

BC/13830
IB/80705



JANETE MARIA CERUTTI

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAGMENTOS
CROMOSSÔMICOS COM SONDAS DE DNA Y-ESPECÍFICAS
EM PACIENTES COM ESTIGMAS TURNERIANOS

*Este exemplar corresponde a uma
fina de ser depositada pela candidata
Janete Maria Cerutti - aprovada pela
comissão julgadora Solange Bento Farah 8/3/91*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de Genética.

ORIENTADOR: Profa.Dra. Solange Bento Farah

T/UNICAMP

C337_d

Campinas - SP

1991



CLASSIF.	T
AUTOR	E 337d
V.	EX.
TOMBO BC/13830	
1029 EB	

CM00020749-9

O presente trabalho realizado no laboratório de DNA do Depto. de Genética Médica (FCM- UNICAMP), contou com o apoio da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) , do Fundo de Apoio à Pesquisa (FAP) da Unicamp, do Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FINEP).

... O homem não é apenas ele próprio, mas uma combinação de tantos quantos conheceu, e retém em si próprio muitos dos valores alheios...

Dedico

A Edi e Lourdes, pais de toda
grandeza, por tudo que da vida me
ensinaram.

A Prof. Dra. Solange Farah
pela oportunidade de fazer ciência, pelo
carinho com que conduziu a orientação
deste trabalho e, pela amizade.

Agradeço

A todos aqueles que estiveram
comigo neste tempo de aprendizado
intenso, dando muito de si para tornar
real este fato.

Agradecimentos Especias

Aos Professores Doutores Thomaz R. Gollop, Fernando F. Costa e Christine Hackel pelo carinho e disponibilidade com que me acolheram e, principalmente, pelas valiosas sugestões .

As Professoras Doutoradas Joyce A.D. de Andrade, Ieda T.N. Vereschi e Ângela de Castro pela análise das pacientes e posterior encaminhamento.

Aos docentes do Depto. de Genética Médica da Unicamp e, em especial ao Prof.Dr. Bernardo Beiguelman, pelo carinho, constante apoio e, principalmente por acreditarem em meu trabalho.

A todos professores e colegas da pós-graduação pela convivência amiga e enriquecedora.

Aos funcionários do Depto. de Genética Médica, Paulinho, Henry, Jô, Sônia, Geralda, Roberto, Toninho, Suzete, Claudinha, Maurício, Carlos, pela amizade e colaboração.

A Prof. Dra. Denise Norato pelo auxílio na digitação da tese.

A Dra. Maricilda Palandi de Mello, com quem muito da ciência aprendi, pelas sugestões e amizade

As secretárias da pós-graduação, que tão brilhantemente desempenharam sua função, pelo carinho que sempre me recepcionaram.

A Profa. Dra. Fátima Sonati e a Profa. Carmem Martins pelo convívio ... dicas ... amizade.

A Suzete Maria Cerutti, irmã... Companheira... por tudo... desde sempre e, pelo que significa para mim sua existência.

A amiga Clarisa Ramos que tão maravilhosamente se fez presente em todos os meus momentos.

A Edi Lúcia Sartoratto pela grandiosa colaboração na arte final deste trabalho, pelo incentivo desde o primeiro momento e, sobretudo, pela amizade.

A " Mada " que, embora nos bastidores, muito colaborou para a realização deste trabalho.

A Rogério Carlos Novais, que em nome da ciência se faz ausente, pelo coleguismo e carinho.

A Marilda pelo auxílio nos momentos finais .

A Nilma pelo seu coleguismo e carinho.

A toda minha família que independente de tudo, sempre me apoiou.

Ao amigo de agora, mas não menos querido, Bruno, pelo carinho nestes dias tão difíceis... me cativou.

Aos novos companheiros de pesquisa
Silvia, Ly e Dulce pela força e amizade.

