor 1*

**SHOX**: gene *Short stature homeobox-containing*



**SLE:** saliência lábio-escrotal

**SOX9:** gene *SRY (sex determining region Y)-box 9*

**SRY:** gene *Sex-determining Region on the Y chromosome*

**ST:** Síndrome de Turner

**STS:** *Sequence tagged site*

**Taq:** *Thermus aquaticus*

**TBE:** Tris-borato de EDTA

**TCLE:** Termo de consentimento livre e esclarecido

**TD:** testículo disgenético

**TE:** Tris-HCl EDTA

**TPP:** testículo pré-puberal

**Tris-HCl:** Tris hidrocloreto

**TSPY:** gene *Testis-specific protein Y-encoded*

**TXLNG2P:** gene *Taxilin gamma 2, pseudogene*

**UNICAMP:** Universidade Estadual de Campinas

**V:** volts

**v:v:v:** volume:volume:volume

**Yp:** braço curto do cromossomo Y

**Yq:** braço longo do cromossomo Y

**KDM5D:** *Lysine (K)-specific demethylase 5D*

**WNT4:** gene *Wingless-type MMTV integration site family, member 4*

**WT-1:** gene *Wilms Tumor suppressor locus – gene 1*

**°C:** Grau Celsius

**ng:** nanograma



**nm:** nanômetro

**µg:** micrograma

**µl:** microlitro



## *LISTA DE ILUSTRAÇÕES*



## Lista de Ilustrações

### Quadros

**Quadro 1.** Classificação dos distúrbios da diferenciação do sexo proposta no consenso de Chicago.

**Quadro 2.** Dados clínicos dos indivíduos com disgenesia gonadal parcial 46,XY participantes da pesquisa.

**Quadro 3.** Dados clínicos dos indivíduos com cariótipo 45,X/46,XY ou suas variantes participantes da pesquisa.

**Quadro 4.** Soluções utilizadas na extração de DNA genômico.

**Quadro 5.** Ordem e localização dos STS ao longo do cromossomo Y, sequência dos *primers* utilizados e tamanho esperado do fragmento amplificado.

**Quadro 6.** Distribuição dos STS nos sete *mixes* utilizados na PCR multiplex e volume de cada STS utilizado nas reações.

**Quadro 7.** Concentração e volume de cada reagente utilizado na reação *multiplex*.

**Quadro 8.** Parâmetros para a PCR individual do STS DYZ3.

**Quadro 9.** Parâmetros para a PCR individual do STS *TSPY*.

**Quadro 10.** Parâmetros para a PCR individual do STS Y6HP52pr.

**Quadro 11.** Parâmetros para a PCR individual do STS Y6HP35pr.

**Quadro 12.** Parâmetros para a PCR individual do STS Y6PHc54pr.

**Quadro 13.** Parâmetros para a PCR individual dos STS sY134 e sY149.

**Quadro 14.** Parâmetros para a PCR individual dos STS sY143, sY117 e sY127.



**Quadro 15.** Parâmetros para a PCR individual dos STS sY157, sY1191 e sY153.

**Quadro 16.** Parâmetros para a PCR individual dos STS sY149 e sY134.

**Quadro 17.** Parâmetros para a PCR individual dos STS Fr15-Hpr, Y6D14pr e sY109.

**Quadro 18.** Parâmetros para a PCR individual dos STS sY3168 e sY1752.

**Quadro 19.** Parâmetros para a PCR individual do STS sY1287.

**Quadro 20.** Parâmetros para a PCR individual do STS sY105.

**Quadro 21.** Parâmetros para a PCR individual do STS sY147.

**Quadro 22.** Pacientes do grupo MOS nos quais foram encontradas microdeleções do cromossomo Y.

## **Figuras**

**Figura 1.** Esquema do cromossomo Y mostrando as regiões AZF's.

**Figura 2.** Cariótipo 46,XY normal do indivíduo número 7 do grupo DGP.

**Figura 3.** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 1 do grupo MOS.

**Figura 4.** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 2 do grupo MOS.

**Figura 5.** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 3 do grupo MOS.

**Figura 6.** Cariótipo 45,X/46,X,idi(Y) do indivíduo 5 do grupo MOS.

**Figura 7.** Cariótipo 45,X/46,X,del(Y)(q12) do indivíduo 6 do grupo MOS.

**Figura 8.** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 8 do grupo MOS.

**Figura 9.** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 9 do grupo MOS.



**Figura 10.** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 11 do grupo MOS.

**Figura 11.** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 12 do grupo MOS.

**Figura 12.** Cariótipo 45,X/46,X,+mar indivíduo 13 do grupo MOS.

**Figura 13.** Cariótipo 45,X/46,X,i(Yq)/47,X,i(Yq),i(Yq) do indivíduo 14 do grupo MOS.

**Figura 14.** Cariótipo 45,X/46,X,+mar1/46,X,+mar2/47,X,+2mar1/47,X,+mar1,+mar2 do indivíduo 15 do grupo MOS.

**Figura 15.** Classificação de Prader para os graus de ambiguidade genital.

**Figura 16.** Regiões estudadas ao longo do cromossomo Y.

**Figura 17.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 1* utilizado no estudo, a amplificação dos 7 STS presentes no *MIX 1* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo DGP.

**Figura 18.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 2* utilizado no estudo, a amplificação dos 5 STS presentes no *MIX 2* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo DGP.

**Figura 19.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 7* utilizado no estudo, a amplificação dos 5 STS presentes no *MIX 7* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo DGP.

**Figura 20.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 1* utilizado no estudo, a amplificação dos 7 STS presentes no *MIX 1* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo MOS.

**Figura 21.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 2* utilizado no estudo, a amplificação dos 5 STS presentes no *MIX 2* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo MOS.



**Figura 22.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 3* utilizado no estudo, a amplificação dos 5 STS presentes no *MIX 3* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo MOS.

**Figura 23.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 4* utilizado no estudo, a amplificação dos 5 STS presentes no *MIX 4* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo MOS.

**Figura 24.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY153, com amplificação positiva apenas para o controle masculino.

**Figura 25.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY3168, com amplificação positiva apenas para o controle masculino.

**Figura 26.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY127, com amplificação positiva apenas para o controle masculino.

**Figura 27.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY117, com fraca amplificação para o indivíduo 11 comparada ao controle masculino, a mesma estava ausente na reação Multiplex.

**Figura 28.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY134, com fraca amplificação para os indivíduos 6 e 15, a mesma estava ausente na reação Multiplex.

**Figura 29.** Descrição esquemática das microdeleções encontradas nos seis indivíduos do grupo MOS.



# ***SUMÁRIO***



## Sumário

Resumo .....	xiii
Abstract .....	xv
Lista de Abreviaturas .....	xix
Lista de Ilustrações .....	xxxi
Quadros .....	xxxi
Figuras .....	xxxiii
Sumário .....	xli
1. INTRODUÇÃO .....	47
1.1. Determinação e Diferenciação Sexual Normais .....	48
1.2. Distúrbios da Diferenciação Sexual .....	50
1.2.1. Distúrbios da Diferenciação Gonadal .....	51
1.2.1.1. Disgenesia Gonadal Parcial XY .....	53
1.2.1.2. O cariótipo 45,X/46,XY e suas variantes .....	54
1.2.1.2.1. Síndrome de Turner .....	56
1.2.1.2.2. Disgenesia Gonadal Mista .....	57
1.3. Microdeleções no cromossomo Y .....	58
2. JUSTIFICATIVA .....	65
3. OBJETIVOS .....	69
4. CASUÍSTICA .....	73
5. MÉTODOS .....	87
5.1. Obtenção das amostras de DNA .....	87
5.2. Quantificação do DNA genômico extraído .....	88
5.3. Escolha dos STS utilizados .....	89
5.4. PCR Multiplex .....	97
5.5. PCR individual .....	98
5.6. Análise dos produtos amplificados .....	106
6. RESULTADOS .....	109
6.1. Pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial 46,XY .....	109
6.2. Pacientes com mosaico 45,X/46,XY ou suas variantes .....	111
7. DISCUSSÃO .....	121



8. CONCLUSÕES .....	135
9. REFERÊNCIAS.....	139
10. ANEXOS .....	153
Anexo I. Parecer do Comitê de Ética .....	153
Anexo II. Adendo submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa .....	155
Anexo III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 1.....	156
Anexo IV. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2. ....	158



# ***INTRODUÇÃO***



## 1. INTRODUÇÃO

Nos seres humanos, o sexo de cada indivíduo depende da determinação sexual, definida no momento da fertilização pelo genótipo do zigoto, e da diferenciação sexual, que consiste na diferenciação das gônadas propriamente ditas e, a partir destas, dos genitais internos e externos. Em condições normais esses dois eventos ocorrem em harmonia e promovem o desenvolvimento sexual adequadamente, porém em algumas circunstâncias ocorrem falhas nas etapas necessárias para completar todo o processo, acarretando ausência de relação entre o sexo genético e o sexo fenotípico, além de alterações estruturais e(ou) funcionais das gônadas. Estudos histopatológicos, genéticos e mensurações hormonais permitiram identificar e classificar essas alterações, que ficaram conhecidas como Anomalias do Desenvolvimento Sexual ou Distúrbios da Diferenciação Sexual (DDS).

Os DDS referem-se ao cenário clínico que inclui desde um recém-nascido com genitália ambígua, para quem não é possível a atribuição imediata do sexo, até uma gama de condições congênitas com ampla variedade de apresentações clínicas e um vasto leque de possibilidades diagnósticas. Dentre essas encontram-se as disgenesias gonadais, incluindo a Disgenesia Gonadal Parcial (DGP), que compreende os indivíduos com cariótipo 46,XY, ambiguidade genital, testículos disgenéticos ou associação de testículo disgenético a gônada em fita e persistência de dutos Mülllerianos e que, na maioria dos casos, é de etiologia desconhecida. A DGP tem como diagnóstico diferencial a disgenesia gonadal mista (DGM), representada pelos indivíduos com ambiguidade genital associada ao cariótipo 45,X/46,XY e que apresentam as mesmas alterações gonadais da DGP. Por sua vez, o cariótipo 45,X/46,XY pode determinar, além de DGM, fenótipo feminino com síndrome de Turner (ST), ambiguidade genital com DDS ovotesticular (DDS OT anteriormente denominada hermafroditismo verdadeiro) ou fenótipo masculino com esterilidade. Independentemente do fenótipo gonadal e genital, esse mosaico costuma associar-se ainda a baixa estatura, dismorfismos, malformações e afecções adquiridas.

Estudos recentes vêm associando a presença de microdeleções do cromossomo Y ao surgimento de linhagem 45,X em indivíduos com mosaico 45,X/46,XY e diferentes fenótipos. É interessante, portanto, ampliar o conhecimento a respeito das alterações desse cromossomo para o nível molecular em indivíduos com mosaicismo. Dada a raridade dos

fenótipos associados ao mosaico 45,X/46,XY, a existência de um serviço de referência em DDS há mais de duas décadas nesta instituição trouxe a oportunidade de obter uma amostra significativa para esse estudo.

Há, ainda, evidências de que a instabilidade mitótica do cromossomo Y causada por microdeleções seja mais pronunciada nas gônadas. Assim, em vista da similaridade do fenótipo gonadal entre DGP e DGM, é oportuno verificar ainda se em indivíduos com DGP podem ser encontradas microdeleções de Y que indiquem que a instabilidade desse cromossomo na gônada embrionária seja, ao menos numa parcela dos casos, a causa da disgenesia gonadal.

### **1.1. Determinação e Diferenciação Sexual Normais**

A diferenciação sexual tem início com a formação do zigoto a partir da união de um ovócito com um espermatozóide contendo um cromossomo X ou Y. No entanto, além da presença ou ausência de genes no cromossomo Y, o sexo de um indivíduo é determinado pela interação de genes presentes nos autossomos e no cromossomo X, fatores transcricionais, hormônios e receptores hormonais [1, 2, 3].

O processo possui etapas sequenciais, sendo que o evento primordial é a especialização de gônadas inicialmente indiferenciadas, as quais, por volta da sétima semana gestacional, dirigem seu desenvolvimento no sentido masculino ou feminino [1].

Em embriões de sexo genético masculino, o gene *SRY* (*Sex-determining Region on the Y chromosome*), presente no braço curto do cromossomo Y, codifica uma proteína de 204 aminoácidos que atua como fator de regulação da transcrição. Sua expressão atinge o nível máximo por volta da sexta semana gestacional promovendo o início da diferenciação da gônada bissexual. A presença desse gene, associada à ação de outros genes envolvidos na diferenciação testicular, como *WT-1* (*Wilms Tumor suppressor locus – gene 1*), *NR5A1* (*Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1*, anteriormente denominado *SF1 - steroidogenic factor 1*) e *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*, anteriormente denominado *DAX1 - dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*), faz com que as células epiteliais se diferenciem em células de Sertoli. Estas, por sua vez, se agrupam formando cordões que englobam as

células sexuais primitivas, e se tornam, assim, em espermatogônias. Esses cordões desenvolvem-se para formar os túbulos seminíferos, e as células de Leydig, derivadas do mesênquima, podem ser observadas entre os túbulos a partir da oitava semana, atingindo um número máximo entre 14 e 18 semanas [1, 2, 3].

A partir da sétima semana, as células de Sertoli sintetizam o hormônio anti-mülleriano (HAM), que induz a regressão dos dutos de Müller, que são os primórdios da genitália interna feminina. Em seguida, a testosterona produzida pelas células de Leydig induz a diferenciação dos dutos de Wolff (primórdios da genitália interna masculina) em epididímos, canais deferentes, vesículas seminais e dutos ejaculatórios. A virilização dos genitais externos ocorre entre a nona e a décima segunda semana de gestação em resposta à diidrotestosterona, resultado da ação da enzima  $5\alpha$ -redutase tipo 2 sobre a testosterona. Tanto a testosterona quanto a diidrotestosterona atuam nas células-alvo por meio do receptor de andrógenos [1, 3].

Em embriões de sexo genético feminino, a diferenciação sexual inicia-se por volta da décima semana gestacional com a diferenciação ovariana, caracterizada pela diferenciação das células mesenquimatosas em células foliculares, que envolvem as células germinativas primordiais, as quais se tornam as ovogônias, que dão origem aos ovócitos primários. O processo de divisão da meiose é interrompido na meiose I na décima primeira semana até o início do ciclo ovulatório na idade adulta [1, 3].

Na ausência de HAM, os dutos de Müller se desenvolvem para formar o trato genital feminino. Por sua vez, a ausência de andrógenos impede a diferenciação dos dutos de Wolff, que persistem como vestígios embrionários. Finalmente, na ausência da diidrotestosterona, os rudimentos genitais externos dão origem à genitália externa feminina [1, 2, 3].

A gonadogênese feminina parece depender não só da ausência de expressão do gene *SRY*, mas também da presença de expressão de genes como *NROB1*, *WNT4* (*Wingless-type MMTV integration site family, member 4*), *FOXL2* (*Forkhead Transcription Factor*) e *RSPO1* (*R-spondin*) [4]. Além disso, é fundamental a presença de dois cromossomos X íntegros, uma vez que o cromossomo X contém várias regiões necessárias para a manutenção ovariana [1, 2, 3].

A última fase desses processos, após a determinação do sexo genético, a diferenciação das gônadas em testículos ou em ovários e o desenvolvimento de genitais internos e externos masculinos ou femininos, é a diferenciação sexual secundária dependente da produção hormonal a partir da adolescência para finalizar o fenótipo característico dos dois sexos [3].

## **1.2. Distúrbios da Diferenciação Sexual**

A congruência entre o sexo genético e o sexo aparente depende da sincronia e do perfeito funcionamento dos processos citados anteriormente, de modo que alterações em qualquer uma das etapas podem acarretar na presença de gônadas estruturalmente anômalas e(ou) anomalias nos genitais internos e(ou) externos [5].

Condições em que a anatomia dos genitais não possibilita a definição do sexo de um indivíduo foram designadas por muitos anos pelo termo intersexo. Devido à estigmatização sofrida pelos portadores desses distúrbios e à confusão causada por diferentes classificações existentes, novas terminologias têm sido discutidas [6, 7]. Em 2005, no *Chicago Consensus on Management of Intersex Disorders* foram propostas novas nomenclaturas para essas condições [8, 9].

Assim, a palavra intersexo foi substituída pelo termo Distúrbio da Diferenciação Sexual, referindo-se à condição congênita onde não existe concordância entre os vários sexos do indivíduo, ou seja, sexo genético, gonadal e genital [8, 9]. A inclusão da palavra congênita no conceito exclui as variantes enumeradas como causas de puberdade precoce ou tardia. O termo hermafroditismo foi substituído por DDS ovotesticular e os pseudo-hermafroditismos masculino e feminino por DDS 46,XY e DDS 46,XX, respectivamente. Nessa mesma reunião de consenso foi proposto que a classificação dessas condições seja baseada no tipo de gônada e no componente cromossômico (Quadro 1).

**Quadro 1** – Classificação dos distúrbios da diferenciação do sexo proposta no consenso de Chicago (adaptada de Hughes *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006).

<b>DDS com anomalias de cromossomos sexuais</b>	<b>DDS 46,XY</b>	<b>DDS 46,XX</b>
<b>Distúrbios da diferenciação gonadal:</b> <b>45,X</b> (síndrome de Turner e variantes); <b>47,XXY</b> (síndrome de Klinefelter e variantes); <b>45,X/46,XY</b> (disgenesia gonadal mista, DDS ovotesticular#); <b>46,XX/46,XY</b> (DDS ovotesticular# por quimerismo)	<b>Distúrbios da diferenciação gonadal (testicular):</b> disgenesia gonadal pura (Swyer syndrome), disgenesia gonadal parcial, regressão testicular, DDS ovotesticular#	<b>Distúrbios da diferenciação gonadal (ovariana):</b> disgenesia gonadal pura, DDS testicular*, DDS ovotesticular#
	<b>Distúrbios da síntese ou ação dos hormônios testiculares:</b> defeitos de síntese de andrógenos (ex.: deficiência de 17-hydroxiesteróide desidrogenase, deficiência de 5 $\alpha$ -redutase 2), síndromes de insensibilidade a andrógenos, defeitos no receptor de LH/hCG, deficiência de HAM e defeitos do receptor de HAM (síndrome de persistência dos dutos de Müller)	<b>Excesso de andrógenos:</b> fetais (ex.: deficiência de 21-hidroxilase), fetoplacentários (ex.: deficiência de aromatase), maternos (ex.: luteoma, exógenos)
	<b>Outros:</b> ex.: extrofia da cloaca	<b>Outros:</b> ex.: associação MURCS, extrofia da cloaca

\* nomenclatura proposta para homem XX; # nomenclatura proposta para hermafroditismo  
 HAM= hormônio anti-mülleriano; DDS= distúrbio da diferenciação sexual; MURCS= aplasia dos dutos de Müller, aplasia renal e displasia de somitos cervicotorácicos

### 1.2.1. Distúrbios da Diferenciação Gonadal

Como pode ser visto no Quadro 1, distúrbios da diferenciação gonadal (DDG) podem ser encontrados tanto em indivíduos com anomalias de cromossomos sexuais quanto naqueles com constituição cromossômica normal, 46,XX ou 46,XY. Entre eles está o DDS ovotesticular (DDS OT), caracterizado pela presença de tecido ovariano (com folículos) e

testicular (com túbulos seminíferos) no mesmo indivíduo, em gônadas separadas ou na mesma gônada (que recebe o nome de ovotestis). Há, ainda, várias condições que cursam com a presença de gônadas disgenéticas, testículos rudimentares ou disgenéticos, ou ambos [8, 9].

Entende-se por *gônada disgenética* (em fita ou *streak*) aquela constituída somente por tecido fibroso, sem função hormonal ou capacidade de produção de gametas, e sem estruturas que permitam caracterizá-la como testículo ou ovário. Clinicamente, ao lado de uma gônada disgenética são encontrados derivados dos dutos de Muller (genitais internos femininos) e não há desenvolvimento de genitais internos masculinos. Quando presentes bilateralmente são observados níveis elevados de gonadotrofinas (hormônio folículo-estimulante, FSH e hormônio luteinizante, LH) nos primeiros meses de vida e a partir do início da adolescência, indicando o hipogonadismo primário (de origem gonadal) [10].

O *testículo rudimentar ou disgenético*, por sua vez, é caracterizado histologicamente por anomalias tubulares e intersticiais em graus variáveis, associadas a fibrose e hialinização. Os achados histológicos variam desde gônadas com predomínio de tecido fibroso e poucas estruturas tubulares até alterações leves, como diminuição do diâmetro tubular médio, do número de células germinativas e do número de células de Sertoli e de Leydig. Nesse último caso, o diagnóstico histopatológico depende de estudos morfométricos específicos que não costumam ser realizados rotineiramente, de modo que esses espécimes frequentemente recebem o laudo de “testículo pré-puberal” [10].