A Heraldo Garmes pelo encaminhamento dos
pacientes, auxílio e amizade.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
Determinação e Diferenciação sexual	01
Cromossomo Y	05
Descrição de Sondas Y-específicas	08
Sequências Repetidas	08
Sequências de Cópias Simples e Genes do Cromossomo Y	10
Região de Determinação do Sexo	13
Etiologia do Gonadoblastoma	20
Aplicações de Sondas Y-específicas em Diagnóstico Clínico	26
OBJETIVOS	30
PACIENTES E METODOLOGIA	31
Pacientes	31
Metodologia	36
Extração de DNA de Sangue Total	36
Digestão de DNA	37
Eletroforese de DNA Genômico digerido	38
Transferência	38
Dot blot	39
Sondas Utilizadas	40
Amplificação e Extração de fragmentos	43
Marcação das Sondas	43
Hibridização	44

RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÕES	71
RESUMO	72
SUMMARY	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I	98
ANEXO II	114

INTRODUÇÃO

Determinação e Diferenciação Sexual

O mecanismo, pelo qual ocorre a determinação do sexo nos mamíferos, tem sido fator de especulação desde o tempo de Aristóteles. Até 1900 foi generalizada a idéia de que, no embrião humano, o sexo era determinado por fatores externos, como nutrição materna. Desde a descoberta das leis de Mendel sabe-se, no entanto, que o sexo determinado pela constituição cromossômica. (McClung, 1902; Stevens, 1905; Wilson, 1905; Morgan, 1910).

A existência dos cromossomos sexuais X e Y foi demonstrada citogeneticamente em 1923 (Painter, 1923). Entretanto, somente em 1959 (Jacobs & Strong, 1959), pelo estudo de indivíduos com anormalidades na constituição dos cromossomos sexuais, revelou-se o verdadeiro papel do cromossomo Y. O embrião humano que possui um cromossomo Y no seu genoma, independente do número de cromossomos X, apresentar desenvolvimento sexual masculino, enquanto que, na ausência do cromossomo Y o embrião terá desenvolvimento sexual feminino.

Portanto, a determinação do sexo começa com um impulso genético que provocará um deslocamento numa das direções alternativas do desenvolvimento da gônada primordial, também denominada gônada indiferente. Assim, o primeiro passo, sob o controle dos genes presentes nos cromossomos sexuais, envolve a diferenciação gonadal.

A gônada primitiva, composta de córtex e medula, no embrião humano com constituição cromossômica XY, inicia sua diferenciação testicular passando a parte medular a prevalecer sobre a cortical, que se atrofia, esboçando assim o testículo fetal. Esta diferenciação começa nas saliências gonadais, duas regiões originadas da condensação do mesênquima indiferenciado, no interior das quais estão presentes as células sexuais primitivas (Gropp & Ohno, 1966; Jirsek, 1976; German, 1988).

As transformações consistem, basicamente, na subdivisão da gônada em cordões celulares - cordões testiculares - que transformar-se-ão, posteriormente, em tubos seminíferos os quais possuem, no seu interior, dois tipos de células: as células da linhagem germinativa, oriundas das células sexuais primitivas, e as células de Sertoli. As células de Sertoli começam a produzir hormônio antimulleriano ou fator de regressão mulleriano, primeiramente descrito em mamíferos por Jost (Jost, 1947), que por difusão celular, suprimem o desenvolvimento dos ductos de Muller e induzem o desenvolvimento dos ductos de Wolff.

A partir da 9ª semana, as células de Leydig começam a proliferar do tecido intersticial, e inicia-se a produção de hormônios androgênicos, dentre os quais, a testosterona, que é fundamental para a diferenciação sexual masculina. Os testículos deixam de ser chamados de

embrionários e passam a ser designados testículos fetais (Beiguelman, 1982).

O dismorfismo sexual é, em últimas palavras, um dismorfismo gonadal e podemos afirmar que a determinação do sexo, não só na espécie humana mas em todos os mamíferos, é sinônimo de determinação do testículo. Em oposição ao que ocorre nos embriões com predestinação masculina, a diferenciação sexual feminina é passiva e, decorre portanto, da ausência do cromossomo Y, transformando a gônada primordial em ovário.

A formação da genitália externa é o resultado da diferenciação dos ductos genitais. O desenvolvimento dos ductos de Wolff e a diferenciação da genitália externa masculina, dependem de andrógenos produzidos pelo testículo fetal. Por outro lado, a diferenciação dos ductos de Muller e, o conseqüente desenvolvimento da genitália externa feminina, não envolvem controle gonadal (German et al., 1973; Simpson, 1975; Jirásek, 1976).

Todas as características do dismorfismo sexual são dependentes da constituição cromossômica da gônada. A execução dessa decisão binária, a diferenciação sexual, é uma cadeia de processos de desenvolvimento pela qual o sexo genético se traduz nas estruturas, nas funções e nos padrões de comportamento característico. Esse processo fisiológico complexo envolve o produto de muitos genes, alguns, autossômicos (Jost, 1953).

O papel de crucial importância do cromossomo Y para transformação da gônada bissexual em testículo é ressaltado pelos indivíduos com cariótipo 47,XXY, 48,XXYY, 48,XXXYY, 49,XXXYY e 49,XXXXY. Tais indivíduos apresentam testículos, muito embora sem produção de espermatozóides, e genitais internos e externos masculinos. Por outro lado, nos indivíduos sem cromossomo Y mas com vários cromossomos X, ocorre desenvolvimento de ovários e genitália feminina (Simpson, 1976; German, 1988).

Nos fetos com monossomia do cromossomo X (cariótipo 45,X) ocorre desenvolvimento de ovário e genitália feminina mas as células germinativas desintegram-se prematuramente, nada mais restando do que gônadas vestigiais. Outros pacientes mais raros, são os homens 46,XX e mulheres 46,XY onde ocorreu "reversão sexual". As mulheres 46,XY são fenotipicamente femininas, mas com gônadas vestigiais similares àquelas com cariótipo 45,X (German et al., 1988).

Embora seja o braço curto a porção do cromossomo Y que está relacionada com a indução testicular da gônada bissexual, acredita-se que o braço longo deste cromossomo, ou pelo menos sua parte proximal ao centrômero, seja essencial para a maturação e proliferação das células germinativas fetais. Desse modo, a falta desta região determina uma alteração testicular análoga à provocada pela monossomia do cromossomo X nas mulheres conduzindo à

formação de testículos com canais seminíferos vazios de células germinativas (Tiepolo & Zuffardi, 1976).

Além do papel fundamental que o cromossomo Y desempenha na determinação primária do sexo, até a última década muito pouco era conhecido sobre sua estrutura genética. Com o isolamento de sequências de DNA específicas para o cromossomo Y, tornou-se possível o estudo detalhado de algumas regiões cromossômicas, contribuindo, desta forma, para o esclarecimento do processo de diferenciação sexual masculina.

Cromossomo Y

O cromossomo Y, um dos menores e mais especializados, compreende aproximadamente 1% do genoma humano (Ferguson-Smith, 1974).

Estudos citogenéticos demonstraram que o cromossomo Y consiste de uma porção eucromática e outra heterocromática (Capersson, Lomakka & Zech, 1971; Schempp & Muller, 1982). A porção eucromática inclui a região proximal do braço longo, além do braço curto, e a heterocromatina compreende a região centromérica e a porção distal do braço longo. As técnicas citogenéticas de coloração com quinacrina diferenciam no braço longo a eucromatina não fluorescente (nf), banda Yq11, da heterocromatina fluorescente (f), banda Yq12 (Paris, Conference, 1975). (Fig. 1A)