Clinicamente, testículos disgenéticos se apresentam com anomalias na regressão mülleriana, na diferenciação dos dutos de Wolff e na virilização da genitália externa, indicando função deficiente das células de Leydig e de Sertoli [11]. Nos primeiros meses de vida e a partir do início da adolescência associam-se a níveis elevados de gonadotrofinas, principalmente o FSH, refletindo a disfunção dos túbulos seminíferos e células de Sertoli. Testículos disgenéticos associados ou não a gônada disgenética são encontrados na DGP, incluída entre os DDS 46,XY, e na DGM, associada a anomalia de cromossomos sexuais (cariótipo 45,X/46,XY).

### 1.2.1.1. Disgenesia Gonadal Parcial XY

A DGP é definida pela presença do cariótipo 46,XY, sem mosaïcismo, em indivíduos com genitália ambígua decorrente de diferenciação testicular parcial e sem sinais clínicos da síndrome de Turner [10, 11, 12]. Histologicamente podem ser encontrados diferentes graus de diferenciação testicular, que pode variar desde um testículo quase “normal” até uma gônada quase caracterizada como “em fita”. Em todos os casos há alguma alteração no diâmetro médio dos túbulos seminíferos (hipoplasia tubular leve, marcante ou grave) e também algum grau de redução do Índice de Fertilidade Tubular, que é uma estimativa da média do número de células germinativas por corte tubular (hipoplasia germinal leve, marcante ou grave) [11]. Esses testículos disgenéticos podem ser encontrados bilateralmente ou estarem associados a gônadas disgenéticas (*streaks*) [13].

O risco de surgimento de neoplasias nas gônadas disgenéticas (gonadoblastoma e disgerminoma) é de 15% a 35% e, por esse motivo, sua retirada profilática está indicada, bem como a de testículos acentuadamente disgenéticos que não possam ser levados à bolsa escrotal nos pacientes criados no sexo masculino [14, 10].

A genitália interna consiste de uma combinação de derivados dos dutos de Wolff e de Muller, e há ambigüidade genital externa em graus variáveis, dependendo da extensão do desenvolvimento testicular, podendo ser encontrados desde indivíduos com genitais externos quase femininos (clitoromegalia discreta e(ou) leve fusão labial posterior) e queixa de amenorréia primária até aqueles com genitália masculina normal e história de esterilidade [10, 12].

O sexo de criação depende do grau de virilização dos genitais externos e da presença ou não de testículos com boa produção hormonal localizados nas saliências lábio-escrotais, espontaneamente ou por orquidopexia [12]. Nos indivíduos criados no sexo feminino, o tratamento consiste de gonadectomia bilateral, genitoplastia feminizante e reposição hormonal feminina iniciada na adolescência. Quando a criação é no sexo masculino, deve ser feita a retirada de gônada disgenética e(ou) testículo acentuadamente disgenético, seguida de genitoplastia masculinizante. Caso ambas as gônadas precisem ser retiradas, deve-se iniciar reposição hormonal masculina na adolescência e inserir próteses testiculares; nos casos em que um ou ambos os testículos forem mantidos, é fundamental

acompanhar o desenvolvimento puberal e instituir reposição de andrógenos se for necessário [11,10].

Apesar de ter sido considerada inicialmente por alguns autores uma variante da disgenesia gonadal pura XY, geralmente não se encontram mutações no gene *SRY* nesses pacientes, nem em outros vários genes sabidamente participantes da diferenciação gonadal, como *WT1*, *SOX9* (*SRY (sex determining region Y)-box 9*) e *LHX9* (*LIM homeobox 9*) [15, 16, 17, 18, 19]. Nos últimos anos foram descritas mutações tanto em heterozigose quanto em homozigose no gene *NR5A1* em alguns indivíduos com DGP [20, 21].

Alguns quadros sindrômicos podem apresentar características gonadais e genitais semelhantes às da DGP, como a síndrome de Denys-Drash, decorrente de mutações no gene *WT1*, a displasia camptomélica, na qual são encontradas mutações no gene *SOX9*, e a monossomia da região 9p24.3, na qual se encontram os genes *DMRT1* (*doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) e *DMRT2* (*doublesex and mab-3 related transcription factor 2*). Nessas situações, porém, há outras anomalias congênitas que permitem o diagnóstico diferencial (tumor de Wilms e nefropatia; displasia óssea; e retardamento mental associado a anomalias congênitas múltiplas, respectivamente) [1, 2, 12].

### **1.2.1.2. O cariótipo 45,X/46,XY e suas variantes**

O cariótipo em mosaico 45,X/46,XY (ou suas variantes com mais de duas linhagens celulares e(ou) alterações estruturais do cromossomo Y) é detectado em 0,7 a 1,7 de cada 10.000 recém nascidos [22, 23]. Define-se mosaicismo como a presença de duas ou mais linhagens celulares em um mesmo indivíduo, que ocorre por falhas nas primeiras divisões mitóticas do embrião. A falta de disjunção do cromossomo Y ou sua perda durante a anáfase mitótica induz o aparecimento de duas ou mais linhagens cromossômicas, como 45,X/46,XY, 45,X/47,XYY e 45,X/46,XY/47,XYY, sendo que em células 47,XYY o cromossomo Y adicional pode ainda se perder durante as divisões celulares subsequentes. Esse tipo de alteração surge *de novo* e sua causa é desconhecida na maioria das vezes, mas sabe-se que pode ser induzida por anomalias estruturais do Y, que acarretam instabilidade desse cromossomo nas divisões celulares [24, 25, 23].

Os rearranjos estruturais do cromossomo Y associados à instabilidade cromossômica incluem deleções, cromossomos em anel e isocromossomos monocêntricos e dicêntricos de braço curto e de braço longo. As deleções do braço curto do cromossomo Y, especialmente aquelas que incluem a região do gene *SRY*, afetam diretamente a diferenciação das gônadas embrionárias, já que essa região é responsável por induzir a formação de testículos e, na sua ausência, formam-se gônadas em fita. Já as deleções que envolvem o braço longo do cromossomo, particularmente na região Yq11 onde se localizam as regiões conhecidas como Fator de Azoospermia (AZF, subdivididas em AZFa, AZFb e AZFc), estão diretamente associadas com infertilidade [24].

Outra alteração estrutural instável é o cromossomo Y em anel, formado pela quebra das regiões terminais e subsequente união dessas regiões. Essas estruturas circulares são facilmente perdidas nas divisões celulares, pois trocas entre cromátides irmãs podem dar origem a um único anel dicêntrico ou a dois anéis interligados durante o processo de divisão. A correlação clínica vai depender da extensão dos fragmentos perdidos e da possibilidade de formação de linhagens 45,X. Em relação ao isocromossomo, este se caracteriza pela duplicação de um braço e ausência do outro; as consequências clínicas relacionadas a esse rearranjo vão depender das regiões ausentes e duplicadas. Caso o isocromossomo seja dicêntrico, a instabilidade cromossômica é ainda mais alta e, portanto, é mais provável o surgimento de linhagens com monossomia do cromossomo sexual [24, 25].

O cariótipo 45,X/46,XY e suas variantes, com e sem alterações estruturais evidentes do cromossomo Y, estão associados a grande diversidade fenotípica, que é fortemente influenciada pela distribuição das linhagens com e sem Y nas gônadas durante o desenvolvimento embrionário [26, 27]. De fato, essas anomalias cromossômicas parecem ser incompatíveis com uma histologia gonadal normal [28, 22]. Assim, do ponto de vista clínico, podem ser encontrados quatro diferentes fenótipos [29, 30, 31]:

- o de ST, com gônadas disgenéticas e genitais internos e externos femininos;
- o de DGM, com testículo disgenético associado a gônada disgenética contralateral ou testículos disgenéticos bilateralmente e diversos graus de ambiguidade genital interna e externa;

- o de DDS OT, com tecido testicular e ovariano e diversos graus de ambiguidade genital interna e externa;

- e o de esterilidade masculina por azoospermia ou oligospermia grave, com genitais externos masculinos típicos ou eventualmente alterações discretas como hipospadia distal ou criptorquidia.

Indivíduos com DGM, DDS OT e genitais masculinos com esterilidade podem apresentar sinais clínicos característicos da ST, como baixa estatura, dismorfismos, malformações e afecções adquiridas. A seguir serão detalhados os quadros clínicos da ST e da DGM.

#### **1.2.1.2.1. Síndrome de Turner**

A ST resulta da presença de um cromossomo X e da ausência total ou parcial do segundo cromossomo sexual, e sua prevalência é de 1:2.000 meninas recém-nascidas. A monossomia do X está presente em cerca de 50% dos casos, 20% a 30% apresentam mosaicismo sem alterações estruturais, e o restante compreende uma ampla variedade de anomalias estruturais dos cromossomos X ou Y, com ou sem mosaicismo com linhagem 45,X. Cerca de 6% das pacientes com síndrome de Turner têm cromossomo Y em seu material genético, seja ele íntegro ou apresentando alterações estruturais [32, 33, 34, 35].

O fenótipo clínico compreende baixa estatura, hipogonadismo primário (com falta de desenvolvimento puberal e esterilidade na maioria dos casos), diversos dismorfismos (fenótipo extremamente variável, que inclui baixa implantação dos cabelos na nuca, pavilhões auriculares inclinados para trás, pregas epicânticas, micrognatia, palato ogival, pescoço alado, peito escavado, hipoplasia de IV metacarpos, cúbito valgo, linfedema de mãos e pés, nevos pigmentados e unhas hiperconvexas, entre outros), anomalias cardíacas, renais e de vias urinárias e patologias adquiridas, como hipoacusia e tireoidite auto-imune [36, 35, 37, 38].

As anomalias cardiovasculares (como válvula aórtica bicúspide e coarctação da aorta) estão presentes em 20% a 30% dos casos, e as anomalias renais e de vias urinárias, (como duplicação do sistema pielocalicial, hidronefrose e rim em ferradura) em 30% a 40% [39]; juntamente com o hipotireoidismo auto-imune (cerca de 24%) [40], são as

características de maior repercussão clínica, que demandam cuidados especiais para diagnóstico e terapêutica.

A etiologia da baixa estatura ainda não está bem esclarecida, mas resulta de uma combinação de fatores, como deficiência estrogênica, displasia esquelética e a própria aneuploidia. A haploinsuficiência do gene *SHOX* (*Short stature homeobox-containing gene*), localizado em Xp22, na região pseudoautosômica [41], responde pela maior parte da deficiência de crescimento e é também responsável por várias das anomalias esqueléticas que podem estar presentes nessas pacientes [42, 43].

A presença de sequências do cromossomo Y em pacientes com ST está relacionada ao risco aumentado de desenvolvimento de gonadoblastomas nas gônadas disgenéticas. Esses tumores são compostos por células indiferenciadas e, em 60% dos casos, podem dar origem a tumores invasivos, os disgerminomas [43]. O gene *TSPY* (*testis-specific protein Y-encoded*), localizado no braço curto do cromossomo Y, é um gene candidato a estar relacionado ao desenvolvimento do gonadoblastoma [32, 44, 43, 45]. Tanto o gonadoblastoma como o carcinoma *in situ* se desenvolvem na maioria dos casos em mulheres com cariótipo 45,X/46,XY, sendo por isso indicada a gonadectomia profilática.

#### **1.2.1.2.2. Disgenesia Gonadal Mista**

O termo disgenesia gonadal mista inclui um grupo heterogêneo de anomalias gonadais, cromossômicas e fenotípicas associada ao cariótipo 45,X/46,XY e suas variantes [46, 47]. Indivíduos com DGM apresentam genitália ambígua em graus variados e assimetria gonadal, com testículo disgenético associado a gônada em fita contralateral ou dois testículos disgenéticos, frequentemente com persistência de derivados Mülllerianos. Devido à semelhança do fenótipo genital e gonadal com a DGP, esta condição deve ser considerada como diagnóstico diferencial [48, 49, 47, 50].

Nas gônadas, quanto maior a proporção de células 45,X maior o grau de disgenesia testicular; por outro lado, quando a linhagem celular 46,XY é predominante, é mais provável a existência de testículos funcionais, com secreção de testosterona e graus variáveis de virilização [26, 27, 51]. O risco de malignização das gônadas em indivíduos

45,X/46,XY é descrito como de 10% a 15%; no entanto, esse risco parece ser mais pronunciado em tecidos pouco diferenciados [42, 22].

Johansen e colaboradores recentemente demonstraram que o uso de um escore de masculinização externa, utilizando como parâmetros a posição do meato uretral, presença de micropênis e grau de fusão escrotal, pode ter valor prognóstico em relação à função testicular e à ocorrência de puberdade espontânea, uma vez que esta ocorreu com maior frequência em indivíduos com escore elevado [22]. Por outro lado, uma revisão publicada por Martinerie e colaboradores mostrou que indivíduos com genitália ambígua e cariótipo 45,X/46,XY criados no sexo masculino necessitam posteriormente de terapia hormonal, mesmo tendo apresentado puberdade espontânea [22, 23].

Como já foi visto, indivíduos com DGM podem apresentar, como consequência da linhagem celular 45,X, os mesmos sinais clínicos observados na ST (baixa estatura, dismorfismos, malformações e patologias adquiridas), também com grande variabilidade de expressão fenotípica. A baixa estatura está presente na maioria dos indivíduos com DGM. Assim, estes também podem se beneficiar com o tratamento com hormônio de crescimento (hGH), sendo os melhores resultados alcançados quando a terapia se inicia antes dos 14 anos de idade [42]. No entanto, há divergência na literatura sobre os resultados do tratamento e ainda não está esclarecido se o risco de malignização das gônadas pode aumentar com administração do hGH [22, 42].

A definição do sexo de criação depende de diversos fatores, como o grau de virilização da genitália externa, a idade do diagnóstico, o potencial de fertilidade, a anatomia da gônada e o sexo genético [52]. No caso dos portadores de DGM, o potencial de fertilidade é incerto e a definição do sexo deve ser individualizada [22].

### **1.3. Microdeleções no cromossomo Y**

Um cromossomo Y íntegro é crucial para o processo de determinação e diferenciação sexual adequado, bem como para o desempenho normal das funções gonadais. Com o advento de novas técnicas citogenéticas e moleculares, as anomalias do cromossomo Y estão sendo identificadas e associadas com diferentes fenótipos clínicos [53, 30].

Como já foi mencionado anteriormente, há ampla diversidade de aberrações estruturais do cromossomo Y, como cromossomos em anel, deleções, translocações e isocromossomos. A visualização de deleções na análise citogenética depende do tamanho do segmento cromossômico envolvido, uma vez que estas variam desde seqüências citologicamente detectáveis que abrangem todo o braço longo do cromossomo Y até microdeleções envolvendo somente uma única seqüência de DNA conhecida (STS, ou *sequence tagged site*) [31, 30]. O efeito fenotípico de uma deleção dependerá do tamanho do fragmento e da quantidade de material genético perdido [54].

A pesquisa de microdeleções do Y costuma ser realizada em casos de esterilidade conjugal, que afeta de 15% a 20% de todos os casais em idade reprodutiva e é de origem masculina em aproximadamente metade dos casos. A perda de seqüências do cromossomo Y pode determinar azoospermia ou oligospermia grave [55, 56] e é relativamente frequente nesses casos (15%) [57].

Estudos de deleções por técnicas citogenéticas e moleculares em homens com azoospermia e oligospermia sugeriram a existência de um Fator de Azoospermia (AZF) localizado nos intervalos 5 e 6 do cromossomo Y, coincidindo com três regiões funcionais associadas à insuficiência da espermatogênese [55] (Figura 1). Geralmente, deleções em Yq12 não estão associadas com infertilidade devido ao fato de essas perdas estarem limitadas à heterocromatina; no entanto, deleções envolvendo a região Yq11 estão intimamente ligadas à azoospermia ou oligospermia grave por envolverem a região AZF [54].

Assim, a identificação de microdeleções no cromossomo Y é importante para definir a etiologia da falência da espermatogênese em homens com cariótipo masculino normal. No entanto, a investigação realizada na rotina médica não abrange todo o cromossomo, cuja avaliação detalhada requereria mais de 120 STSs [30, 58].



**Figura 1:** Esquema do cromossomo Y mostrando as regiões AZF's. Adaptado de Poongothai *et al.*, 2009 [88].

Os genes presentes nas regiões AZF são, portanto, de alta relevância no sexo masculino. Microdeleções nas regiões AZFa, AZFb, AZFc têm sido associadas a aplasia de células germinativas, parada de maturação e hipoespermatogênese, respectivamente [59]. Assim, outras linhas de investigação relacionadas a microdeleções do cromossomo Y passaram a ser desenvolvidas. Um exemplo disso é um estudo publicado em 2012 no qual o material genético de 180 meninos com criptorquidia foi analisado por meio da técnica de PCR *Multiplex*; nesse estudo não se encontrou associação entre microdeleções em Yq11 e falha na descida do testículo para a bolsa escrotal [60].

Outra linha de investigação que vem sendo seguida é a da associação entre microdeleções do Y e anomalias de cromossomos sexuais, já que tem sido demonstrado que microdeleções do cromossomo Y podem ser deletérias por propiciar a perda desse cromossomo na divisão celular gerando mosaicismo.

Como já mencionado, aberrações estruturais do cromossomo Y visíveis por técnicas citogenéticas convencionais estão associadas, em sua maioria, a uma linhagem celular 45,X como consequência da instabilidade cromossômica causada pela alteração na sua

morfologia, originando uma variedade de fenótipos [30, 31]. Em estudo realizado por Patsalis *et al.* (2005) com 17 pacientes com uma linhagem 45,X e outra com cromossomo Y estruturalmente normal ou anômalo foi encontrada alta frequência de deleções na região AZF mesmo em cromossomos aparentemente normais no exame de cariótipo, indicando que a instabilidade desses cromossomos na mitose possa ser decorrente das deleções. Dos 17 pacientes, 13 tinham ST, em dois o quadro era de DGM e em outros dois a queixa era esterilidade [31].

Microdeleções de Y também foram encontradas em uma amostra de 14 homens com quadro de oligospermia grave ou azoospermia analisados por Siffroi *et al.* (2000). Destes, seis apresentavam mosaicismos 45,X/46,XY e os demais cariótipo 46,XY (quatro azoospermicos e quatro oligospermicos). Esses autores observaram que nos indivíduos com cariótipo 46,XY aparentemente homogêneo as microdeleções no braço longo desse cromossomo estavam associadas a mosaicismos com linhagem 45,X tanto em células somáticas quanto em células germinativas. De fato, a hibridação *in situ* por fluorescência (*FISH*) com sondas centroméricas de X e Y mostrou, no grupo de homens 46,XY, um percentual de células 45,X em linfócitos significativamente superior ao observado em controles normais (em média 4,1% e 0,34%, respectivamente); além disso, a aplicação da técnica de *FISH* em amostras do esperma de três dos quatro homens oligospermicos revelou proporções significativamente elevadas de células com perda do cromossomo Y (15,1%, 17,7% e 18,7%, contra 0,2% nos controles) [30].

De acordo com Siffroi *et al.* (2000), a maior proporção de espermatozoides com nulissomia de cromossomos sexuais que de linfócitos 45,X detectada por *FISH* sugere que a instabilidade cromossômica causada por essas microdeleções, que acabam levando à perda do cromossomo inteiro em algumas populações celulares, seja mais pronunciada em células germinativas que em células somáticas [30].



## ***JUSTIFICATIVA***



## 2. JUSTIFICATIVA

Como mencionado anteriormente, alguns estudos publicados nos últimos anos mostraram associação entre a presença de microdeleções no cromossomo Y e o surgimento de linhagem 45,X tanto em indivíduos com ST e genitais femininos quanto naqueles com DGM e ambiguidade genital ou mesmo homens inférteis com genitália masculina normal. Esses estudos indicam ainda que essa instabilidade cromossômica possa ser mais pronunciada nas gônadas. Devido a esses fatos e à similaridade entre o fenótipo gonadal e genital da DGP e da DGM, seria relevante verificar se em indivíduos com DGP podem ser encontradas microdeleções de Y que tenham determinado instabilidade desse cromossomo na gônada embrionária, já que nenhum estudo, até o presente momento, foi realizado com esse intuito. Além disso, considerando a raridade da DGM e da ST com linhagem 46,XY, a pesquisa de microdeleções também nesses casos pode contribuir para o estudo da associação entre essas alterações estruturais do Y e o surgimento de mosaïcismo.



## ***OBJETIVOS***



### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral:**

Investigar a presença de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos com distúrbios da diferenciação gonadal e linhagem 46,XY.

#### **Específicos:**

- a) Investigar a presença de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos com disgenesia gonadal parcial 46,XY.
- b) Investigar a presença de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos com diagnóstico prévio de mosaicismo 45,X/46,XY ou suas variantes e diferentes fenótipos.