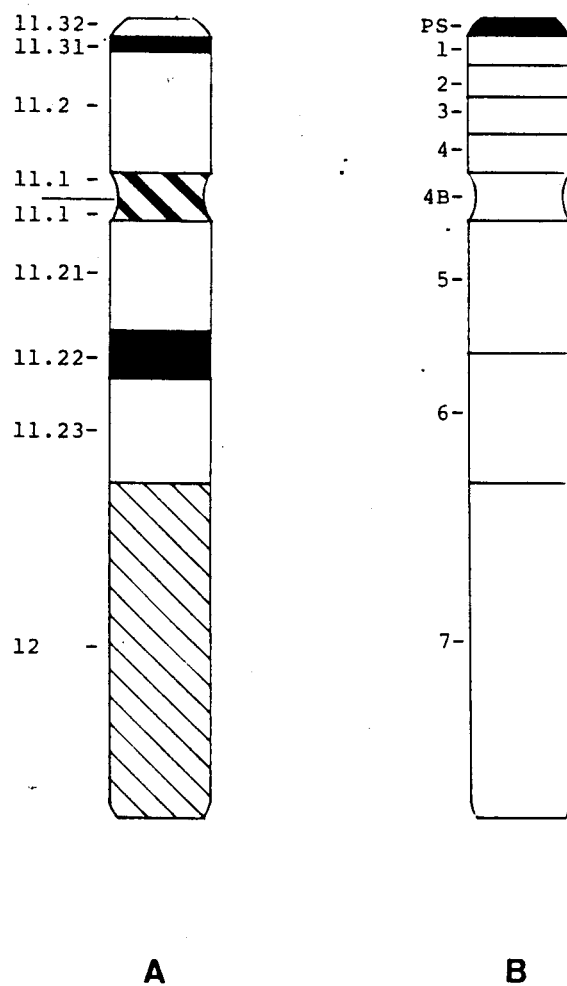


Figura 1. Representação esquemática de bandas cromossômicas no cromossomo Y observadas pelo método de coloração com banda Q (A). Representação do mapa físico do cromossomo Y, segundo Vergnaud et al. 1986 (B).
PS - Pseudoautossômica.

Sendo o conteúdo total do genoma humano de 6×10^9 pb, o cromossomo Y contém aproximadamente 60×10^6 pb. A heterocromatina, composta de sequências de DNA altamente repetidas - DNA sat, constitui aproximadamente 70% deste cromossomo e parece ser desprovida de genes funcionais. O segmento heterocromático varia em tamanho entre os diferentes grupos raciais e entre diferentes indivíduos do mesmo grupo étnico.

Os 30% remanescentes, aproximadamente $15-20 \times 10^6$ pb, estão localizados na porção eucromática que é geneticamente ativa. Esta região apresenta genes essenciais para diferenciação gonadal além daqueles relacionados com a espermatogênese. (Kunkel, et al., 1976; Cooke, 1976; Tiepolo & Zuffardi, 1976; Zuffardi, 1982 ; Wolfe, et al., 1985).

Até a última década, o estudo do cromossomo Y se restringia às técnicas de cariotipagem e bandeamento. Entretanto, com o desenvolvimento de metodologia da clonagem gênica tornou-se possível o isolamento e caracterização de sequências específicas para o cromossomo Y. Estas sequências são usualmente selecionadas a partir de um banco genômico (Bishop et al., 1984) ou cromossômico preparado pelo método de citometria de fluxo (Muller et al., 1986b).

Vergnaud et al. (1986), analisaram o DNA de um grande número de indivíduos com alterações estruturais do cromossomo Y, definidas citogeneticamente, com uma coleção de sondas Y-pecíficas. Os resultados obtidos, com base na

porção do cromossomo Y, presente em cada indivíduo, permitiu a construção de um mapa físico ou mapa de deleção que divide o cromossomo Y em sete intervalos (Fig. 1B).

Descrição de Sondas de DNA Y-específicas

Sequências Repetidas

A evolução dos eucariotos tem sido acompanhada por um enorme aumento no tamanho do seu genoma (Britten & Davidson, 1969). Esse aumento é o resultado da expansão de sequências de DNA que não codificam nenhuma proteína estrutural (Galau et al., 1976). Embora algumas dessas sequências de DNA, "não codificante", desempenhem papel fundamental na regulação da expressão gênica e estrutura dos cromossomos, a maioria delas tem função desconhecida.

A caracterização de sequências repetidas foi feita primeiramente por Cooke (1976). Comparando-se DNA de indivíduos do sexo masculino e feminino digerido com enzima de restrição Hae III, os autores observaram, em gel corado com brometo de etídio, duas bandas de 3,4 e 2,1 Kb, somente quando o cromossomo Y estava presente. Bandas Y-específicas aparecem com o dobro da intensidade em linhagens celulares XYY (Cooke, 1976; Cooke & McKay, 1978).

Além disso, constituem 70% do DNA do cromossomo Y e são compostas de sequências repetidas *em tandem* (Kunkel et al., 1976, 1977).

Hibridizações *in situ* indicaram que grande parte das sequências 2,1 Kb, definidas no loco DYZ2 encontram-se na porção heterocromática do cromossomo Y (Cooke et al., 1982), embora Young et al. (1983) tenham sugerido que 30% dessas sequências pudessem ser encontradas na região Yq11. A sequência 3,4 Kb, loco DYZ1, encontra-se espalhada por toda a porção fluorescente, Yq12-qter, (Bostock et al., 1978; Szabo et al., 1979).

Uma vez que as sequências 3,4 Kb e 2,1 Kb são altamente repetidas e Y-específicas, elas têm sido isoladas, clonadas e utilizadas como sondas para diagnóstico clínico (Lau et al., 1984; McDonough et al., 1986).

Outra sonda importante em estudos clínicos reconhece o DNA satélite alféide, uma família de sequências com aproximadamente 170pb, encontrado próximo ao centrômero de todos os cromossomos. No cromossomo Y, este conjunto de sequências alféides repetidas, apresenta uma organização diferente, que permite seu reconhecimento pelo padrão observado após a digestão com enzima de restrição.

A partir de um banco do cromossomo Y construído em cosmídio, foi isolada a sonda Y97, a qual detecta, em condições de hibridização de alta estringência, um fragmento Eco RI de 5,5 Kb Y-específico derivado das sequências

repetidas alfoídes (Wolfe et al., 1985).

Além dessas sequências altamente repetidas, já bem caracterizadas, outras sequências com repetição moderada têm sido isoladas (Affara et al., 1986; Muller et al., 1986a, b,c; Vergnaud et al., 1986; Andersson et al., 1986).

A sonda pDP 105, por exemplo, foi isolada de um banco cromossômico e detecta sequências Y-específicas repetidas no loco DYZ4. Em digestões com TaqI reconhece, no DNA genômico de origem masculina, um fragmento de 2,5 Kb no intervalo 3 do Yp (pDP105A) e, um outro fragmento de 5,2 Kb no intervalo 6 do Yq (pDP105B). Após digestão com Eco RI a sonda pDP 105 detecta um fragmento Y-específico de 3,0 Kb (HGMB, 1985; Andersson et al., 1986; Ganshirt-Ahlert et al., 1987; Gal et al., 1987; Andersson et al., 1988).

Sequências de Cópias Simples e Genes do Cromossomo Y

Devido a existência de uma grande proporção de sequências repetidas localizadas na heterocromatina do cromossomo Y, e de um número razoável de sequências eucromáticas homólogas ao cromossomo X e/ou autossomos, poucas sequências de cópias simples específicas e genes funcionalmente ativos foram isolados do cromossomo Y.

Pode-se classificar as sequências Y-específicas de duas maneiras: sequências encontradas somente no DNA genômico masculino, sem representação no DNA genômico feminino, e aquelas representadas no genoma masculino e feminino, mas com padrão de hibridização diferente.

As primeiras sondas Y-específicas foram obtidas por Bishop et al. (1983). Utilizando linhagens celulares híbridas que continham, pelo menos, uma cópia do cromossomo Y humano dentro de um conjunto cromossômico de roedor clonado em cosmídio, os autores isolaram trinta sondas, das quais, seis apresentavam-se específicas para o cromossomo Y. Além dessas, outras quatro sequências encontravam-se representadas no DNA genômico masculino e feminino, mas com padrão de hibridização diferente.

Mais tarde, a triagem de outros bancos construídos a partir de células híbridas roedor-humano (Wolfe et al., 1984; Burk et al., 1985) ou do cromossomo Y isolado pelo método de citometria de fluxo (Lalande et al., 1984; Muller et al., 1986b; Nishioka & Lamothe, 1987), permitiu a obtenção de novas sequências específicas para diferentes regiões do cromossomo Y. Entretanto, o número de genes identificados nesse cromossomo é até hoje muito menor do que seria o esperado.

No homem, a primeira sugestão da existência de uma região pseudoautossômica, veio da localização do gene MIC2 - o primeiro gene clonado do cromossomo Y.

O gene MIC2 codifica um antígeno de superfície celular de função desconhecida, que é identificado pelo anticorpo monoclonal 12E7, produzido por Levy et al. (1979). Este anticorpo reage com um antígeno de superfície celular encontrado em todas as células humanas testadas, com exceção dos espermatozóides (Goodfellow, 1983).