## ***CASUÍSTICA***



## 4. CASUÍSTICA

A casuística foi composta por 30 indivíduos, subdivididos em dois grupos de acordo com o diagnóstico clínico e o cariótipo previamente obtidos (cariótipo com bandamento G e resolução de 300 a 500 bandas). O número de 30 indivíduos deve-se a raridade das afecções investigadas, e de ser este o número aproximado de pacientes que ainda estavam em acompanhamento no Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) no período do desenvolvimento do trabalho. No primeiro grupo (denominado DGP) foram incluídos 15 pacientes com cariótipo 46,XY e diagnóstico de DGP.

Foram critérios de inclusão para compor o grupo DGP a presença de genitália ambígua (hipospádia associada ou não a criptorquidia; meato uretral balânico com criptorquidia bilateral), ausência de sinais clínicos da ST e uma das seguintes características:

a) resultado de biópsias gonadais mostrando:

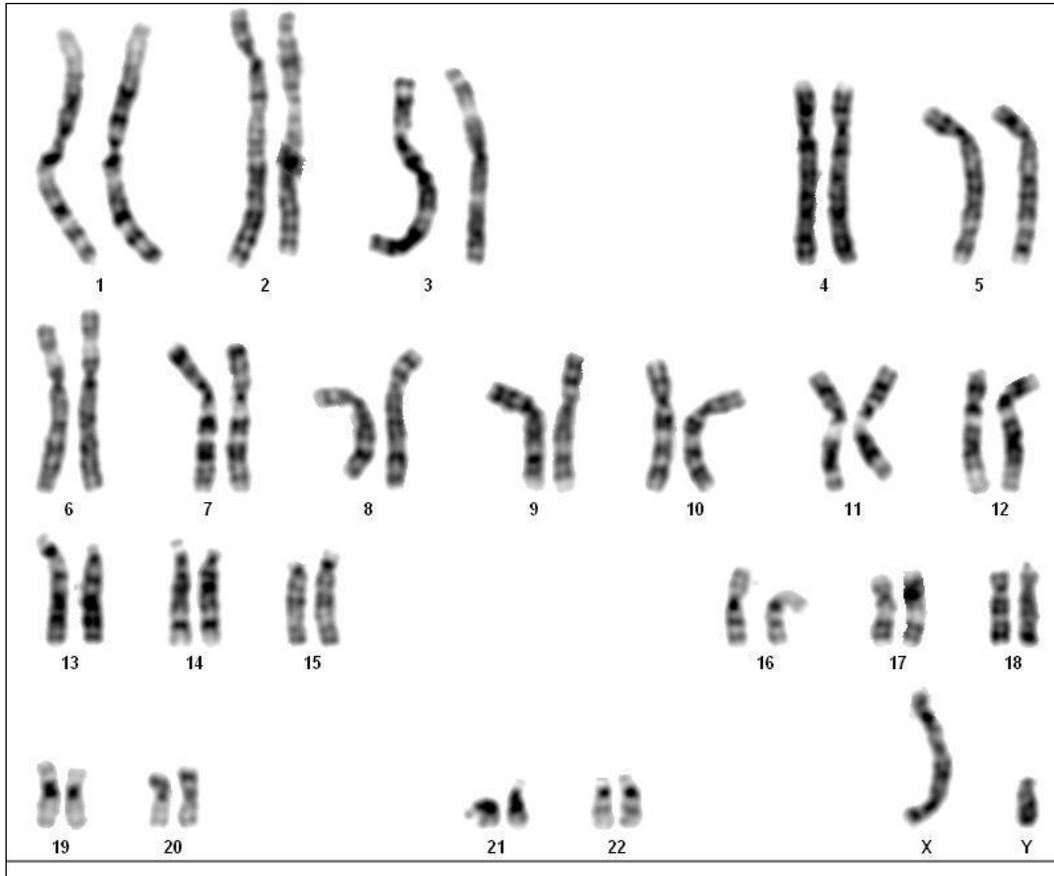
a.1) gônada disgenética associada a testículo disgenético;

a.2) dois testículos disgenéticos ou;

a.3) uma gônada disgenética ou testículo disgenético associado a gônada contralateral com laudo histológico de "testículo pré-puberal" (sem disgenesia evidente ao exame histológico convencional, no qual não são realizados exames morfométricos) ou não biopsiada durante o ato cirúrgico por apresentar características macroscópicas de testículo normal;

b) caso ambas as gônadas não tivessem sido biopsiadas, evidências hormonais de disfunção congênita de túbulos seminíferos e células de Sertoli (níveis elevados de FSH desde os primeiros meses de vida).

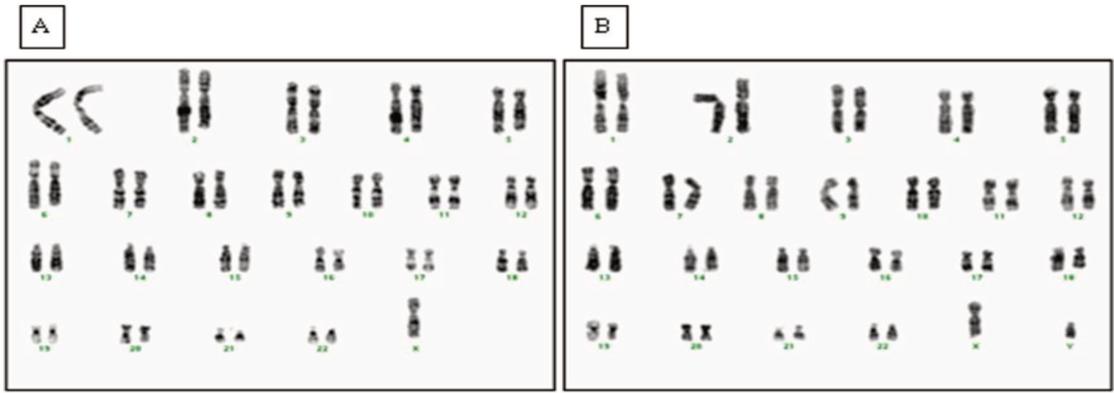
Na Figura 2 encontra-se o cariótipo 46,XY normal de um desses pacientes.



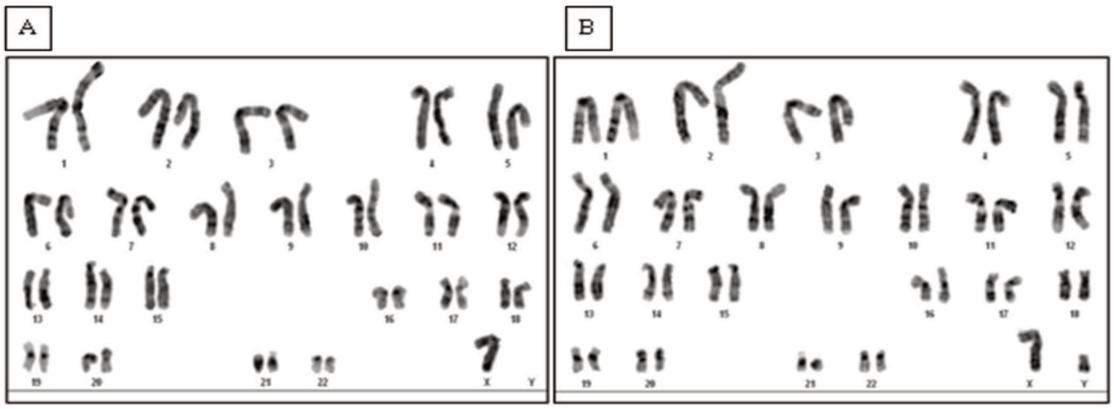
**Figura 2:** Cariótipo 46,XY normal do indivíduo número 7 do grupo DGP.

No segundo grupo (denominados MOS) foram incluídos 15 pacientes com diversos tipos de mosaico, sendo uma linhagem 45,X e uma ou mais linhagens adicionais contendo cromossomo Y, íntegro ou estruturalmente anômalo. Nesse segundo grupo, 11 pacientes tinham diagnóstico de DGM, um de ST, um de DDS OT, um apresentava genitais masculinos típicos e um último tinha ambiguidade genital com gônadas em saliências lábio-escrotais que ainda não haviam sido biopsiadas, não permitindo, portanto, a diferenciação histológica entre DGM e DDS ovário-testicular.

Os cariótipos de 12 dos 15 pacientes desse segundo grupo puderam ser obtidos no Laboratório de Citogenética Humana da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e encontram-se nas Figuras 3 a 14.



**Figura 3:** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 1 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,XY.



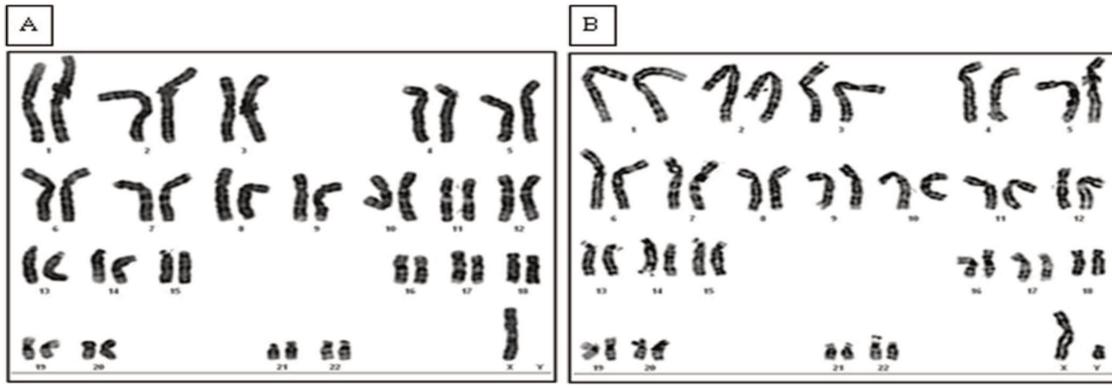
**Figura 4:** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 2 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,XY.



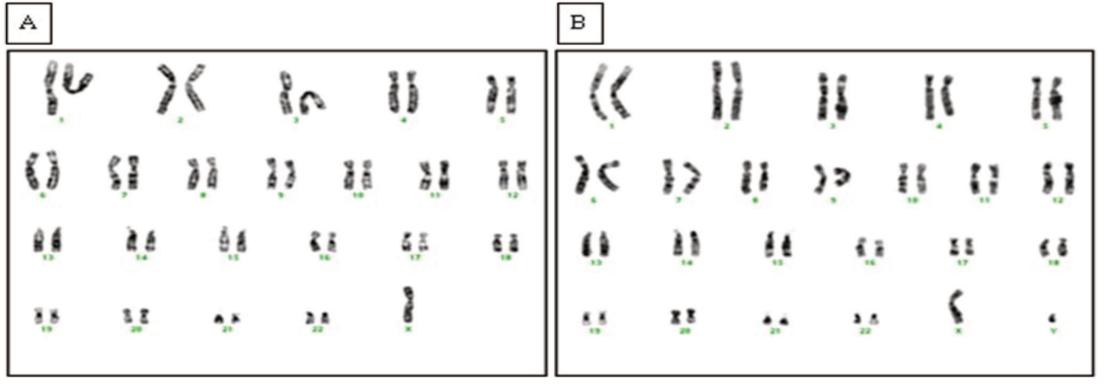
**Figura 5:** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 3 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,XY.



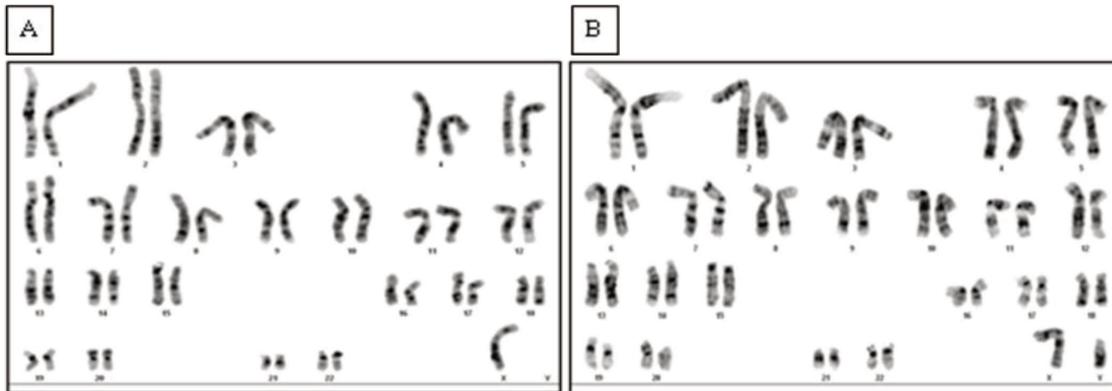
**Figura 6:** Cariótipo 45,X/46,X,idel(Y)(q10) do indivíduo 5 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,X,idel(Y).



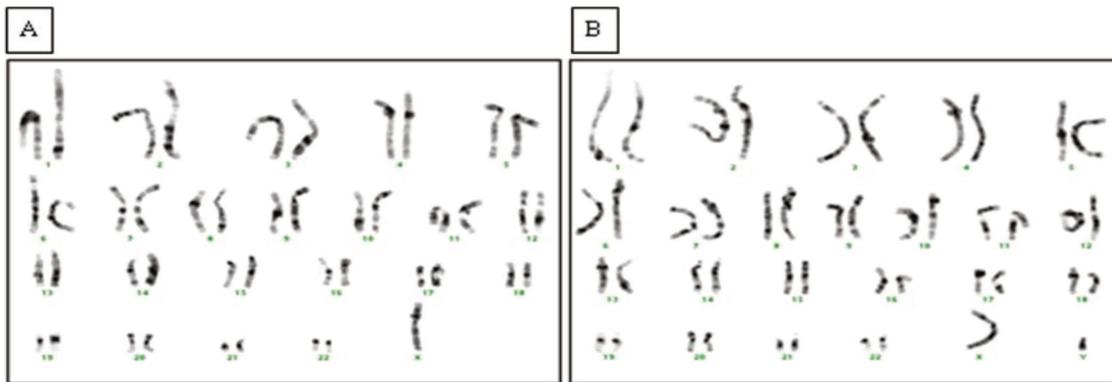
**Figura 7:** Cariótipo 45,X/46,X,del(Y)(q12) do indivíduo 6 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,X,del(Y)(q12).



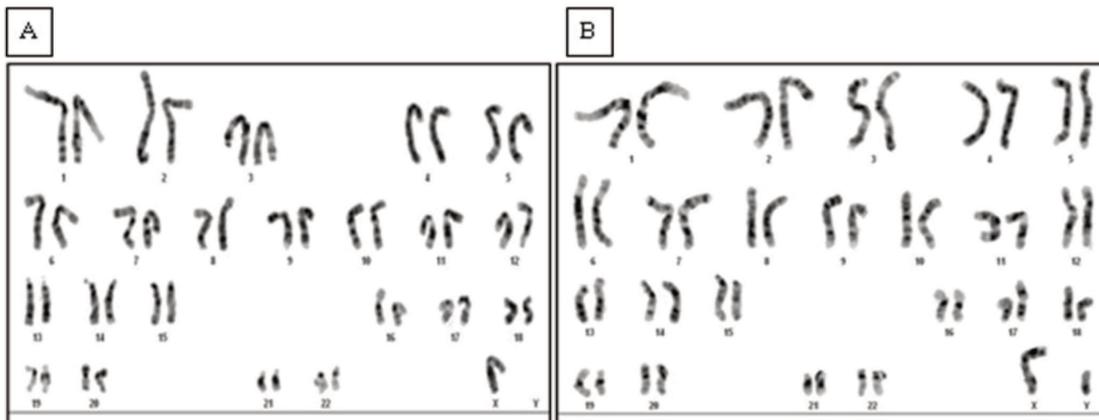
**Figura 8:** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 8 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,XY.



**Figura 9:** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 9 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,XY.



**Figura 10:** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 11 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,XY.



**Figura 11:** Cariótipo 45,X/46,XY do indivíduo 12 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,XY.



**Figura 12:** Cariótipo 45,X/46,X,+mar do indivíduo 13 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,X,+mar.



**Figura 13:** Cariótipo 45,X/46,X,i(Y)(q10)/47,X,i(Y)(q10),i(Y)(q10) do indivíduo 14 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,X,i(Y)(q10). C: Linhagem 47,X,i(Y)(q10),i(Y)(q10).

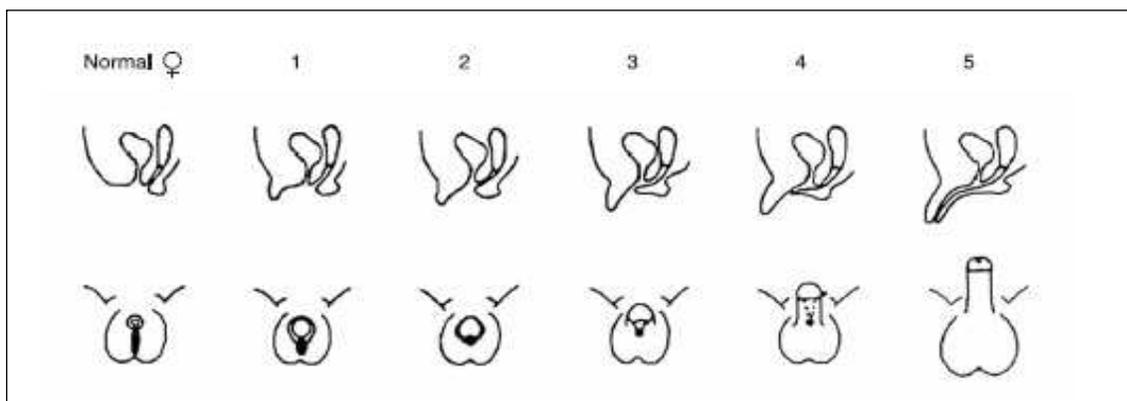


**Figura 14:** Cariótipo 45,X/46,X,+mar1/46,X,+mar2/47,X,+2mar1/47,X,+mar1,+mar2 do indivíduo 15 do grupo MOS. A: Linhagem 45,X. B: Linhagem 46,X,+mar1. C: Linhagem 46,X,+mar2. D: Linhagem 47,X,+2mar1. E: Linhagem 47,X,+mar1,+mar2.

Foi critério de inclusão para compor o grupo MOS o exame de cariótipo demonstrando a presença de mosaicismo, sendo uma linhagem 45,X e uma ou mais linhagens adicionais contendo cromossomo Y, íntegro ou estruturalmente anômalo,

independentemente do fenótipo. Em alguns casos em que o cariótipo mostrava inicialmente cromossomo marcador, a comprovação de que este era derivado do cromossomo Y foi feita previamente por meio da demonstração da presença de sequências específicas do cromossomo Y em exame molecular.

Do prontuário dos indivíduos dos dois grupos selecionados para compor a casuística foram obtidos os seguintes dados para caracterização da amostra: idade atual, idade por ocasião da primeira consulta, sexo social definitivo, recorrência familiar de ambiguidade genital, grau de virilização ao nascer de acordo com Prader (1954) [61] (Figura 15) e descrição das gônadas (tipo, localização). Embora a classificação de Prader tenha sido desenvolvida para descrever indivíduos de sexo genético feminino com diversos graus de virilização causada por hiperplasia congênita das adrenais, tem a vantagem de evocar claramente os achados relativos aos genitais externos e ser amplamente conhecida pelos profissionais que lidam com DDS. Os dados obtidos estão apresentados nos Quadros 2 e 3.



**Figura 15:** Classificação de Prader para os graus de ambiguidade genital. Grau 1: genitália de aspecto feminino, com aumento do falo somente; Grau 2: maior aumento do falo, associado a fusão posterior das saliências labioescrotales, com orifícios uretral e vaginal distintos; Grau 3: aumento acentuado do falo, associado a fusão quase completa das saliências labioescrotales, e presença de seio urogenital com abertura perineal; Grau 4: falo de aspecto peniano, associado a fusão completa das saliências labioescrotales e abertura uretral localizada entre a base do falo e o sulco balano-prepucial; Grau 5: falo de aspecto peniano bem desenvolvido, associado a fusão completa das saliências labioescrotales e abertura uretral balânica. (Fonte: Prof. Dr. Gil Guerra Júnior, Depto. de Pediatria, FCM, UNICAMP.)