A localização regional do MIC2 no cromossomo Y foi feita por hibridização *in situ* (Geller, Shapiro & Mohandas, 1986) usando a sonda pSG1 (Buckle et al., 1985). Esta sonda também serviu para confirmar a localização deste gene no cromossomo X, dentro da região de pareamento X-Y (Xpter-Xp22.32) (Goodfellow, 1983).

O gene MIC2 escapa à inativação nos cromossomos X de células femininas. Em consequência disso este gene é herdado em dose dupla em indivíduos XX e XY, e em dose única em indivíduos XO, resultando numa deficiência do produto primário do gene (Burgoyne, 1982).

Goodfellow et al. (1986) clonaram o gene MIC2 e, as sondas têm sido usadas para demonstrar que o MIC2 participa dos processos de recombinação durante a meiose masculina, mas este evento ocorre com uma frequência bem menor do que com outros marcadores pseudoautossômicos.

O mapa meiótico da região pseudoautossômica indicou que o MIC2 é o locus conhecido mais próximo à região de determinação do sexo (Goodfellow et al., 1986).

Outro gene localizado no cromossomo Y é o gene da esteróide sulfatase (STS). No homem ele difere do seu homólogo encontrado em ratos, que é pseudoautossômico (Craig & Tolley, 1986). Embora ligado à região pseudoautossômica do cromossomo X, no cromossomo Y o gene STS aparece como um pseudogene no braço longo (Yq) (Fraser et al., 1987).

O verdadeiro interesse em se isolar sequências específicas e genes do cromossomo Y, é o de resolver os problemas referentes à biologia da determinação sexual no homem.

Região da Determinação do Sexo

A natureza bioquímica do fator que determina os aspectos do dimorfismo sexual - Fator de Determinação Testicular (TDF) - tem sido objeto de muitas pesquisas.

O antígeno H-Y foi a primeira molécula associada à determinação primária do sexo. A partir da observação que fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 rejeitavam transplantes de pele de machos de sua própria linhagem, sugeriu-se a existência de um antígeno de superfície celular exclusivo do sexo masculino. Uma vez que em uma linhagem isogênica todas as diferenças genéticas podem ser atribuídas ao cromossomo Y, o antígeno responsável pela rejeição é

denominado H-Y, significando histocompatibilidade do Y (Billicham & Silvers, 1958).

Wachtel et al. (1974, 1975) observaram que este antígeno, inicialmente definido como macho-específico é, na verdade, específico para o sexo heterogamético na maioria dos vertebrados.

Durante aproximadamente dez anos, apoiou-se a idéia, de que, o antígeno H-Y seria o produto primário do gene que induz a gônada indiferenciada a se desenvolver como testículo ou ovário no sexo heterogamético (Wachtel et al., 1975), ou seja, foi proposto que o H-Y seria o TDF. Entretanto, devido a observação de que ocorria diferenciação testicular em ratos mesmo na falta de antígeno H-Y, esta hipótese foi abandonada (McLaren et al., 1984).

Além disso, foi observado que o H-Y e o TDF são codificados ou regulados por regiões diferentes do cromossomo Y (Simpson & Gordon, 1987).

A análise de indivíduos que apresentavam "reversão sexual" permitiu localizar o TDF, segundo o mapa de Vergnaud et al. (1986), no intervalo 1, adjacente à região pseudoautossômica (Page et al., 1987).

Pela técnica de *chromosome walking*, os autores puderam restringir a menor parte do intervalo 1 que continha o loco TDF. Assim, demonstrou-se que, o intervalo A2 contém sequências de DNA essenciais à determinação gonadal. Essa porção de 140 Kb, presente somente no DNA de indivíduos com diferenciação sexual masculina, foi isolada e clonada.

Havia fortes indicações de que o clone pDP1007, que contém um fragmento de 1,3 Kb derivado do intervalo 1A2, era o exon de um gene. Este gene foi denominado ZFY - proteína com dedos de zinco (proteína *zinc-finger* ligada ao Y) - e codifica uma proteína rica em domínios finger, com distribuição das cisteínas e histidinas *em tandem*.