**Quadro 2.** Dados clínicos dos indivíduos com disgenesia gonadal parcial 46,XY participantes da pesquisa.

Paciente	Sexo Social	Idade na coleta	Idade na 1a consulta	Recorrência de AG	Grau de virilização ao nascer <sup>1</sup>	Gônada D (localização, tipo)	Gônada E (localização, tipo)
1	M	14a	14d	N	4 (PE)	SLE, TD	SLE, GD
2	M	20a	8m	N	3	SLE, TD	SLE, TD
3	F	4a	2m20d	N	5	A, TD	CI, TD
4	F	16a	5d	N	3	AB, TD	AB, GD
5	M	9a2m	22d	N	5	CI, NB <sup>2</sup>	CI, NB <sup>2</sup>
6	M	25a	4m	S	3	SLE, TD	SLE, TD
7	F	19a	17a	N	3	A, TD	A, TD
8	M	15a	8m	N	5	AB, GD	AB, TD
9	M	23a	1m20d	N	4	SLE, NB	CI, TD
10	M	2a6m	2a1m	N	4 (PE)	SLE, TPP	AB, GD
11	F	12a9m	1a3m	N	4 (PE)	AB, TD	AB, GD
12	M	17a	6m	S	4	CI, GD	CI, TD
13	M	4a10m	6m	N	3	SLE, TPP	AB, TD
14	F	18a	1m14d	N	2	AB, TD	AB, GD
15	M	12a	12a	N	4	SLE, TD	SLE, TD

a= anos; AB= abdominal; AG= ambiguidade genital; CI= canal inguinal; d= dias; D= direita; E= esquerda; F= feminino; GD= gônada disgenética; m= meses; M= masculino; NB= não biopsiado; PE= meato penoescrotal; SLE= saliência lábio-escrotal; TD= testículo disgenético; TPP= testículo pré-puberal  
<sup>1</sup>de acordo com Prader; <sup>2</sup>FSH elevado desde o período neonatal e mantido durante a infância confirma disgenesia testicular

**Quadro 3.** Dados clínicos dos indivíduos com cariótipo 45,X/46,XY ou suas variantes participantes da pesquisa.

Paciente	Cariótipo	Fenótipo	Sexo social	Idade na coleta	Idade na 1ª consulta	Recorrência de AG	Grau de virilização ao nascer <sup>1</sup>	Gônada D (localização, tipo)	Gônada E (localização, tipo)
1	45,X/46,XY	DGM	F	5a	26d	N	3	CI, TD	CI, TD
2	45,X/46,XY	DGM	F	23a	4m	N	2	SLE, TPP	AB, GD
3	45,X/46,XY	DGM	F	20a	3m	N	3	CI, TPP	CI, GD
4	45,X/46,XY	DGM	M	10a	1a9m	N	4 (P)	SLE, TPP	AB, GD
5	45,X/46,X,idi(Y)(q10)	DGM? DDS OT?	M	1a6m	1a6m	N	4 (PE)	SLE, NB	SLE, NB
6	45,X/46,X,del(Y)(q12)	DGM	M	19a	15a	N	3 ou 4 <sup>2</sup>	SLE, TD	AB, GD
7	45,X/46,XY	M	M	1a8m	1a8m	N	5	AB, NB <sup>3</sup>	AB, NB <sup>3</sup>
8	45,X/46,XY	DGM	M	7a6m	3a9m	N	3	AB, GD	SLE, TPP
9	45,X/46,XY	ST	F	6a3m	6a3m	-	-	AB, GD	AB, GD
10	45,X/46,X,+mar (Y+) <sup>4</sup>	DGM	F	5a6m	3m15d	N	4 (PE)	SLE, TPP	AB, GD
11	45,X/46,XY	DGM	M	3a1m	1m11d	N	4 (PE)	CI, GD	SLE, TPP
12	45,X/46,XY	DDS OT	M	1m28d	3d	N	3	SLE, TPP	AB, O
13	45,X/46,X,+mar (Y+) <sup>4</sup>	DGM	M	17a	16a	N	3	SLE, NB <sup>3</sup>	AB, GD
14	45,X/46,X,i(Y)(q10)/ 47,X,i(Y)(q10),i(Y)(q10)	DGM	F	1a6m	11d	N	4 (PE)	SLE, TPP	AB, GD
15	45,X/46,X,+mar1/46,X,+mar2/ 47,X,+2mar1/47,X,+mar1,+mar2 (Y+) <sup>4</sup>	DGM	F	2m	24d	N	3	SLE, TPP	CI, GD

a= anos; AB= abdominal; AG= ambiguidade genital; CI= canal inguinal; d= dias; del= deleção; D= direita; DDS OT= distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular; DGM= disgenesia gonadal mista; E= esquerda; F= feminino; GD= gônada disgenética; m= meses; i= isocromossomo; M= masculino; mar= marcador; NB= não biopsiado; O= ovário; P= meato peniano; PE= meato penoescrotal; SLE= saliência lábio-escrotal; ST= síndrome de Turner; TD= testículo disgenético; TPP= laudo anátomo-patológico de "testículo pré-puberal". <sup>1</sup>de acordo com Prader; <sup>2</sup>paciente operado previamente; <sup>3</sup>características macroscópicas de testículo; <sup>4</sup>presença de sequências específicas de Y indicaram ser o marcador originário desse cromossomo.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, sob o nº. 1065/2010 em 26/10/2010, conforme Anexo I. Para a inclusão dos indivíduos do grupo MOS no estudo, foi submetido junto ao CEP um adendo ao projeto, conforme Anexo II. O convite para participação no projeto foi feito para as famílias e indivíduos atendidos no ambulatório do GIEDDS do Hospital das Clínicas – UNICAMP. Após a anuência do participante ou de seu responsável, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo III e IV).



## ***MÉTODOS***



## 5. MÉTODOS

Neste estudo a pesquisa de microdeleções do cromossomo Y foi feita por meio das técnicas moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e PCR *Multiplex*, realizadas no laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), da UNICAMP.

### 5.1. Obtenção das amostras de DNA

Foram coletados de 10 a 15 mL de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1 mL do anticoagulante etilenediaminotetracetato dissódico 2H<sub>2</sub>O (EDTA) 0,5 M pH 8,0. Para obtenção das amostras de DNA genômico foi empregado o método do fenol-clorofórmio, por lise com Proteinase K (*Boehringer Mannheim*, Germany), proposto por Araújo, em 1996 [62] e padronizado no laboratório de Genética Molecular Humana – CBMEG. O protocolo detalhado encontra-se descrito a seguir.

- Para a lise das hemácias foi adicionada solução A (Quadro 4) ao sangue coletado até completar o volume de 50 mL (adiciona-se de 30 a 40 mL da solução A), permanecendo o homogeneizado no gelo por 30 minutos;
- Centrifugou-se a 2.000 rpm (rotação por minuto) por 10 minutos a 4°C;
- O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) ressuscitado em 20 mL de solução A. Esta operação foi repetida até o *pellet* ficar livre de hemácias lisadas;
- O *pellet* então foi ressuscitado em solução B (Quadro 4) diluída em 1x;
- Acrescentaram-se 250 µL de solução C (Quadro 4) recém-preparada, contendo proteinase K;
- O *pellet* com as soluções permaneceu incubado à 37°C por aproximadamente 18 horas;
- Para extração de DNA dos leucócitos foram adicionados 1,25 mL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0;
- Homogeneizou-se a mistura por inversão lenta do tubo durante 5 minutos;

- Para separação e recuperação da fase aquosa (superior) o tubo foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente;
- Acrescentou-se à fase aquosa igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0; após leve agitação por 5 minutos, o tubo foi novamente centrifugado;
- O procedimento foi repetido com solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v) e por último clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v);
- Para precipitação do DNA, acrescentou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado;
- O DNA precipitado foi então recuperado com auxílio de uma haste de plástico esterilizada e lavado com etanol 70%, para retirada do excesso de sal, antes de ser ressuspensionado em TE 1x (200 a 500 µl).

**Quadro 4:** Soluções utilizadas na extração de DNA genômico.

<b>Solução A</b>	<b>Conc. final</b>	<b>Solução B (estoque 2x)</b>	<b>Conc. final</b>	<b>Solução C</b>	<b>Conc. final</b>
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA	20 mM	Solução B	0,5x
Sacarose	0,32 M	NaCl	20 mM	SDS	5%
Tris-HCl pH 8,0	10 mM	Tris-HCl pH 8,0	20 mM	Proteinase K	1 mg/mL
Triton X-100	1%				

Conc.= concentração. MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio. NaCl: Cloreto de sódio. SDS: dodecil sulfato de sódio. Na<sub>2</sub>EDTA: etilenodiaminotetracético dissódico. Tris-HCl: Tris hidrocloreto.

## 5.2. Quantificação do DNA genômico extraído

A quantificação do DNA extraído foi obtida por leitura de absorbância óptica a 260 nm em espectrofotômetro *Nanodrop 8000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Como amostra referência (branco) foi utilizado TE 1x para calibrar o aparelho. Foram utilizados em geral 2 a 3 µL do DNA genômico com concentrações entre 200 e 500 ng/µl para a PCR Multiplex.

A verificação da integridade do DNA genômico extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Invitrogen, EUA) em Tris-borato EDTA 1x (TBE), preparado segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) [63].

A amostra foi aplicada no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 50% glicose) na razão 6:1. As condições de eletroforese variaram entre 90 a 110 V. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA *ladder* de 1 kb, 1 kb plus ou 100 pb (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), em concentração de 0,15 µg/µl. O gel foi imerso em solução diluída de brometo de etídio (0,5 µl/mL de água destilada) durante 15 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado, utilizando uma câmera digital acoplada a um computador (*Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System – EDAS*, Kodak Digital Science, Estados Unidos).

### 5.3. Escolha dos STS utilizados

Foram investigados 38 STS localizados na região eucromática específica do sexo masculino (braço curto - Yp, centrômero e braço longo - Yq), representados na Figura 16 e descritos no Quadro 5 juntamente com a sequência de cada *primer* e o tamanho esperado do fragmento amplificado.

Os primeiros STS testados no estudo foram selecionados a partir do trabalho realizado por Henegariu *et al.* em 1994 [64] para diagnóstico de deleções na região AZF em homens com esterilidade idiopática. Naquele trabalho, 27 pares de *primers* foram subdivididos em cinco combinações de mixes para a PCR Multiplex, sendo que os produtos amplificados no mix deveriam possuir pelo menos 18 a 20 pares de bases de diferença de tamanho entre eles, possibilitando uma clara separação no gel de agarose 3%. Cada mix continha um par de *primers* de uma região proximal e outra distal de Yq11, funcionando como um controle interno em caso de grandes deleções. Esses pares de *primers* já haviam sido padronizados anteriormente no laboratório para a PCR Multiplex.

Em um segundo momento, foram incluídos no trabalho mais 11 STS, os quais foram selecionados da base de dados *MSY Breakpoint Mapper* (<http://breakpointmapper.wi.mit.edu/>) [65]. Os pares de *primers* foram selecionados de acordo com o conteúdo de CG (aproximadamente 50%), o tamanho da fita de cada *primer* (18-25 pares de bases) e a menor quantidade de estruturas secundárias formadas entre os pares de *primers*; para essa análise foi utilizado o programa *Gene Runner*. Além disso, teve-se o cuidado de selecionar *primers* que amplificassem regiões próximas a genes

presentes no cromossomo Y. Esses STS foram distribuídos em dois mixes, de acordo com o tamanho dos produtos amplificados para uma adequada visualização no gel de agarose.

No total, foram distribuídos 33 pares de *primers* em sete *mixes* (Quadro 6). Os cinco STS que não apresentaram amplificação dentro de *mixes* preparados para PCR multiplex foram padronizados separadamente: DYZ3, TSPY, Y6H35pr, Y6HPc54pr e Y6HP52pr. Os *primers* foram diluídos em água desionizada e autoclavada para uma solução estoque de 100 pmol/μl, e posteriormente diluídos a uma concentração de 20 pmol/μl para uma solução de uso, utilizada nas reações. O volume utilizado de cada *primer* para compor seu respectivo *mix* também encontra-se no Quadro 6.



**Quadro 5:** Ordem e localização dos STS ao longo do cromossomo Y, sequência dos *primers* utilizados e tamanho esperado do fragmento amplificado

STS	Lócus	Ordem no cromossomo	Localização	Região cromossômica	Primer <i>sense</i>	Primer <i>antisense</i>	Tamanho do fragmento (pb)
sY14	SRY	1	2715341-2715810	p11.31	GAATATTCCCGCTCTCCGGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	472
sY1301	BV703591	2	2881785-2882279	p11.31	GTCTTGTTGCAGCCCATGT	CAAAGGGAGAATAGCAGGC	495
Amely-3	BV678972	3	6737830-6738427	p11.2	GGTGGGAGAAGGATGTTGTT	AGTCAATCCGAATGGTCAGG	598
sY3218	BV704083	4	7234129-7234319	p11.2	CTTTTTCGTTGGAGTCTCGC	GCAAACCCCGTCTCTACAA	191
sY1059	G66106		7561835 – 7562133	q11.223	GATCATTCTCAAGGGGCTCA	TTGTTGTTGTTGTCATTGTGG	299
TSPY	NG022996	5	9236076-9307357	p11.2	CGATAGGCCTCCACTTCATA	GATGACATAATGGCGGAG	1300
DYZ3	-	-	-	Centromérica	ACACATCACAAAGAACTATG	TGAAAACACTACACAGNAAGCTG	1100
sY81	DYS271	6	12606410-12606618	q11.1	AGGCACTGGTCAGAATGAAG	AATGGAAAATACAGCTCCCC	209
sY82	DYS272	7	12838080-12838343	q11.1	ATCCTGCCCTTCTGAATCTC	CAGTGTCCACTGATGGATGA	264
Y6HP35pr	DYS274	8	ND	-	GGTACACACTCCATCCTGGAC	CTACAGGCTACCTTTTAGGTGG	226
sY86	DYS148	9	13117503-13117820	q11.1	GTGACACACAGACTATGCTTC	ACACACAGAGCGACAACCCT	320

STS	Lócus	Ordem no cromossomo	Localização	Região cromossômica	Primer <i>sense</i>	Primer <i>antisense</i>	Tamanho do fragmento (pb)
sY84	DYS273	10	13299428-13299753	q11.1	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	GCCTACTACCTGGAGGCTTC	326
sY609	G65840	11	13488371-13488514	q11.21	CATAGCCCAGAGCAATCCAT	TAGGCATAGGAAGTGGCTGG	144
sY88	DYS276	12	14113358-14113480	q11.21	TTGTAATCCAAATACATGGGC	CACCCAGCCATTTGTTTTAC	123
sY94	DYS279	13	14790821-14790970	q11.21	TCATGACAGCCAGGGTATTT	TTTGGACATAGTTTTTTGGTCC	150
sY95	DYS280	14	15053332-15053634	q11.21	TCCTACAGATGTCCAAAGTGC	GATGAGTGACCCCAGAATTG	303
sY182	KAL-Y	15	15980790-15980914	q11.221	TCAGAAGTGAAACCCTGTATG	GCATGTGACTCAAAGTATAAGC	125
sY97	DYS281	16	16263633-16263736	q11.221	AACTTCATCAGTGTTACATCAAGG	TGTGGCATTTTGTTATGTGG	104
sY151	KAL-Y	17	16020619-16020801	q11.221	AAATCTGTAGTCTCATATCAATCTG	TTACTTGATTTAGCAATAAAAAGG	183
sY102	DYS198	18	17080238-17080455	q11.221	CACTACCACATTTCTGGTTGG	CGCTGAGTCCATTCTTTGAG	218
sY105	DYS201	19	17866681-17866981	q11.221	AAGGGCTTCTTCTCTTGCTT	AGGGAGCTTAAACTCACCGT	301
sY109	DYF43S1	20	18527152-18527384	q11.221	AGGAGATGTCAGGACTATCAGC	TCCATCCAGCTGGTCATATT	233
Y6D14pr	DYS205	21	ND	-	GGCTAGGTGCCAGCAAGTAGATCA	GTTCTCTTCCCCTGCATCAAG	134
sY117	DS209	22	19171254-19171515	q11.221	GTTGGTTCATGCTCCATAC	CAGGGAGAGAGCCTTTTACC	262

STS	Locus	Ordem no cromossomo	Localização	Região cromossômica	Primer <i>sense</i>	Primer <i>antisense</i>	Tamanho do fragmento (pb)
Y6PHc54pr	ND	23	ND	-	GCAGAAGAGTTCAGC	GTGGAGTGCTGCATTAAAGG	166
sY1287	G75509	24	19491288-19491607	q11.221	GCAACATAGATGGACCCAGAA	ATAGCAAAGAGCCTCCCAGA	320
sY1752	BV682283	25	20229909-20230117	q11.222	TCAGTGTGTCACCAAGCAGG	GAGGCAAGTGGACCATCTGT	209
sY127	DYS218	26	20979804-20980078	q11.222	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	274
sY134	DYS224	27	21965448-21965750	q11.222	GTCTGCCTCACCATAAAACG	ACCACTGCCAAAACCTTTCAAA	301
sY143	DYS231	28	22387291-22387601	q11.223	GCAGGATGAGAAGCAGGTAG	CCGTGTGCTGGAGACTAATC	311
sY1059	G66106	29	22822646-22822944; 23252550-23252848	q11.223	GATCATTCTCAAGGGGCTCA	TTGTTGTTGTTGTCATTGTGG	299
sY153	DYS237	30	23422032-23422170	q11.223	GCATCCTCATTTTATGTCCA	CAACCCAAAAGCACTGAGTA	139
sY149	DYS1	31	23725053-23725184	q11.223	TGTCACACTGCCCTAATCCT	TGGTCATGACAAAAGACGAA	132
sY147	DYS232	32	23882766-23882865	q11.223	TTTCTCGTTTGATGATCCTAG	TTAATATGAGAATGAGAACAGATGT	100
Fr15-Hpr	ND	33	ND	-	TACCTTGTTTTGCACCAGACGC	CACCCTCTGTATATGACCTGGC	313
Y6HP52pr	DYS239	34	ND	-	GGAAGTGGCAGGATTAGCTTC	GCTCAGAATCTGCGATCAG	258
sY1059	G66106	29	24054410-24054708	q11.223	GATCATTCTCAAGGGGCTCA	TTGTTGTTGTTGTCATTGTGG	299
sY157	DYS240	35	24284845-24285134	q11.223	CTTAGGAAAAAGTGAAGCCG	CCTGCTGTCAGCAAGATACA	285

<b>STS</b>	<b>Locus</b>	<b>Ordem no cromossomo</b>	<b>Localização</b>	<b>Região cromossômica</b>	<b>Primer <i>sense</i></b>	<b>Primer <i>antisense</i></b>	<b>Tamanho do fragmento (pb)</b>
sY1191	G73809	36	24875620-24876004	q11.23	CCAGACGTTCTACCCTTTCG	GAGCCGAGATCCAGTTACCA	385
sY1059	G66106	29	26726968-26727266	q11.223	GATCATTCTCAAGGGGCTCA	TTGTTGTTGTTGTCATTGTGG	299
sY3168	BV704033	37	28761338-28761820	q11.23	GCACCACTGTACTGAAGCATG	TCCCAGCTCACATTGATGATTA	483

**Quadro 6:** Distribuição dos STS nos sete *mixes* utilizados na PCR multiplex e volume de cada STS utilizado nas reações.

MIX 1	Volume (µL)	MIX 2	Volume (µL)	MIX 3	Volume (µL)	MIX 4	Volume (µL)	MIX 5	Volume (µL)	MIX 6	Volume (µL)	MIX 7	Volume (µL)
sY84	0,6	sY143	1,0	sY86	0,4	sY14	1,1	Fr15-Hpr	1,2	sY1301	0,7	Amely 3	0,8
sY134	1,5	sY157	0,5	sY105	0,4	sY95	0,8	Y6D14pr	0,8	sY1287	0,5	sY3168	0,5
sY117	0,4	sY81	0,5	sY82	0,5	sY127	1,5			sY1752	0,5	sY1191	0,5
sY102	0,35	sY182	1,2	sY153	1,2	sY109	0,8			sY609	0,5	sY1059	0,5
sY151	2,0	sY147	2,2	sY97	1,0	sY149	0,8					sY3218	0,8
sY94	1,0												
sY88	1,2												

#### 5.4. PCR Multiplex

A reação em cadeia da polimerase *multiplex* é uma variante da técnica de PCR, em que duas ou mais sequências alvo são amplificadas por dois ou mais pares de *primers* em uma mesma reação. As reações de PCR *multiplex* utilizadas no estudo foram baseadas no protocolo proposto por Henegariu *et al.* (1994) [64], e padronizado no laboratório de Genética Molecular Humana para o mapeamento do cromossomo Y. Como controle positivo foi utilizado DNA de homens normais com cariótipo 46,XY e genitália normal. Como controle negativo utilizou-se amostra de DNA genômico de mulheres normais 46,XX e genitália feminina normal.

As reações foram padronizadas para 26  $\mu\text{L}$  de volume final, contendo 10X PCR *buffer* (Invitrogen, EUA), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen, EUA), 1.25 mM dNTP (desoxirribonucleotídeos Tri-fosfatados - Invitrogen, EUA), DMSO (Dimetilsulfóxido) e 0,5 U Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase (Invitrogen, EUA) com 200 a 500 ng de DNA genômico. No Quadro 7 estão descritas as concentrações e a quantidade de cada reagente utilizado para cada mix.

**Quadro 7:** Concentração e volume de cada reagente utilizado na reação *multiplex*.

<b>Mixes 1, 2, 3, 4, 6 e 7.</b>	<b>Mix 5</b>
H <sub>2</sub> O – 5 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O – 6,95 $\mu\text{L}$
PCR <i>buffer</i> 10X - 4,95 $\mu\text{L}$	PCR <i>buffer</i> 10X – 5 $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$ 1,5 mM - 1 $\mu\text{L}$	$\text{MgCl}_2$ 1,5 mM - 1 $\mu\text{L}$
dNTP 1,25 mM – 5 $\mu\text{L}$	dNTP 1,25 mM – 2,2 $\mu\text{L}$
Mix de <i>primers</i> – 5 $\mu\text{L}$	Mix de <i>primers</i> – 5 $\mu\text{L}$
DMSO - 1,2 $\mu\text{L}$	DMSO - 1,2 $\mu\text{L}$
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,8 $\mu\text{L}$	Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,6 $\mu\text{L}$
DNA genômico (200 – 500 ng/ $\mu\text{L}$ ) – 3 $\mu\text{L}$	DNA genômico (200 – 500 ng/ $\mu\text{L}$ ) – 2 $\mu\text{L}$

As condições para termociclagem foram as mesmas para os sete *mixes*: utilizou-se uma pré-desnaturação por 5 minutos a 94°C, uma desnaturação por 30 segundos a 94°C (passo 1), 45 segundos de anelamento a 58°C (passo 2), 2 minutos de extensão a 62°C (passo 3), e uma etapa de extensão final a 65°C por 5 minutos. Os passos enumerados de 1 a 3 foram repetidos por 45 vezes, sendo que o termociclador foi programado para se manter a 4°C por tempo infinito após a etapa de extensão final. Utilizou-se o termociclador *GeneAmp PCR System 9700 - Applied Biosystem*.

## 5.5. PCR individual

Os cinco STS que não foram analisados em testes multiplex, por não apresentarem amplificação nas condições padronizadas, foram testados individualmente. Para tanto, utilizou-se a técnica de PCR convencional, onde apenas uma sequência alvo é amplificada. A técnica também foi utilizada para a confirmação das deleções que surgiram na PCR *multiplex*, eliminando-se a possibilidade de que a ausência de amplificação se devesse a algum fator da reação; essa etapa de confirmação foi realizada por duas vezes.

Para cada STS testado individualmente foi padronizada uma nova reação com volume final aproximado de 25 µL. Nos Quadros 8 a 12 estão representados os parâmetros para amplificação dos cinco STS testados individualmente, e nos Quadros 13 a 21 os parâmetros referentes àqueles para os quais havia evidências de microdeleções na reação *multiplex*.

Assim como nas reações *multiplex*, nas reações individuais também se utilizou DNA genômico masculino como controle positivo e DNA genômico feminino como controle negativo. Para evitar falsas amplificações por contaminação, foi utilizado em cada reação um tubo com uma reação em branco, sem amostra de DNA molde para a amplificação.

**Quadro 8.** Parâmetros para a PCR individual do STS DYZ3.

<b>DYZ3</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 15,8 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10× – 2 µL	94°C / 1 minuto
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 0,5 µL	57°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 0,7 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 0,7 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,2 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 0,8 µL	

**Quadro 9.** Parâmetros para a PCR individual do STS TSPY.

<b>TSPY</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 22,5 µL	95°C / 5 minutos
PCR buffer 10× – 2,5 µL	95°C / 1 minuto
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 0,8 µL	56°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1,5 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 1 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 1 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,2 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 0,8 µL	

**Quadro 10.** Parâmetros para a PCR individual do STS Y6HP52pr.

<b>Y6HP52pr</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 17,3 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10× – 2,5 µL	94°C / 30 segundos
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 1 µL	56°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1,5 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 1 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 1 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DMSO – 1 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 11.** Parâmetros para a PCR individual do STS Y6HP35pr.

<b>Y6HP35pr</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 16,6 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10× – 2,5 µL	94°C / 30 segundos
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 0,5 µL	56°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1,5 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 0,7 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 0,7 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DMSO – 1,2 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 12.** Parâmetros para a PCR individual do STS Y6PHc54pr.

<b>Y6PHc54pr</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 16 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10×– 2,5 µL	94°C / 30 segundos
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 0,7 µL	57°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1,5 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 1 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 1 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DMSO – 1 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 13.** Parâmetros para a PCR individual dos STS´s sY134 e sY149.

<b>sY134 - sY149</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 17,8 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10×– 2,5 µL	94°C / 1 minuto
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 1 µL	55°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 0,7 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 0,7 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 14.** Parâmetros para a PCR individual dos STS's sY143, sY117 e sY127.

<b>sY143 - sY127</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 17,8 µL	94°C / 10 minutos
PCR buffer 10× – 2,5 µL	94°C / 30 segundos
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 1 µL	57°C / 45 segundos
dNTP 1,25 mM – 1 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 0,7 µL	72°C / 10 minutos
Primer antisense – 0,7 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 15.** Parâmetros para a PCR individual dos STS's sY157, sY1191 e sY153.

<b>sY157 - sY1191 - sY153</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 17,5 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10× – 2,5 µL	94°C / 45 segundos
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 1,5 µL	58°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1,2 µL	72°C / 1 minuto e 15 segundos
Primer sense – 1 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 1 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 16.** Parâmetros para a PCR individual dos STS's sY149 e sY134.

<b>sY149 - sY134</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 17,8 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10×– 2,5 µL	94°C / 1 minuto
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 1 µL	55°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 0,7 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 0,7 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 17.** Parâmetros para a PCR individual dos STS's Fr15-Hpr, Y6D14pr e sY109.

<b>Fr15-Hpr - Y6D14pr – sY109</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 17,8 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10×– 2,5 µL	94°C / 1 minuto
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 1 µL	57°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 0,7 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 0,7 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 0,1 µL	

**Quadro 18.** Parâmetros para a PCR individual dos STS's sY3168 e sY1752.

<b>sY3168 - sY1752</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 17 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10×– 2,5 µL	94°C / 45 segundos
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 0,8 µL	58°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1 µL	72°C / 1 minuto e 20 segundos
Primer sense – 0,7 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 0,7 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DMSO – 1 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 19.** Parâmetros para a PCR individual do STS sY1287.

<b>sY1287</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 18,1 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10× – 3 µL	94°C / 45 segundos
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 1 µL	58°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 0,7 µL	72°C / 1 minuto e 20 segundos
Primer sense – 0,5 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 0,5 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,2 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 20.** Parâmetros para a PCR individual do STS sY105.

<b>sY105</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 17,7 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10×– 2,5 µL	94°C / 45 segundos
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 1 µL	58°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 0,8 µL	72°C / 1 minuto e 20 segundos
Primer sense – 1 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 1 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

**Quadro 21.** Parâmetros para a PCR individual do STS sY147.

<b>sY147</b>	
<b>Reagentes (Concentração e Volume)</b>	<b>Termociclagem (30 ciclos)</b>
H <sub>2</sub> O – 18,5 µL	94°C / 5 minutos
PCR buffer 10×– 2,5 µL	94°C / 1 minuto
MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM - 0,7 µL	58°C / 1 minuto
dNTP 1,25 mM – 1 µL	72°C / 1 minuto
Primer sense – 0,5 µL	72°C / 5 minutos
Primer antisense – 0,5 µL	4°C / infinito
Taq DNA polimerase 0,5 U - 0,3 µL	
DNA genômico (50 – 500 ng/µL) – 1 µL	

## 5.6. Análise dos produtos amplificados

Para a análise dos produtos pela PCR Multiplex, o material amplificado foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 3% (Invitrogen, EUA) em solução tampão TBE 1×; para a PCR convencional, foi utilizado gel de agarose 1% (Invitrogen, EUA). As amostras foram aplicadas no gel juntamente com solução 0,25% de azul de bromofenol; 50% glicose na razão 6:1. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA *ladder* de 1 kb (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) em concentração de 0,15 µg/µL. O gel foi submetido a uma corrente elétrica constante de 120 V, por um período de 2 horas e 30 minutos para aqueles com amostras das reações *multiplex*, e por um período de 40 a 50 minutos para as reações individuais.

Os géis foram corados com brometo de etídio; para isso, os mesmos foram imersos em solução diluída de brometo de etídio (0,5 µL/mL de água destilada) durante 15 a 20 minutos, sendo visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotografados com uma câmera digital acoplada a um computador (*Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System – EDAS*, Kodak Digital Science, Estados Unidos).

Para a análise dos resultados identificou-se a presença ou ausência e o tamanho específico dos produtos da PCR no gel de eletroforese. Nos casos em que não houve amplificação de um fragmento em uma reação *multiplex*, este foi testado novamente em uma segunda reação. Caso persistisse a não amplificação, buscou-se a confirmação por uma PCR isolada do fragmento, também realizada duas vezes.

## ***RESULTADOS***

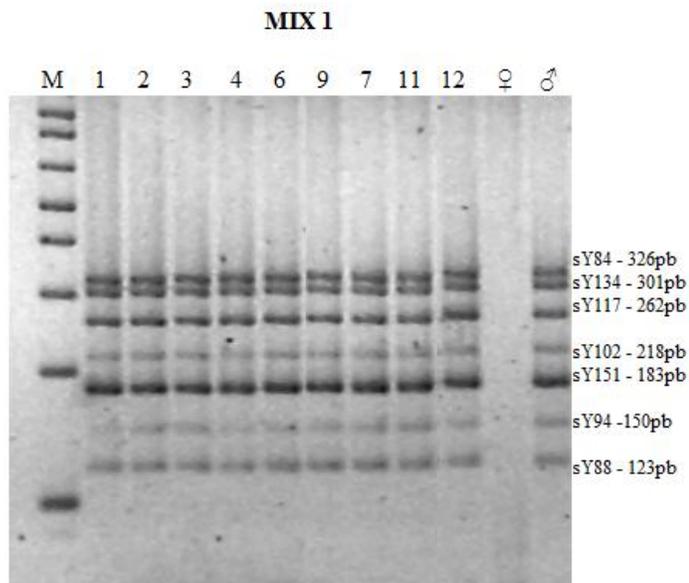


## 6. RESULTADOS

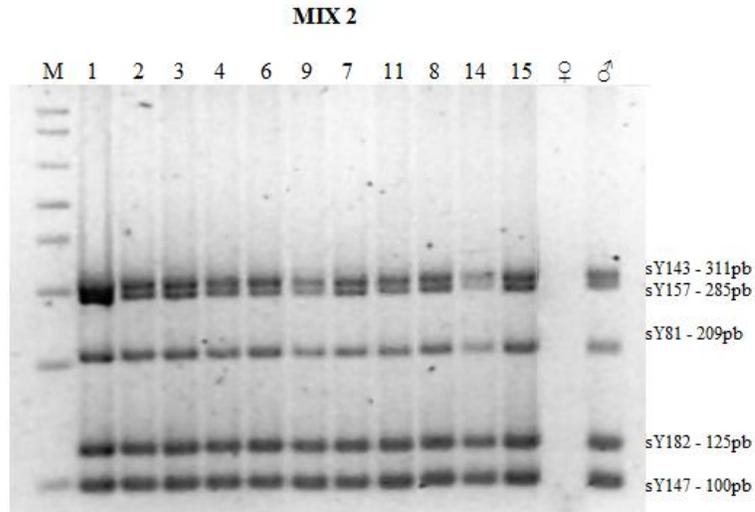
### 6.1. Pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial 46,XY

Em todos os 15 indivíduos do grupo DGP, com exceção dos casos de número 11 e 14, foram testados todos os STS previstos e a amplificação foi positiva para todos eles, ou seja, não foram detectadas deleções. No material proveniente do indivíduo 11 não foi possível a investigação dos STS dos *mixes* 6 e 7 e do *primer* Y6HP52pr devido a fragmentação da amostra de DNA, que impossibilitou a amplificação dos fragmentos, fato também ocorrido com a amostra do indivíduo 14 em relação ao *mix* 7. Todos os demais STS dos indivíduos 11 e 14 foram testados, sendo a amplificação positiva.

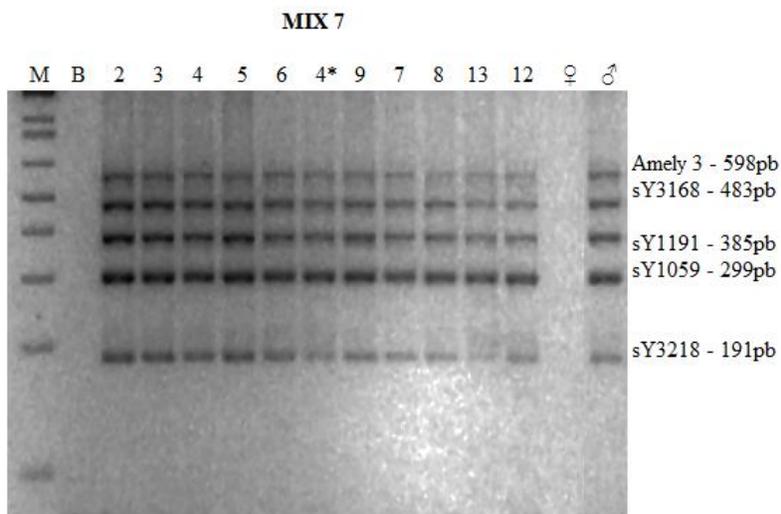
As Figuras 17 a 19 ilustram a ausência de microdeleções em alguns dos *mixes* testados para os indivíduos do grupo DGP, nos quais estavam presentes todos os fragmentos esperados, igualmente encontrados no controle positivo e ausentes no controle negativo.



**Figura 17.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX* 1 utilizado no estudo. A amplificação dos 7 STS, discriminados ao lado, e presentes no *MIX* 1 pode ser visualizada para os indivíduos do grupo DGP. M – Marcador 1Kb; Indivíduos: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 7, 11 e 12 (vide Quadro 2); ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino.



**Figura 18:** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 2* utilizado no estudo. A amplificação dos 5 STS, discriminados ao lado, e presentes no *MIX 2* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo DGP. M – Marcador 1Kb; Indivíduos: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 7, 11, 8, 14 e 15 (vide Quadro 2); ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino.



**Figura 19:** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 7* utilizado no estudo. A amplificação dos 5 STS, discriminados ao lado, e presentes no *MIX 7* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo DGP. M – Marcador 1Kb; Indivíduos: 2, 3, 4, 5, 6, 9, 7, 8, 13 e 12 (vide Quadro 2) e 4\* (vide Quadro 3); ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino.

## 6.2. Pacientes com mosaico 45,X/46,XY ou suas variantes

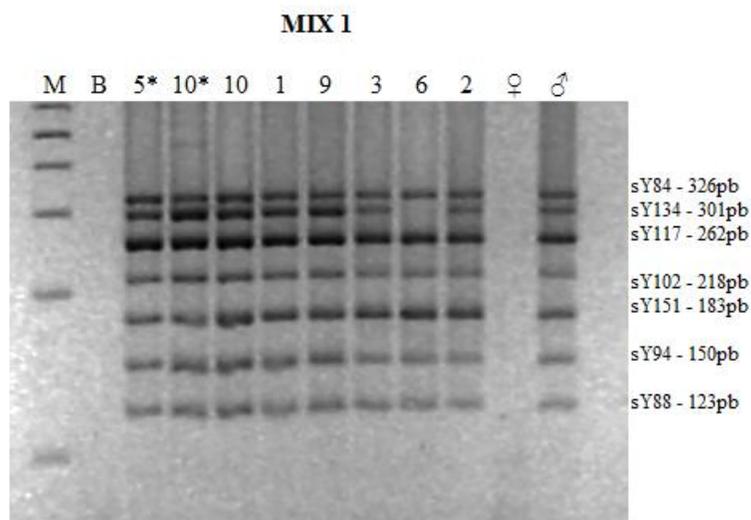
No grupo MOS houve ausência de amplificação de alguns STS em seis dos 15 indivíduos, indicando a presença de microdeleções (Quadro 22). No total, estavam ausentes 19 STS diferentes na reação *multiplex*. Entre os indivíduos nos quais foram encontradas microdeleções, dois apresentam cariótipo 45,X/46,XY, enquanto nos outros quatro a estrutura anormal do cromossomo Y já era perceptível no exame de cariótipo. Todas as microdeleções identificadas localizavam-se no braço longo desse cromossomo, com diferentes pontos de quebra e perda de segmentos de diferentes tamanhos. Nas Figuras 20 a 23 estão imagens das eletroforeses em géis de agarose desse grupo, mostrando tanto os produtos com amplificação positiva quanto os produtos sem amplificação.

As microdeleções que foram encontradas primeiramente na PCR *multiplex* foram confirmadas posteriormente pela PCR individual. Alguns dos resultados estão apresentados nas Figuras 24 a 26. Ao ser buscada a confirmação das deleções por meio de PCR individual, em três indivíduos foi encontrada uma fraca amplificação do STS comparada ao controle masculino, a qual não havia sido detectada durante as reações *Multiplex* (Figuras 27 e 28). Esse tipo de amplificação foi detectado no STS sY117 no indivíduo 11, e no STS sY134 nos indivíduos 6 e 15; somente nesses três casos os resultados foram divergentes entre as duas técnicas, sendo levados em consideração os resultados da PCR individual.

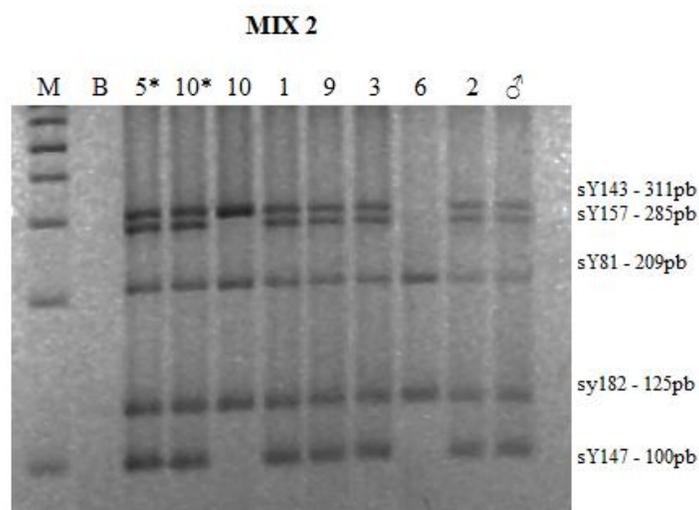
**Quadro 22.** Pacientes do grupo MOS nos quais foram encontradas microdeleções do cromossomo Y.

Paciente	Cariótipo	Fenótipo	Deleções	Região cromossômica
6	45,X/46,X,del(Y)(q12)	DGM	sY127, sY134, sY143, sY1059, sY153, sY149, sY147, Fr15-Hpr, Y6HP52pr, sY157, sY1191, sY3168	q11.222 - q11.23
8	45,X/46,XY	DGM	sY157, sY3168	q11.223 - q11.23
10	45,X/46,X,+mar (Y+) <sup>4</sup>	DGM	sY153, sY149, sY147, Fr15-Hpr, Y6HP52pr, sY157, sY3168	q11.223 - q11.23
11	45,X/46,XY	DGM	sY117, Y6HPc54pr, sY1287, sY1752, sY127, sY134, sY143, sY153, sY149, sY147, Fr15-Hpr, Y6HP52pr, sY157	q11.221 - q11.23
13	45,X/46,X,+mar (Y+) <sup>4</sup>	DGM	sY105, sY109, Y6D14pr, sY117, Y6HPc54pr, sY1287, sY1752, sY127, sY134, sY143, sY1059, sY153, sY149, sY147, Fr15-Hpr, Y6HP52pr, sY157, sY1191, sY3168	q11.221 - q11.23
15	45,X/46,X,+mar1/46,X,+mar2/47,X,+2mar1/47,X,+mar1,+mar2 (Y+) <sup>4</sup>	DGM	sY127, sY134, sY143, sY153, sY149, sY147, Fr15-Hpr, Y6HP52pr, sY157, sY1191, sY3168	q11.222 - q11.23

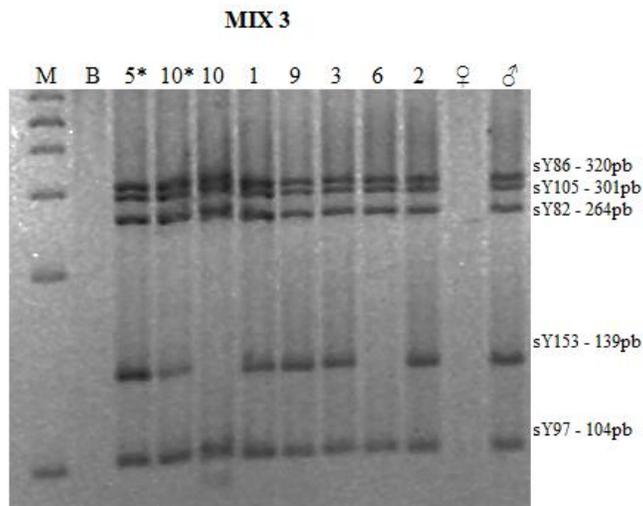
DGM = Disgenesia Gonadal Mista. del = deleção. mar = marcador. <sup>4</sup>presença de sequências específicas de Y indicaram ser o marcador originário desse cromossomo.