A presença de domínios *finger* foi primeiramente descrita em rãs ligada ao fator de transcrição IIIA, sugerindo que esta proteína liga-se de maneira específica ao DNA ou RNA atuando na regulação da transcrição (Page et al., 1987).

Surpreendentemente, foi encontrado no braço curto do cromossomo X um gene homólogo, denominado ZFX. Embora sem função biológica é pouco provável que o ZFX seja um pseudogene. Dado o alto grau de conservação desses dois genes entre os mamíferos placentários, é possível que tenham evoluído de um único gene ancestral.

Em ratos, parece existir quatro locos homólogos ao ZFY humano. Um localizado no cromossomo X que é denominado Zfx, dois homólogos ao ZFY (Zfy-1 e Zfy-2) e o quarto é autossômico.

Se o ZFY fosse o fator de determinação do sexo ligado ao cromossomo Y, então deveriam ser considerados novos modelos de determinação do sexo, que se adaptassem à existência de um gene relacionado a este, no cromossomo X (Page et al., 1987).

Dois anos após a descoberta do ZFY, Koopman et al. (1989) questionaram o verdadeiro papel deste gene na determinação do sexo. Eles estudaram a expressão do Zfy-1 e do Zfy-2 em células germinativas de ratos e observaram que o seu produto não era necessário ao desenvolvimento masculino normal. Mapas de deleção confirmaram a hipótese de que o Zfy-2 não está ligado à determinação do sexo (Mardon & Page, 1989).

Palmer et al. (1989), descreveram quatro indivíduos com "reversão sexual XX" e que apresentavam sequências de DNA Y-específicas, mas que não incluíam a região ZFY definida por Page et al. (1987) e detectada pela sonda pDP1007. A presença de sequências derivadas do cromossomo Y, reconhecidas pelas sondas HF0.2, H2.1 e P0.9, indicava que o TDF deveria estar localizado em uma região de 60 Kb próxima à região pseudoautossômica.

Sinclair et al. (1990) estenderam estes achados e testaram a hipótese de que a região imediatamente adjacente à pseudoautossômica contém o TDF, utilizando as sondas pY 4.1, pYH8 e pYR0.4 na análise do genoma de homens XX e ZFY negativos. Os resultados sugeriram que o TDF estava localizado num limite de 35 Kb da região pseudoautossômica (Fig.2).

O DNA desta região foi então subclonado em fragmentos de aproximadamente 4 Kb. Estes fragmentos foram clivados, novamente subclonados e cada pequeno fragmento usado como sonda. Destes fragmentos, sete detectam

sequências Y-específicas de cópia simples mas somente o clone pY53.3 reconhece sequências Y-específicas altamente conservadas em mamíferos .

A investigação do pY53.3 (2,1Kb) revelou a existência de duas fases de leitura aberta (*open reading frame*). A maior, composta de 223 aminoácidos, codifica uma proteína com características que sugerem também um papel na regulação transcricional. Este gene, localizado no cromossomo Y, definido pela sonda pY53.3, foi denominado SRY (sex-determining region Y).

Esta sonda, ao ser hibridizada com RNA extraído de diversos tecidos (ovário, testículo, pulmão, rim), mostrou-se positiva somente para linhagens celulares extraídas de testículos. Além disso, sequências homólogas ao SRY foram localizadas no cromossomo Y de todos os mamíferos testados. Por essas razões, o SRY é hoje o mais forte candidato a ser o TDF.

Gubbay et al. (1990), descreveram uma sequência, presente no cromossomo Y de ratos, que contém um "*open reading frame*" homólogo ao encontrado no SRY humano. O gene presente em ratos foi denominado Sry e, dos tecidos de origem masculina analisados, expressa-se somente em testículo adulto e no sulco urogenital. Se o Sry está realmente envolvido na diferenciação do testículo, isto ainda não está claro mas, da mesma forma, os autores acreditam que o Sry seja um forte candidato ao Tdy (gene existente no rato homólogo ao TDF humano).