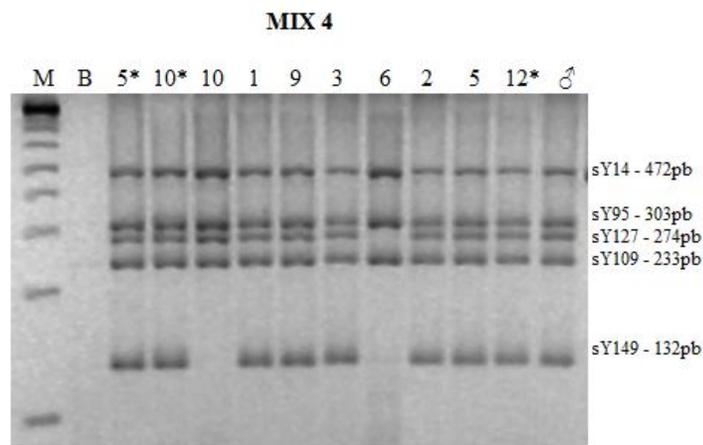
**Figura 20.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 1* utilizado no estudo. A amplificação dos 7 STS, discriminados ao lado, e presentes no *MIX 1* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo MOS. M – Marcador 1Kb; B - Branco; Indivíduos 5\* e 10\* (grupo DGP) e indivíduos 10, 1, 9, 3, 6, 2 (grupo MOS); ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino.



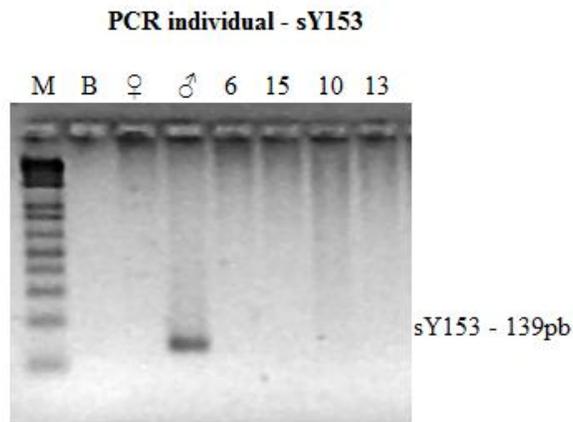
**Figura 21.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 2* utilizado no estudo. A amplificação dos 5 STS, discriminados ao lado, e presentes no *MIX 2* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo MOS. M – Marcador 1Kb; B - Branco; Indivíduos 5\* e 10\* (vide Quadro 2) e indivíduos 10, 1, 9, 3, 6, 2 (vide Quadro 3); ♂ - Controle masculino.



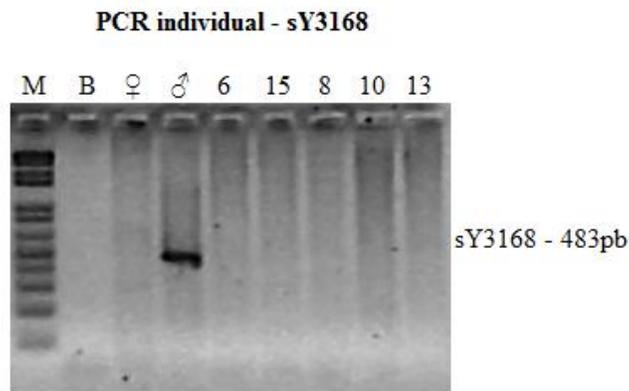
**Figura 22.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 3* utilizado no estudo. A amplificação dos 5 STS, discriminados ao lado, e presentes no *MIX 3* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo MOS. M – Marcador 1Kb; B - Branco; Indivíduos 5\* e 10\* (vide Quadro 2) e indivíduos 10, 1, 9, 3, 6 e 2 (grupo vide Quadro 3); ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino.



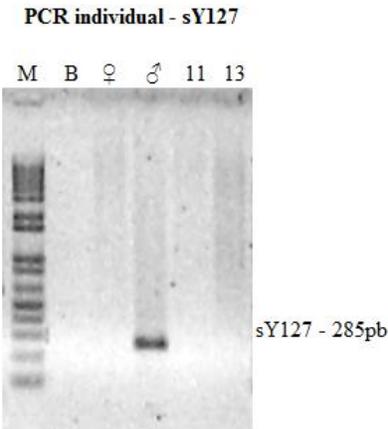
**Figura 23.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados do *MIX 4* utilizado no estudo. A amplificação dos 5 STS, discriminados ao lado, e presentes no *MIX 4* pode ser visualizada para os indivíduos do grupo MOS. M – Marcador 1Kb; B - Branco; Indivíduos 5\*, 10\*, 12\* (vide Quadro 2) e indivíduos 10, 1, 9, 3, 6, 2, 5 (vide Quadro 3); ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino.



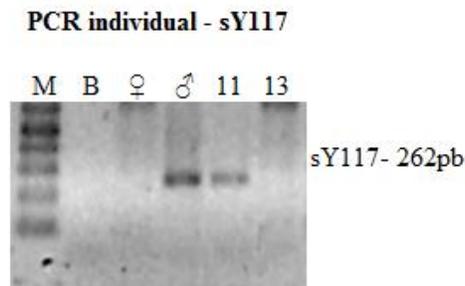
**Figura 24.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY153, com amplificação positiva apenas para o controle masculino. sY153: M – Marcador 1Kb; B – Branco; ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino; Indivíduos 6, 15, 10 e 13 do grupo MOS (vide Quadro 3).



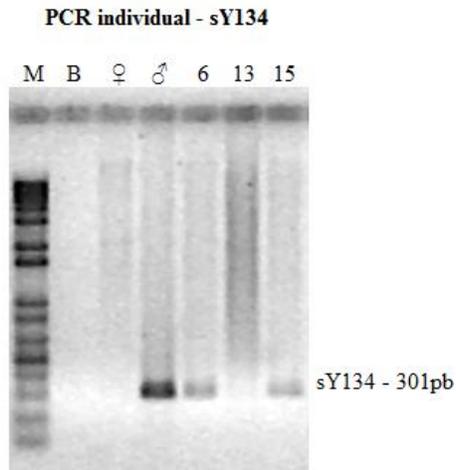
**Figura 25.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY3168, com amplificação positiva apenas para o controle masculino. sY3168: M – Marcador 1Kb; B – Branco; ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino; Indivíduos 6, 15, 10 e 13 do grupo MOS (vide Quadro 3).



**Figura 26.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY127, com amplificação positiva apenas para o controle masculino. sY127: M – Marcador 1Kb; B – Branco; ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino; Indivíduos 11 e 13 do grupo MOS (vide Quadro 3).

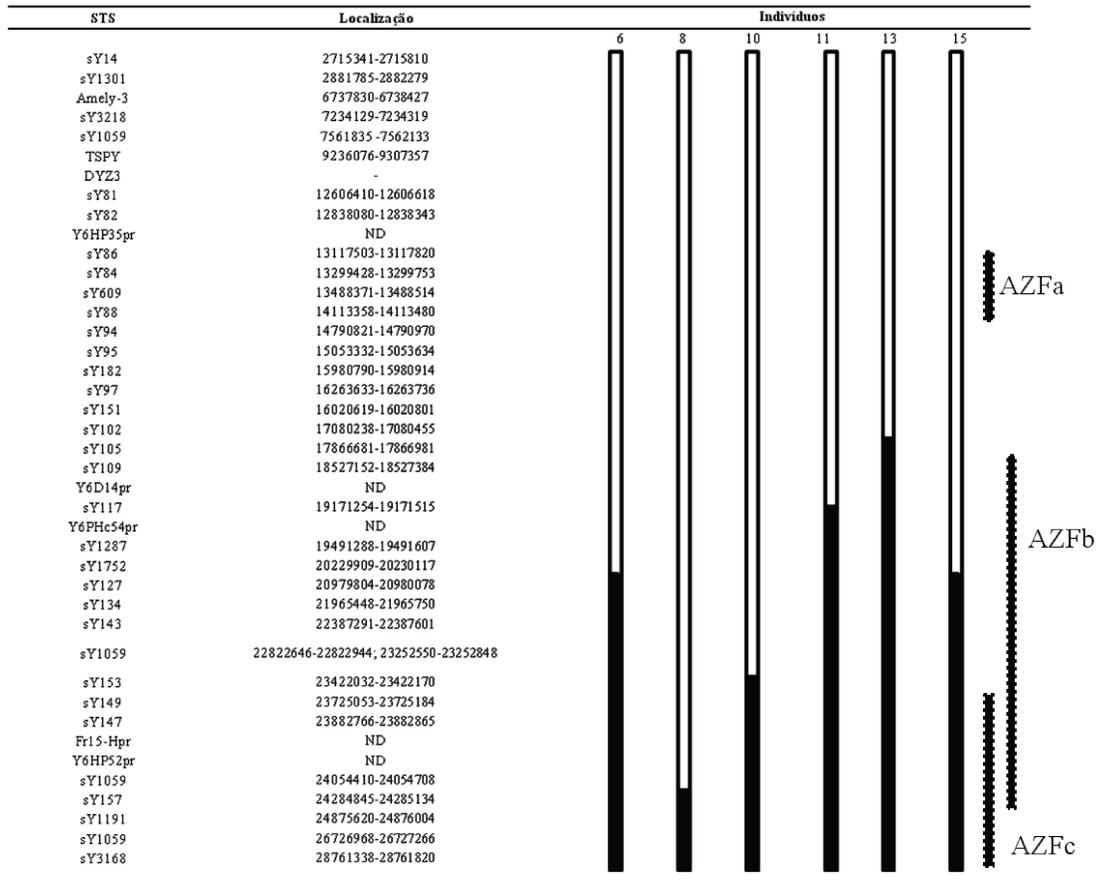


**Figura 27.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY117, com fraca amplificação para o indivíduo 11 comparada ao controle masculino (vide Quadro 3), a mesma estava ausente na reação Multiplex. sY117: M – Marcador 1Kb; B – Branco; ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino; Indivíduos 11 e 13.



**Figura 28.** Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando os resultados da PCR individual do STS sY134, com fraca amplificação para os indivíduos 6 e 15 (vide Quadro 3), a mesma estava ausente na reação Multiplex. sY134: M – Marcador 1Kb; B – Branco; ♀ – Controle feminino; ♂ - Controle masculino; Indivíduos 6, 13 e 15.

Na Figura 29 encontra-se a posição, no cromossomo Y, dos STS ausentes nos pacientes do grupo 6, 8, 10, 11, 13 e 15 do grupo MOS. Os outros nove indivíduos do grupo MOS apresentaram amplificação positiva para as regiões investigadas; dentre eles estão dois indivíduos portadores de isocromossomo de Y.



**Figura 29.** Descrição esquemática das microdeleções encontradas nos seis indivíduos do grupo MOS.  = Fragmento presente.  = Fragmento ausente. À direita, a distribuição dos STS nas regiões AZFa, b e c.

## ***DISCUSSÃO***



## 7. DISCUSSÃO

O cromossomo Y tem um comprimento total aproximado de 60Mb e contém três tipos de material genético. O primeiro corresponde às regiões pseudoautossômicas (PAR), localizadas nas regiões terminais do braço curto e braço longo. Nessas regiões há homologia entre os cromossomos X e Y, sendo essa a região responsável pelo pareamento e pela permuta cromossômica durante a meiose. O segundo consiste de DNA satélite repetitivo, sequências de heterocromatina localizadas tanto na região centromérica quanto na região distal do braço longo, com comprimento aproximado de 1Mb e 40Mb, respectivamente [66, 67]. Skaletsky e colaboradores, em 2003, descreveram a presença de uma terceira região de heterocromatina, com uma sequência de 400Kb, compreendendo mais de 3000 repetições em tandem de 125 pares de bases que intercala as sequências de eucromatina no braço longo [66]. Finalmente, o terceiro tipo de material genético corresponde à região de eucromatina, rica em genes específicos do cromossomo Y. As sequências de DNA eucromático incluem um total de aproximadamente 23 Mb, incluindo 8 Mb localizados no braço curto e 14,5 Mb no braço longo do cromossomo Y [66, 67].

A região eucromática, juntamente com uma porção da região de heterocromatina, denomina-se *MSY* (*male-specific region*, ou região específica masculina). Essa região é flanqueada pelas regiões pseudoautossômicas e corresponde a 95% da extensão do cromossomo Y [66]. A região específica masculina compreende 496 genes, sendo 51 genes codificantes, 326 pseudogenes, e 119 genes não codificantes de proteínas, de acordo com a base *Ensembl Genome Browser* versão 69 (acessada em janeiro de 2013) [68]. Atualmente, foram descritas evidências de que 22 genes codificantes de proteínas estejam envolvidos no processo de espermatogênese, são eles: *DAZ1*, *DAZ2*, *DAZ3*, *DAZ4*, *CDY1*, *CDY1B*, *CDY2A*, *CDY2B*, *HSFY1*, *HSFY2*, *RBMY1A1*, *RBMY1D*, *RBMY1F*, *RBMY1J*, *TSPY1*, *BPY2*, *BPY2B*, *BPY2C*, *PRY*, *PRY2*, *PRYP3*, e *PRYP4* [69].

Acredita-se que os cromossomos sexuais X e Y tenham evoluído de um par de autossomos que, há cerca de 350 milhões de anos, adquiriu um fator de determinação do sexo em um dos homólogos. Seguiu-se o acúmulo de genes específicos do sexo masculino nesse mesmo cromossomo, reduzindo ou eliminando a recombinação, e, finalmente, mutações, deriva genética e seleção nas regiões de baixa recombinação levando a perda rápida de genes [70]. Portanto, a região MSY foi criada a partir do acúmulo de vários alelos

relacionados à diferenciação sexual masculina ao redor do gene da determinação sexual (*SRY*); dentro desta região a taxa reduzida de *crossing-over* entre os cromossomos X e Y acarretou sua degeneração, com o surgimento de pseudogenes e redução do tamanho do cromossomo Y. Genes relacionados à espermatogênese localizados nos autossomos foram incorporados ao cromossomo Y ao longo da evolução por meio de transcrição reversa e translocações. Por sua vez, genes do cromossomo X sem homólogos no Y passaram a ser inativados em um dos cromossomos X no sexo feminino, em um mecanismo de compensação de dose [57, 67].

Assim, o fator de maior impacto para a degradação do cromossomo Y é a não recombinação com um cromossomo homólogo, impedindo a realização de reparos e tornando a região MSY isolada geneticamente. Com isso, essa região sofre mutações, deleções, inserção de *retroposons*, amplificação de sequências repetitivas e degrada-se rapidamente pela perda de genes ativos. Uma segunda forma de degradação do cromossomo é conhecida como "*genetic hitchhiking*". Ela ocorre quando um alelo de grande efeito benéfico para a saúde masculina surge por mutação no cromossomo Y de um determinado indivíduo e se dissemina na população independentemente da presença de genes danificados nesse mesmo cromossomo. Esse mecanismo anula a seleção natural a favor de cromossomos Y que apresentam genes funcionais [67].

Em 2008, foi publicado por Lange e colaboradores um trabalho apresentando a base de dados *MSY Breakpoint Mapper*, da qual foram retirados alguns dos STS investigados neste estudo [68]. O uso desses e de outros STS permitiu, neste trabalho, uma análise mais aprofundada do cromossomo Y de indivíduos com DGP e cariótipo 46,XY e de indivíduos com cariótipo em mosaico 45,X/46,XY ou suas variantes.

O presente estudo não detectou microdeleções no cromossomo Y nos 15 indivíduos com DGP e cariótipo normal 46,XY, não confirmando, portanto, a hipótese de que alterações desse cromossomo a nível molecular poderiam estar ocasionando a perda do cromossomo Y nas divisões celulares, principalmente nas gônadas. Assim, a hipótese de que um mosaicismo restrito aos testículos pudesse ser uma das causas dessa afecção torna-se menos provável, embora não possa ser totalmente descartada, visto que a perda do cromossomo Y e conseqüente surgimento de linhagem 45,X no testículo pode ocorrer na ausência de alterações estruturais do cromossomo Y. Além disso, como observado por

Álvarez-Nava *et al.* (2008), podem ser encontradas microdeleções em tecido gonadal que estão ausentes no sangue periférico [72].

Foram encontradas microdeleções em seis dos 15 indivíduos com mosaico 45,X/46,XY ou suas variantes, sendo quatro dos seis portadores de alterações estruturais já evidentes ao exame citogenético e dois dos nove indivíduos com cromossomo Y aparentemente normal (casos 8 e 11), nos quais a presença de alterações só foi detectada ao exame molecular. Essa frequência (2/9) foi semelhante à observada por Álvarez-Nava *et al.* (2008) [72], de 3/11, e inferior à observada por Patsalis *et al.* (2005) [31], de 4/7. Se, considerando a raridade dessa afecção, lançarmos mão da soma dessas três amostras, será possível estimar que 9/27 ou um em cada três indivíduos com cariótipo 45,X/46,XY com cromossomo Y aparentemente normal apresenta microdeleções de Y.

Todos os seis indivíduos apresentavam fenótipo de DGM. Não é possível, porém, estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo, considerando o tamanho amostral, o fato de que a maioria dos indivíduos desse grupo tinha esse mesmo fenótipo (11/15) e a existência de somente um caso de cada um dos outros fenótipos possíveis na amostra (ST, DDS OT e genitais masculinos típicos), além de um paciente com histologia ainda indefinida.

Das 12 gônadas avaliadas nos seis indivíduos com deleção, seis eram disgenéticas (*streaks*); o mesmo foi observado em seis das 18 gônadas dos casos sem microdeleção, porém a diferença não foi significativa ( $p=0,361$ ). Uma frequência alta de *streaks* entre os casos de microdeleção também foi observada por Álvarez-Nava *et al.* (2008) (seis das sete gônadas analisadas) [72]. Uma vez que nas gônadas a proporção de células 45,X é diretamente proporcional à gravidade da disgenesia testicular [26, 27, 51], é possível sugerir que a instabilidade do cromossomo Y nas gônadas gerada pelas microdeleções leve a uma maior proporção de células 45,X, o que, por sua vez, torne mais provável a formação de *streaks*.

Todas as alterações identificadas nos seis indivíduos estavam localizadas no braço longo do cromossomo Y, a partir da região Yq11.221, iniciando em AZFb e se estendendo para a AZFc; somente em um paciente (caso 8) a deleção é praticamente limitada à região AZFc. A análise dos STS permitiu definir a região onde se encontra o ponto de quebra proximal das deleções, mas não a localização de pontos de quebra distais, que podem se encontrar em diferentes pontos da junção q11-q12 ou dentro da região q12. De fato, é

possível supor a ocorrência de duas quebras no braço longo, perda de um segmento intersticial e soldagem da extremidade fraturada proximal a um segmento distal de Yq contendo o telômero. É possível ainda que nos casos em que a perda da região heterocromática em Yq12 é perceptível no exame de cariótipo tenha havido uma deleção terminal seguida de formação de um novo telômero, processo conhecido como “*chromosome healing*” [73].

Os telômeros são essenciais para os cromossomos por prevenirem degradação e fusão de extremidades, além de serem estruturas necessárias para a replicação adequada dos cromossomos. Ao perder os telômeros, os cromossomos entram em um ciclo de quebras e fusões; caso não ocorra o processo de “*chromosome healing*”, esse ciclo irá desencadear uma instabilidade cromossômica induzindo a formação de dicêntricos, anéis ou fusões cromossômicas, podendo levar ao surgimento de duplicações invertidas terminais. Esse processo de correção das extremidades perdidas pode ocorrer por duas vias. A primeira delas seria a adição direta de sequências teloméricas mediada pela ação da telomerase ou um mecanismo baseado na recombinação independente da telomerase. O segundo mecanismo é conhecido como captura dos telômeros, onde sequências subteloiméricas e/ou pan-teloiméricas de outro cromossomo são translocadas para a região deletada [73].

Nos indivíduos 6 e 15, o fragmento perdido na região eucromática foi o mesmo, com ausência de 11 STS; a deleção inicia-se no STS sY127, localizado na região cromossômica q11.222, indicando que o ponto de quebra proximal esteja localizado aproximadamente em Y:20,979,804 (*Ensembl Genome Browser* versão 69 [69]). Ao cariótipo, somente havia sido detectada a deleção da região q12 no indivíduo 6. Já no indivíduo 15 foram identificadas mais de duas linhagens celulares, com marcadores diferentes (45,X/46,X,+mar1/46,X,+mar2/47,X,+2mar1/47,X,+mar1,+mar2) nos quais observa-se diferentes tamanhos do braço longo do Y. Ao cariótipo, foi possível diferenciar as linhagens celulares presentes no mesmo indivíduo, porém, na técnica de PCR, isso não é possível, já que amplificação do marcador maior encobre a ausência de sequências do marcador menor; sendo assim, as duas técnicas foram complementares na identificação de um dos pontos de quebra do indivíduo 15. Assim, é possível supor que o cromossomo Y anômalo com maior tamanho de Yq (denominado mar1 no cariótipo) seja aquele com o ponto de quebra em q11.222, e que o menor marcador (denominado mar2 no cariótipo)

tenha surgido a partir do de maior tamanho (mar1) que sofreu a perda de um fragmento adicional. Essas alterações estruturais levaram ainda à falta de disjunção e perda desses cromossomos na mitose, gerando as diferentes linhagens em mosaico.

Coincidentemente, nesses dois pacientes, o STS sY134, ausente na reação *Multiplex*, apresentou uma fraca amplificação comparada ao controle masculino na reação individual; no entanto, para o STS sY127, de localização proximal ao sY134, a amplificação permaneceu negativa (vide Quadro 5). Estes resultados são aparentemente incongruentes, pois é difícil imaginar a ausência de sY127, que é mais proximal, e a presença de sY134, mais distal, em um mesmo cromossomo. Além disso, a distância entre eles é muito pequena (985.370 pb) para que pudesse haver perdas intersticiais.

A amplificação positiva, porém de intensidade reduzida, do sY134 pode ser devida ao mosaicismo com cromossomos com e sem as sequências do sY134. Seguindo o mesmo raciocínio para o sY127, esperaríamos amplificação semelhante à do sY134. No entanto, não foi observada a formação de fragmento, nem mesmo de menor intensidade. Assim, pode-se supor que, mesmo presente em uma das linhagens celulares este STS não amplificou na reação individual devido a algum artefato estrutural da região a ser amplificada ou às condições de reação não serem favoráveis à amplificação de regiões pouco representadas na amostra, visto que no controle normal masculino a amplificação foi observada. Assim os resultados indicam que os dois pacientes possuem uma deleção com ponto de quebra localizado próximo aos dois STS, sY127 e o sY134.

Com a perda do fragmento citado acima, conseqüentemente foram perdidos nesses dois pacientes os genes de cópia única *TXLNG2P* (*taxilin gamma 2, pseudogene*) também conhecido como *CYorf15A* e *CYorf15B*, *KDM5D* (*lysine (K)-specific demethylase 5D*) também conhecido pelas siglas *JARID1D* e *SMCY*, *EIF1AY* (*eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked*), *RPS4Y2* (*ribosomal protein S4, Y-linked 2*), parte da família do gene *CDY1* (*chromodomain protein, Y-linked, 1*), e perda total da família dos genes *RBMY1A1* (*RNA binding motif protein, Y-linked, family 1, member A1*), *PRY* (*PTPN13-like, Y-linked*), *BPY2* (*basic charge, Y-linked, 2*) e *DAZI* (*deleted in azoospermia 1*).

No indivíduo 8, dois STS estavam ausentes, sY157 e sY3168, indicando um ponto de quebra em Yq11.223, com localização em 24,284,845 de acordo com *Ensembl Genome Browser* versão 69 [69]. A deleção causou a perda de parte de três famílias de genes *CDY1*,

*BPY2* e *DAZI*. Ao cariótipo, a linhagem 46,XY era aparentemente normal, provavelmente pelo fato do tamanho do fragmento perdido estar abaixo do nível de resolução desse exame, ou ainda pelo grau de distensão cromossômica obtido na cultura, que pode ter sido inferior ao necessário para a visualização da deleção.

O fragmento ausente no paciente 10 iniciou-se no sY153, em q11.223 (23,422,032 - *Ensembl Genome Browser* versão 69 [69]), tendo sido identificada a perda de 7 STS. O fragmento perdido inclui a família dos genes *BPY2* e *DAZI*, e parte da família dos genes *CDY1*, *RBMY1A1* e *PRY*.

As deleções encontradas nos indivíduos 11 e 13 envolveram o maior número de STS na casuística; houve falta de amplificação de 13 STS no indivíduo 11 e 17 no indivíduo 13. Os resultados do paciente 11 indicam que o fragmento ausente inicia-se no sY117, em q11.221, e inclui todos os STS subsequentes analisados neste trabalho (vide Quadros 22 e Figura 30). Essa deleção não havia sido detectada no exame de cariótipo, no qual não haviam sido observadas alterações estruturais no cromossomo Y. No entanto, uma nova análise do exame citogenético à luz dos resultados obtidos pelo estudo molecular gerou dúvidas sobre a possibilidade desta alteração estrutural ser perceptível no cariótipo (Figura 10b). Deve-se levar em conta, porém, que ao exame citogenético é grande a dificuldade na distinção entre variações da normalidade na extensão da região heterocromática e deleções verdadeiras envolvendo essa região e a porção eucromática adjacente.

Nesse mesmo paciente a sequência do sY117 não amplificada pela reação *Multiplex* também apresentou fraca amplificação comparada ao controle positivo na reação individual, porém, neste caso, o STS em questão é o primeiro do mapeamento a apresentar-se ausente, sugerindo que o ponto de quebra tenha ocorrido na sequência que seria amplificada, ocasionando sua amplificação apenas quando uma reação mais específica de PCR individual foi realizada.

No indivíduo 13, a deleção inicia-se no STS sY105, situado também em q11.221, com localização em 17,866,681 (*Ensembl Genome Browser* versão 69 [69]). No exame do cariótipo (45,X/46,X,+mar) já havia sido detectado um cromossomo estruturalmente anômalo, sendo o marcador identificado como proveniente do Y somente após o estudo

molecular, uma vez que a região heterocromática de Yq12 estava ausente. Neste indivíduo, portanto, é possível constatar que a deleção se estende para além da região eucromática.

Os genes de cópia única ausentes nos indivíduos 11 e 13 são os mesmo ausentes nos indivíduos 6 e 15 (*TXLNG2P*, *KDM5D*, *EIF1AY*, *RPS4Y2*). Em relação às famílias de genes, no paciente 13 houve perda completa das famílias *XKRY*, *CDY1*, *HSFY*, *RBMY1*, *PRY*, *BPY2* e *DAZ*, enquanto no indivíduo 11 houve perda parcial da família *CDY1*, e perda completa das famílias *HSFY*, *RBMY1*, *PRY*, *BPY2* e *DAZ*.

O cromossomo Y desempenha papel primordial na espermatogênese humana por meio das famílias de genes já mencionados, que são especificamente expressos nos testículos [74]. Assim, sabe-se que microdeleções desse cromossomo contribuem diretamente para a infertilidade masculina por determinarem falhas no ciclo espermatogênico [75], e ocorrem geralmente nas regiões AZFa, AZFb e AZFc. A região AZFc é a mais frequentemente envolvida, seguindo-se a AZFb, e mais raramente a AZFa [76, 77]. De fato, as microdeleções encontradas neste trabalho no grupo MOS se localizam nas regiões AZFb e AZFc.

Na região AZFb, cuja extensão é de 6.23Mb, foram localizados cinco genes de cópia única, *TXLNG2P*, *RPS4Y2*, *KMD5D* e *EIF1AY*; no entanto, apesar dos esforços para melhor entendimento da função e propriedades regulatórias dessa região, todo o conhecimento adquirido até o momento ainda pode ser considerado escasso [78].

O gene *TXLNG2P* está associado a regulação transcricional em osteoblastos e seu papel na função reprodutiva ainda é desconhecido. *RPS4Y2* é expresso especificamente nos testículos e acredita-se que atue na regulação pós-transcricional no ciclo espermatogênico. Por sua vez, o gene *KMD5D* codifica uma histona H3 lisina 4 demetilase (H3K4) que forma um complexo com a proteína formada pelo gene *MSH5* (*mutS homolog 5*), resultando em um fator de reparação de DNA durante a espermatogênese. Esse complexo parece estar envolvido na remodelação da cromatina das células germinativas masculinas e na condensação dos cromossomos durante a meiose [78]. Finalmente, sabe-se que o gene *EIF1AY* é expresso em vários tecidos e sua ausência parece contribuir com falhas na espermatogênese [79].

Em relação às famílias de genes deletadas na região AZFb dos pacientes analisados nesta casuística, sabe-se que a família do gene *XKRY* é expressa especificamente nos

testículos, embora ainda nada se saiba sobre sua função na espermatogênese; parece, porém, estar associada ao processo de fertilização [78]. A família do gene *HSFY* está associada à regulação da gametogênese masculina e suas deleções podem ser causa de infertilidade masculina; de fato, já foi encontrada deleção da região AZFb afetando apenas as cópias funcionais desse gene em um homem azospérmico [78, 80]. Já a expressão dos genes da família *PRY* é irregular, sendo a proteína detectada apenas em alguns espermatozóides e espermátides. Finalmente, a família do gene *RBMY1* está associada ao armazenamento e transporte do RNAm durante a espermatogênese, este gene também está relacionado a oncogênese do fígado masculino [78, 81].

As deleções de genes da região AZFb parecem contribuir diretamente com o fenótipo de parada de maturação na espermatogênese. Além disso, acredita-se que a remoção de uma região tão grande cause um efeito estrutural que resulte em problemas no emparelhamento dos cromossomos X e Y durante a meiose; assim, o fenótipo causado pela deleção dessa região deve resultar da combinação desses fatores [78].

Deleções da região AZFc em homens causam fenótipos variáveis, desde azoospermia a oligospermia grave. A deleção completa da região AZFc compreende 3.5Mb do cromossomo Y, com perda das famílias dos genes *CDY1*, *BPY2* e *DAZ*. A proteína expressa pelos genes da família *BPY2* exibe localização nuclear ao longo de todos os estágios da célula germinativa masculina; por outro lado, o papel do gene *CDY1* na espermatogênese ainda não é bem conhecido. Os genes da família *CDY* estão envolvidos na remodelação pós meiótica nuclear e na regulação transcricional. Finalmente, os membros da família *DAZ* desempenham função no estabelecimento e manutenção da linhagem germinativa masculina [78].

O mecanismo principal do surgimento de deleções do cromossomo Y parece ser a recombinação homóloga ectópica entre regiões similares ou idênticas, sendo tais regiões encontradas em abundância nesse cromossomo. Assim, a recombinação homóloga entre duas fitas de sequência idêntica resulta em perda da região central ao local da recombinação [57]. Repping e colaboradores (2002) publicaram um estudo mostrando que a recombinação homóloga foi causa de sete deleções em nove casos estudados de falha na espermatogênese [82]. Deleções também podem ser causadas por recombinação alterada entre cromátides irmãs pareadas de maneira inadequada [30].

Ao comparar a localização dos STS utilizados neste estudo e os esquemas propostos por Beaulieu Bergeron e colaboradores em 2011 e por Plotton e colaboradores em 2010 é possível constatar que três dos indivíduos estudados (casos 8, 10 e 11) possuem ponto de quebra dentro de regiões constituídas de palíndromes, o que pode ter contribuído com o surgimento dessas deleções [83, 84].

No entanto, as microdeleções no cromossomo Y parecem não ser deletérias para os resultados de fertilização no caso de esperma obtido por extração de espermatozoides do testículo (TESA). Grande parte dos genes envolvidos na deleção são expressos especificamente nos testículos durante a espermatogênese, mas não parecem ser essenciais para a fertilização ou embriogênese. Desta maneira, indivíduos com DGM, assim como outros indivíduos com azoospermia ou oligospermia grave, cada vez mais podem se beneficiar de procedimentos como o TESA seguido de fertilização *in vitro* com injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) [57].

Assim, indivíduos com cariótipo 45,X/46,XY ou suas variantes criados no sexo masculino e portadores de microdeleções em Y podem, por meio de procedimentos de fertilização assistida com ICSI, gerar descendentes não só portadores de esterilidade mas também de cromossomos Y instáveis que levem ao surgimento de mosaico com linhagem 45,X nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, diversos fenótipos anômalos (ST, DGM e DDS OT) [30]. É o caso, por exemplo, de três pacientes com microdeleções criados no sexo masculino, dois com Y aparentemente normal (casos 8 e 11) e um com deleção aparentemente limitada a Yq12 (caso 6). Nesses três indivíduos, assim como no caso 13, no qual a alteração estrutural do Y era mais pronunciada ao exame citogenético, a presença dessas alterações da região eucromática deverá ser levada em consideração nas orientações a respeito das conseqüências da fertilização assistida.

As prováveis causas da instabilidade mitótica causada pelas microdeleções ainda não são conhecidas. No entanto, chamou a atenção de Ravel, Siffroi (2009) o fato de terem sido identificadas sequências em Yq capazes de formar neocentrômeros [85]. Embora estes possuam função centromérica, não se detecta DNA alfa-satélite em sua constituição; esses autores acreditam que a perda dessas sequências por deleções na região AFZb ou c possa estar relacionada à instabilidade cromossômica.

Nenhuma deleção foi encontrada no braço curto do cromossomo Y. O gene *TSPY*, localizado em Yp, é um gene candidato na regulação da espermatogênese e está associado ao aparecimento de tumores gonadais em indivíduos com DDS [86]; assim, todos os indivíduos da casuística (com e sem mosaïcismo) que não foram submetidos a gonadectomia bilateral devem ser acompanhados cuidadosamente pelo risco de neoplasia.

Também não foram encontradas deleções em Yp nos dois indivíduos da casuística portadores de cromossomo Y isodicêntrico (casos 5 e 14 do Quadro 3). Tais cromossomos são formados por quebra no braço curto (como nesses dois casos) ou no braço longo do Y seguida de fusão das extremidades fraturadas das cromátides irmãs e perda do fragmento acêntrico durante a gametogênese. Outros mecanismos incluem recombinação entre palíndromes do braço longo e recombinação limitada à região de heterocromatina. Devido à presença de dois centrômeros, esses cromossomos são quase sempre instáveis na divisão celular, levando a mosaïcismo com linhagem 45,X [87].

De fato, regiões contendo sequências repetitivas e palíndromes podem conferir susceptibilidade à formação de isodicêntricos e podem estar associadas à formação desses cromossomos anômalos. Por outro lado, a distância intercentromérica parece ser diretamente proporcional à instabilidade desse cromossomo: quanto maior a distância entre os centrômeros, maior é a predisposição a quebra e perda do isodicêntrico. Isso porque o aumento da distância intercentromérica possibilita que os centrômeros da mesma cromátide possam se ligar às fibras do fuso de pólos opostos, gerando, assim, uma tensão anômala sobre a estrutura do cromossomo [83].

Uma vez que os STS analisados incluem a região eucromática de Yp até p11.31, é possível supor que a quebra que originou esses isodicêntricos tenha ocorrido na região pseudoautossômica, que não foi investigada neste estudo, uma vez que sua presença tanto no cromossomo X quanto no Y impossibilita a detecção de uma microdeleção presente apenas em Y.

Mekkawy e colaboradores (2012) publicaram um estudo sugerindo a existência de um *hot-spot* localizado na PAR1 propenso a quebra e junção, originando isodicêntricos [87]. A quebra em Yp dos dois indivíduos da casuística pode estar localizada entre a região subtelomérica e a telomérica, assim como nos dois casos apresentados por Beaulieu

Bergeron e colaboradores (2011) [83], nos quais o ponto de quebra foi descrito como sendo em Yp11.32.

Finalmente, a pesquisa de microdeleções do Y por meio de STS tem algumas particularidades que devem ser levadas em consideração. Uma delas é o fato da sequência do primer sY1059 se anelar em cinco loci no cromossomo Y, um deles localizado no braço curto (7,561,835 - *Ensembl Genome Browser* versão 69 [69]), enquanto os outros loci estão localizados no braço longo em quatro regiões (22,822,646; 23,252,550; 24,054,410; 26,726,968 - *Ensembl Genome Browser* versão 69 [69]). Devido a esse fato, mesmo nos pacientes em que foram detectadas deleções a partir de q11.223 não foi possível identificar a ausência desse locus no braço longo, já que a região do braço curto presente em todos os indivíduos era amplificada mesmo com a ausência do segmento do braço longo. No entanto, neste trabalho esse STS foi considerado ausente em Yq, uma vez que seria difícil a presença apenas do mesmo frente à ausência dos outros STS vizinhos. Por outro lado, também existe uma pequena possibilidade de que tenha ocorrido uma deleção, junção e outra deleção, sugerindo que a deleção seja de um fragmento contínuo.

Embora possa haver dificuldades na interpretação dos resultados referentes ao sY1059, sua utilização pode auxiliar a identificar uma deleção de sequências tanto em Yp quanto em Yq quando este se apresenta ausente na reação de PCR. O sY1059 também pode servir como parâmetro da reação, pois caso já se tenha conhecimento de uma deleção em apenas um braço do cromossomo, este STS deve estar presente em todas as reações, servindo assim de um controle interno para a mesma.

Outro ponto a ser considerado diz respeito ao fato de que, apesar da eficiência da técnica de PCR *Multiplex* para o estudo de microdeleções do cromossomo Y aplicada neste trabalho, deve-se ficar atento à presença de falsas deleções, encontradas em casos onde a sequência genômica de um indivíduo possui uma mutação de ponto na sequência de anelamento do *primer*. As altas temperaturas de anelamento do ciclo devem permitir a amplificação específica da sequência alvo, porém mutações na região de anelamento podem impedir o anelamento do *primer* resultando em uma falsa deleção. Além disso, uma deleção real pode ser confirmada indiretamente pela deleção adicional dos STS subsequentes [64].



## ***CONCLUSÕES***



## 8. CONCLUSÕES

A partir do estudo do cromossomo Y por meio de PCR com o uso de 38 STS cobrindo a região eucromática específica do sexo masculino conclui-se que:

a) Não foram identificadas microdeleções nos 15 indivíduos com disgenesia gonadal parcial 46,XY da amostra.

b) Microdeleções do braço longo estiveram presentes não só em indivíduos com mosaicismos com cromossomo Y anômalo ao exame do cariótipo, mas também naqueles com Y aparentemente normal.



## ***REFERÊNCIAS***



## 9. REFERÊNCIAS

1. Domenice S, Costa EMF, Corrêa RV, Mendonça BB. Aspectos moleculares da determinação e diferenciação sexual. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002 ago; 46(4):433-43.
2. Mello MP, Assumpção JG, Hackel C. Genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005 fev;49(1):14-25.
3. Moraes SG, Maciel-Guerra AT, Guerra Júnior G. Aspectos embriológicos. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (org.). *Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo.* 2ª edição, Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010; pp.15-26.
4. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and a etiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 apr;25(2):221-38.
5. Tepperman J. *Fisiologia endócrina e metabólica.* 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1977.
6. Damiani D, Guerra-Júnior G. As novas definições e classificações dos estados intersexuais: o que o Consenso de Chicago contribui para o estado da arte?. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51(6):1013-7.
7. Davies JH, Knight EJ, Savage A, Brown J, Malone PS. Evaluation of terminology used to describe disorders of sex development. *J Pediatr Urol.* 2011 aug;7(4):412-5.
8. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA; LWPES1/ESPE2 Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child.* 2006;91:554-62.

9. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA; International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics* 2006;118:488-500.
10. Lipay MVN, Bianco B, Verreschi ITN. Disgenesias gonadais e tumores: aspectos genéticos e clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005 fev;49(1):60-70.
11. Scolfaro MR, Cardinalli IA, Guerra- Júnior G. A importância da análise histológica morfométrica gonadal na identificação da gônada disgenética. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003 abr;47(2):128-134.
12. Andrade JGR, Moraes SG, Maciel-Guerra AT. Distúrbios da diferenciação gonadal -Outras disgenesias gonadais. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (org.). *Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo.* 2ª edição, Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010; pp.109-105.
13. Rohatgi M, Gupta DK, Menon PS, Verma IC, Mathur M. Mixed gonadal dysgenesis and dysgenetic male pseudohermaphroditism - a critical analysis. *Indian J Pediatr* 1992;59:487-500.
14. Looijenga LH, Hersmus R, Oosterhuis JW, Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP. Tumor risk in disorders of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21:480-95.
15. Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am. J. Hum. Genet.* 1992 jul; 51; 979-984.

16. Fuqua JS, Sher ES, Fechner PY, Ostrer H, Oddeux C, Schafer AJ, *et al.* Linkage analysis of a kindred with inherited 46,XY partial gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81:4479-4483.
17. Fuqua JS, McLaughlin J, Perlman EJ, Berkovitz GD. Analysis of the SRY gene in gonadal tissue of subjects with 46,XY gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82(2):701-702.
18. Ottolenghi C, Moreira-Filho C, Mendonça BB, Barbieri M, Fellous M, Berkovitz GD, *et al.* Absence of mutations involving the Lim Homeobox Domain Gene LHX9 in 46,XY gonadal agenesis and dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86:2465-2469.
19. Tagliarini EB, Assumpção JG, Scolfaro MR, Mello MP, Maciel Guerra AT, Guerra Júnior G, Hackel C. Mutations in SRY and WT1 genes required for gonadal development are not responsible for XY partial gonadal dysgenesis. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(1):17-25.
20. Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev*. 2008;2:200-9.
21. Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, *et al.* Mutations in the *NR5A1* gene encoding steroidogenic factor-1 are associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2009;360:1200-10.
22. Johansen ML, Hagen CP, Meyts ER, Kjaergaard S, Petersen BL, Skakkebaek NE, *et al.* 45,X/46,XY Mosaicism: Phenotypic characteristics, growth, and reproductive function—A retrospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 aug;97(8):E1540-9.

23. Martinerie L, Morel Y, Gay CL, Pienkowski C, Kerdanet M, Cabrol S, et al. Impaired puberty, fertility, and final stature in 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenetic patients raised as boys. *Eur J Endocrinol* . 2012;166:687-94.
24. Hsu LY. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet*. 1994 nov 1;53(2):108-40.
25. Caglayan AO, Demiryilmaz F, Kendirci M, Ozyazgan I, Akalin H, Bittmann S. Mixed gonadal dysgenesis with 45,X/46,X,idic(Y)/46,XY,idic(Y) karyotype. *Genet Couns*. 2009;20(2):173-9.
26. Kelly TE, Franko JB, Rogol A, Golden WL. Discordant phenotypes and 45,X/46,X,idic(Y). *J Med Genet*. 1998;35:862-4.
27. Reddy KS, Sulcova V. Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism. *Cytogenet Cell Genet*. 1998;82(1-2):52-7.
28. Farrugia MK, Sebire NJ, Achermann JC, Eisawi A, Duffy PG, Mushtaq I. Clinical and gonadal features and early surgical management of 45,X/46,XY and 45,X/47,XYY chromosomal mosaicism presenting with genital anomalies. *J Pediatr Urol*. 2012 Jan 24;1-6.
29. Chang HJ, Clark RD, Bachman H. The Phenotype of 45,X/46,XY Mosaicism: An Analysis of 92 Prenatally Diagnosed Cases. *Am J Hum Genet*. 1990;46:156-67.
30. Siffroi JP, Bourhis CL, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafoni S et al. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum Reprod*. 2000;15(12):2559-62.

31. Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, Eftychi C, et al. Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. *Am J Med Genet.* 2005;135:145-9.
32. Barros BA, Moraes SG, Coeli FB, Assumpção JG, De Mello MP, Maciel-Guerra AT, et al. OCT4 immunohistochemistry may be necessary to identify the real risk of gonadal tumors in patients with Turner syndrome and Y chromosome sequences. *Hum Reprod.* 2011; 26 (12):3450–5.
33. Chacko E, Graber E, Regelman MO, Wallach E, Costin G, Rapaport R. Update on Turner and Noonan syndromes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012 dec;41(4):713-34.
34. Improda N, Rezzuto M, Alfano S, Parenti G, Vajro P, Pignata C, Salerno M. Precocious puberty in Turner Syndrome: report of a case and review of the literature. *Ital J Pediatr.* 2012 Oct 17;38:54.
35. Maciel-Guerra AT. Síndrome de Turner. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (org.). *Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo.* 2ª edição, Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010; pp.129-139.
36. Marzuki NS, Anggaratri HW, Suciati LP, Ambarwati DD, Paramayuda C, Kartapradja H, Pulungan AB, Harahap A. Diversity of sex chromosome abnormalities in a cohort of 95 Indonesian patients with monosomy X. *Mol Cytogenet.* 2011 oct 12;4:23.
37. Nur Semerci C, Nale Satiroglu-Tufan N, Turan S, Bereket A, Tuysuz B, Yilmaz E, et al. Detection of Y chromosomal material in patients with a 45,X karyotype by PCR method. *Tohoku J. Exp. Med.* 2007;211:243-9.

38. Bondy CA. Heart disease in Turner syndrome. *Minerva Endocrinol.* 2007 dec;32(4):245-61.
39. Carvalho AB, Guerra Júnior G, Baptista MT, de Faria AP, Marini SH, Guerra AT. Cardiovascular and renal anomalies in Turner syndrome. *Rev Assoc Med Bras.* 2010 nov-dec;56(6):655-9.
40. Livadas S, Xekouki P, Fouka F, Kanaka-Gantenbein C, Kaloumenou I, Mavrou A, et al. Prevalence of thyroid dysfunction in Turner's syndrome: a long-term follow-up study and brief literature review. *Thyroid.* 2005 sep;15(9):1061-6.
41. 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 may;16(1):54-63.
42. Jacobsen CM, Cohen LE. Short stature in a phenotypic male caused by mixed gonadal dysgenesis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 sep; 4(9):524-8.
43. Oliveira RM, Verreschi IT, Lipay MV, Eça LP, Guedes AD, Bianco B. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J.* 2009 nov;127(6):373-8.
44. Hildenbrand R, Schröder W, Brude E, Schepler A, König R, Stutte HJ, et al. Detection of TSPY protein in a unilateral microscopic gonadoblastoma of a Turner mosaic patient with a Y-derived marker chromosome. *J Pathol.* 1999 dec;189(4):623-6.
45. Li Y, Vilain E, Conte F, Rajpert-De Meyts E, Lau YF. Testis-specific protein Y-encoded gene is expressed in early and late stages of gonadoblastoma and testicular carcinoma in situ. *Urol Oncol.* 2007 mar-apr;25(2):141-6.

46. Marques-de-Faria AP. Distúrbios da diferenciação gonadal: Disgenesia gonadal mista. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (org.). Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo. 2ª edição, Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010; pp.99-107.
47. Cabrera SM, Alvarez R, Kaefer MN, Eugster EA, Nebesio TD. Unexpected finding of an intact distal vagina in an infant with mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24(9-10):831-3.
48. Preusser S, Diener PA, l'Allemand-Jander D, Schmid S, Leippold T, Brändle M, et al. Scrotal hysterectomy in a male patient with mixed gonadal dysgenesis 46,XY(75%)/45,X(25%). *Urology.* 2007 dec;70(6):1223.e7-9.
49. Ostrow V, De Luca F. Long term follow-up of a child with ambiguous genitalia, mixed gonadal dysgenesis, and unusual mosaicism. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009 sep;22(9):863-6.
50. McKnight KK, Bates GW Jr. Atypical presentation and management dilemma of mixed gonadal dysgenesis. *Fertil Steril.* 2011 jan;95(1):291.e7-9.
51. Tosson H, Rose SR, Gartner LA. Description of children with 45,X/46,XY karyotype. *Eur J Pediatr.* 2012 mar;171(3):521-9.
52. Jensen A, Grewal H, Dean G, Rezvani I. Pediatric surgical images: mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg.* 2003 jun;38(6):988-9.
53. Nava FA, Puerta H. Y-Chromosome microdeletions in 45,X/46,XY patients. *Am J Med Genet A.* 2006 may 15;140(10):1128-30.

54. Kim JW, Park SY, Ryu HM, Lee DE, Lee BY, Kim SY, Park YS, Lee HS, Seo JT. Molecular and clinical characteristics of 26 cases with structural Y chromosome aberrations. *Cytogenet Genome Res.* 2012;136(4):270-7.
55. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *J Biosci.* 2003;28(2):163-168.
56. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Roberts K, Nolten W et al. Defining Regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev.* 1999 nov;53:27-41.
57. Silber SJ. The Y chromosome in the era of intracytoplasmic sperm injection: a personal review. *Fertil Steril.* 2011 Jun 30;95(8):2439-48.e1-5.
58. Pandey LK, Pandey S, Gupta J, Saxena AK. Loss of the AZFc region due to a human Y-chromosome microdeletion in infertile male patients. *Genet Mol Res.* 2010 Jun 29;9(2):1267-73.
59. Pasqualotto FF. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29(2):103-112.
60. Mamoulakis C, Georgiou I, Dimitriadis F, Tsounapi P, Koukos S, Antypas S, et al. Screening for Y chromosome microdeletions in childhood: lack of evidence for a direct association with testicular maldescent. *Andrologia.* 2012 Nov 1; 1-8.
61. Prader A. Der genitalbefund beim pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen syndroms: morphologia, hausfigkeit, entwicklung und verebung der verscheidenen genitalformen. *Helv Paediatr Acta* 1954;9:231-48.

62. Araújo M. Estudo da organização molecular do “cluster” gênico do CYP21 e C4 em famílias com a forma clássica de deficiência da 21-hidroxilase no Brasil [Dissertação]. Campinas(SP): Universidade Estadual de Campinas; 1996.
63. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. 2ª ed.
64. Henegariu O, Hirschmann P, Kilian K, Kirsch S, Lengauer C, Maiwald R, et al. Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia*. 1994 Mar-Apr;26(2):97-106.
65. *MSY Breakpoint Mapper*. Disponível em: <http://breakpointmapper.wi.mit.edu/>. Acesso em: 2012-2013.
66. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003 Jun 19;423(6942):825-37.
67. Li Z, Haines CJ, Han Y. "Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. *J Genet Genomics*. 2008 Apr;35(4):193-9.
68. Lange J, Skaletsky H, Bell GW, Page DC. MSY Breakpoint Mapper, a database of sequence – tagged sites useful in defining naturally occurring deletions in the human Y chromosome. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D809-14.
69. *Ensembl Genome Browser*. Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>. Acesso em: 2011-2013.

70. Jangravi Z, Alikhani M, Arefnezhad B, Sharifi Tabar M, Taleahmad S, Karamzadeh R, et al. A Fresh Look at the Male-specific Region of the Human Y Chromosome. *J Proteome Res.* 2013 Jan 4;12(1):6-22.
71. Betrán E, Demuth JP, Williford A. Why chromosome palindromes?. *Int J Evol Biol.* 2012;2012:207958.
72. Alvarez-Nava F, Puerta H, Soto M, Pineda L, Temponi A. High incidence of Y-chromosome microdeletions in gonadal tissues from patients with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis. *Fertil Steril.* 2008 Feb;89(2):458-60.
73. Fortin F, Beaulieu Bergeron M, Fetni R, Lemieux N. Frequency of chromosome healing and interstitial telomeres in 40 cases of constitutional abnormalities. *Cytogenet Genome Res.* 2009;125(3):176-85.
74. Lin YW, Hsu CL, Yen PH. A two-step protocol for the detection of rearrangements at the AZFc region on the human Y chromosome. *Mol Hum Reprod.* 2006 May;12(5):347-51.
75. Mitra A, Dada R, Kumar R, Gupta NP, Kucheria K, Gupta SK. Y chromosome microdeletions in azoospermic patients with Klinefelter's syndrome. *Asian J Androl.* 2006 Jan;8(1):81-8.
76. Plaseski T, Noveski P, Trivodalieva S, Efremov GD, Plaseska-Karanfilska D. Quantitative fluorescent-PCR detection of sex chromosome aneuploidies and AZF deletions/duplications. *Genet Test.* 2008 Dec;12(4):595-605.
77. Umeno M, Shinka T, Sato Y, Yang XJ, Baba Y, Iwamoto T, Nakahori Y. A rapid and simple system of detecting deletions on the Y chromosome related with male infertility using multiplex PCR. *J Med Invest.* 2006 Feb;53(1-2):147-52.

78. Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility?. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:936569.
79. Kleiman SE, Yogev L, Hauser R, Botchan A, Maymon BB, Paz G, Yavetz H. Expression profile of AZF genes in testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod.* 2007 Jan;22(1):151-8.
80. Vinci G, Raicu F, Popa L, Popa O, Cocos R, McElreavey K. A deletion of a novel heat shock gene on the Y chromosome associated with azoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2005 Apr;11(4):295-8.
81. Tsuei DJ, Hsu HC, Lee PH, Jeng YM, Pu YS, Chen CN, Lee YC, Chou WC, Chang CJ, Ni YH, Chang MH. RBMY, a male germ cell-specific RNA-binding protein, activated in human liver cancers and transforms rodent fibroblasts. *Oncogene.* 2004 Jul 29;23(34):5815-22.
82. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002 Oct;71(4):906-22.
83. Beaulieu Bergeron M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N. Correlation of intercentromeric distance, mosaicism, and sexual phenotype: Molecular localization of breakpoints in isodicentric Y chromosomes. *Am J Med Genet Part A.* 2011;155:2705–2712.
84. Plotton I, Ducros C, Pugeat M, Morel Y, Lejeune H. Transmissible microdeletion of the Y-chromosome encompassing two DAZ copies, four RBMY1 copies, and both PRY copies. *Fertil Steril.* 2010 Dec;94(7):2770.

85. Ravel C, Siffroi JP. Y chromosome structural abnormalities and Turner's syndrome. *Gynecol Obstet Fertil.* 2009 Jun; 37(6):511-8.
86. Svacinova V, Vodicka R, Vrtel R, Godava M, Kvapilova M, Krejcirikova E, *et al.* Sequence recombination in exon 1 of the TSPY gene in men with impaired fertility. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Sep;155(3):287-98.
87. Mekkawy M, Kamel A, El-Ruby M, Mohamed A, Essawi M, Soliman H, *et al.* Isodicentric Y chromosomes in Egyptian patients with disorders of sex development (DSD). *Am J Med Genet Part A.* 2012;158A:1594-1603.
88. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J.* 2009 Apr;50(4):336-47.

# ***ANEXOS***



## 10. ANEXOS

### Anexo I. Parecer do Comitê de Ética

	<b>FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> <a href="http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html">www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html</a>
CEP, 26/10/10 (Grupo II)	
<b>PARECER CEP:</b> N° 1065/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto). <b>CAAE:</b> 0835.0.146.000-10	
<b>I - IDENTIFICAÇÃO:</b>	
PROJETO: “ESTUDO DE MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y EM INDIVÍDUOS COM DISGENESIA GONADAL PARCIAL 46, XY”. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Paula dos Santos INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 14/10/2010 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/10/11 (O formulário encontra-se no site acima).	
<b>II - OBJETIVOS</b>	
Investigar a presença de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos com DGP. Verificar se as alterações do cromossomo Y são a causa da DGP.	
<b>III - SUMÁRIO</b>	
A disgenesia gonadal parcial (DGP) é um raro distúrbio da diferenciação sexual, caracterizado por ambiguidade genital e cariótipo 46,XY com ausência de mosaicismo. Na maioria dos casos, a etiologia dessa condição é desconhecida, embora estudos recentes tenham demonstrado a ligação entre disgenesia gonadal mista, infertilidade e microdeleções do cromossomo Y, com pronunciada instabilidade no tecido gonadal. Considerando estas informações, o presente estudo propõe realizar a análise molecular de pacientes com DGP, em acompanhamento no ambulatório GIEDDS do Hospital de clínicas- Unicamp. A técnica utilizada será PCR, com posterior eletroforese do material.	
<b>IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES</b>	
Projeto de Mestrado, contemplando adequadamente todos os itens necessários. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequado.	
<b>V - PARECER DO CEP</b>	
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.	
Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP	FONE (019) 3521-8936 FAX (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br
- 1 -	

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

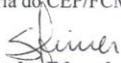
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII – DATA DA REUNIÃO

\* Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de outubro de 2010.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP

## Anexo II. Adendo submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa



CEP, 23/08/11.  
(PARECER CEP: N° 1065/2010)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa)

### PARECER

#### I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y EM INDIVÍDUOS COM DISGENESIA GONADAL PARCIAL 46,XY”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Paula dos Santos

#### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui duas infecções de amostras (fenótipos de Síndrome de Turner e Disgenesia Gonadal Mista); a nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e altera o título para “ESTUDO DE MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y EM INDIVÍDUOS COM DISGENESIA GONADAL E LINHAGEM CELULAR 46,XY”, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de agosto de 2011.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
[cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

### Anexo III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 1.

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da pesquisa:** Estudo de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos com disgenesia gonadal parcial 46,XY.

**Responsáveis:** Ana Paula dos Santos\* (Mestranda), Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra\* (orientadora) e Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (co-orientadora)#.

\*Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, responsáveis pela apresentação do TCLE; # Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, UNICAMP

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Registro Hospitalar: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

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

Fone: ( ) \_\_\_\_\_

Acompanhante: \_\_\_\_\_

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Contato: \_\_\_\_\_

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO:** Estamos fazendo um estudo sobre alterações na estrutura do cromossomo Y em pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial nos quais ainda não foi descoberta a origem do problema. O estudo envolve a identificação da perda de pequenos segmentos desse cromossomo, que é responsável por um correto desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos. A perda de partes do cromossomo Y (ou microdeleções) já foi identificada em outros quadros clínicos relacionados à formação testicular, mas ainda não foi investigada em pessoas com Disgenesia Gonadal Parcial. Sendo assim, o estudo desse cromossomo por meio de técnicas de genética molecular pode ser capaz de identificar se, em pacientes com Disgenesia Gonadal Parcial, existem microdeleções que possam ser apontadas como a origem desse quadro.

**PROCEDIMENTO:** Será realizada uma breve entrevista seguida de coleta de sangue para o estudo de genética molecular.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Mínimos, relacionados à coleta de sangue.

**VANTAGENS:** Obtenção de conhecimento sobre a presença de microdeleções do cromossomo Y que possam ser a causa da Disgenesia Gonadal Parcial.

**SIGILO:** As informações sobre o resultado dos exames serão fornecidas apenas durante a consulta médica; se utilizadas em congressos ou publicações médicas, serão excluídos os nomes dos pacientes.

**FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:** Garantimos aos pacientes e seus familiares resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida sobre os assuntos relacionados à pesquisa, sendo fornecidas, ainda, informações atualizadas durante o estudo. Maiores esclarecimentos podem ser fornecidos por:

Dr. Andréa Trevas Maciel Guerra – tel: (19) 3521-8907

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello – tel: (19) 3521-1146

Ana Paula dos Santos (responsável pelo exame de DNA) – tel: (19) 8907

Comitê de Ética em Pesquisa – Unicamp – (19) 3521-8936, cep@fcm.unicamp.br

**RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:** A participação neste estudo é livre, podendo o paciente recusá-la a qualquer momento, sem que haja comprometimento do atendimento médico que recebe ou receberá.

Aceito, desta forma, participar do estudo

Campinas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

Ambulatório: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_

Nome e RG do responsável legal

\_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito da pesquisa ou de seu responsável legal

\_\_\_\_\_

Obs.: Uma cópia deste termo de consentimento será entregue ao paciente ou seu responsável.

## Anexo IV. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da pesquisa:** Estudo de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos com mosaico 45,X/46,XY.

**Responsáveis:** Ana Paula dos Santos<sup>1,2</sup> (Mestranda), Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra<sup>1</sup> (orientadora) e Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (co-orientadora)<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, responsáveis pela apresentação do TCLE; <sup>2</sup>Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, UNICAMP.

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Registro Hospitalar: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

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

Fone: ( ) \_\_\_\_\_

Acompanhante: \_\_\_\_\_

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Contato: \_\_\_\_\_

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO:** Estamos fazendo um estudo sobre alterações na estrutura do cromossomo Y em pacientes com Síndrome de Turner e Disgenesia Gonadal Mista. O estudo envolve a identificação da perda de pequenos segmentos desse cromossomo, que é responsável por um correto desenvolvimento dos órgãos genitais. Sendo assim, o estudo desse cromossomo por meio de técnicas da genética molecular pode ser capaz de identificar se existem microdeleções que possam ser apontadas como a origem desses quadros.

**PROCEDIMENTO:** Será realizada uma breve entrevista seguida de coleta de sangue para o estudo de genética molecular.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Mínimos, relacionados à coleta de sangue.

**VANTAGENS:** Obtenção de conhecimento sobre a presença de microdeleções do cromossomo Y que possam ser a causa da alteração cromossômica (mosaicismo). Caso essas alterações sejam encontradas, o mesmo exame será oferecido aos pais dos pacientes para verificar se há risco de repetição do problema.

**SIGILO:** As informações sobre o resultado dos exames serão fornecidas apenas durante a consulta médica; se utilizadas em congressos ou publicações médicas, serão excluídos os nomes dos pacientes.

**FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:** Garantimos aos pacientes e suas famílias resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida sobre os

assuntos relacionados à pesquisa, sendo fornecidas, ainda, informações atualizadas durante o estudo. Maiores esclarecimentos podem ser fornecidos por:

Dr. Andréa Trevas Maciel Guerra – tel: (19) 3521-8907

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello – tel: (19) 3521-1146

Ana Paula dos Santos (responsável pelo exame de DNA) – tel: (19) 3521-8907

Comitê de Ética em Pesquisa – Unicamp – (19) 3521-8936, cep@fcm.unicamp.br

**RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:** A participação neste estudo é livre, podendo o paciente recusá-la a qualquer momento, sem que haja comprometimento do atendimento médico que recebe ou receberá.

Aceito, desta forma, participar do estudo

Campinas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

Ambulatório: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Nome e RG do responsável legal: \_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito da pesquisa ou de seu responsável legal: \_\_\_\_\_

Obs.: Uma cópia deste termo de consentimento será entregue ao paciente ou seu responsável.