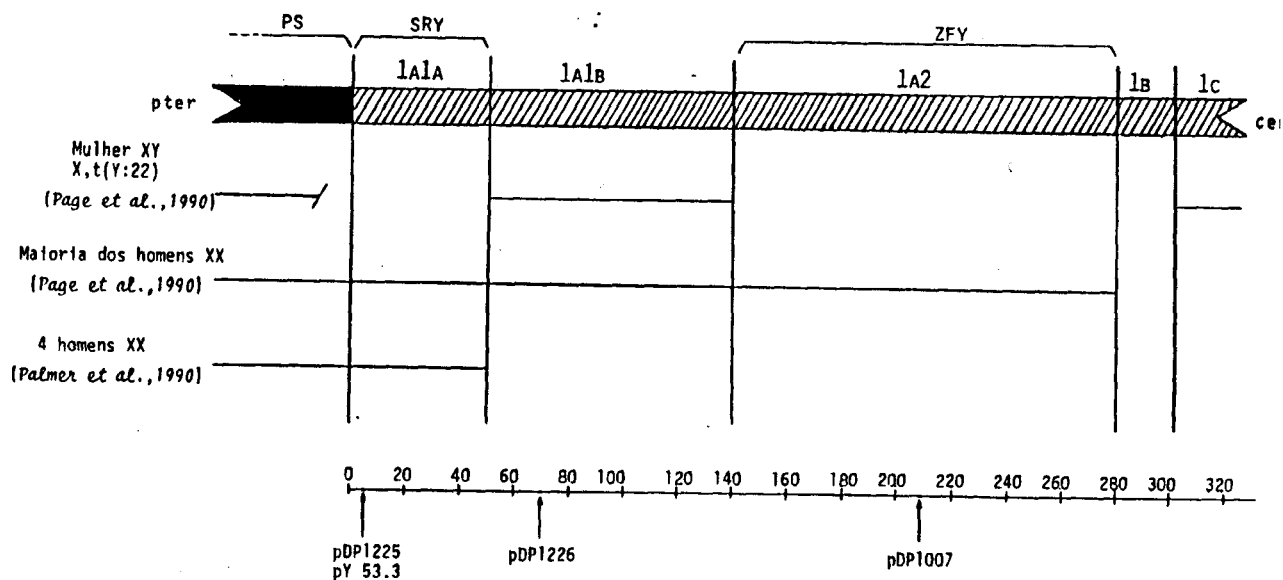


Figura 2. Análise de deleção determinada por Southern blot em pacientes com "reversão sexual". Representação esquemática do braço curto distal do Y no sentido do telômero (pter) para o centrômero (cen). As barras indicam a porção do Y presente. A escala apresenta as distâncias em Kb e a região detectada por cada sonda (Page et al., 1989).

Diante disto Page et al. (1990), reavaliaram um caso de "reversão sexual XY" [X,t(Y;22)] e, observaram que nesta paciente estava ausente um fragmento Hind III de 5,5 Kb, detectado pela sonda pDP1225. Este fragmento é derivado de uma região de aproximadamente 10 Kb próxima à porção pseudoautosômica, que vem a ser a mesma região identificada pelo clone pY53.3. Por outro lado, a paciente apresentava um fragmento Taq I de 8 Kb, detectado pela sonda pDP1226, derivada de uma região de aproximadamente 45 Kb imediatamente adjacente à região pseudoautosômica (Fig.2).

Todos esses resultados excluem o ZFY como sendo o gene responsável pela determinação do sexo. No entanto, acredita-se que este gene, juntamente com o ZFX, sejam necessários para assegurar que o gene da determinação do testículo deestímule o desenvolvimento do ovário (Burgoyne, 1989).

Além da sua função na determinação do sexo, o cromossomo Y desempenha um importante papel na espermatogênese. Mapas de deleção tem localizado o gene da espermatogênese humana na porção eucromática do braço longo do cromossomo Y (Tiepolo & Zuffardi, 1976; Fryns et al., 1985). O efeito direto do cromossomo Y nas linhagens germinativas ocorre com o início dos ciclos espermatogênicos, aproximadamente uma semana após o nascimento, quando um gene no cromossomo Y atua nas espermatogônias permitindo o desenvolvimento do processo meiótico. (Burgoyne, 1987).

Page (1986), sugeriu, baseado nestas hipóteses, que o gene responsável pela espermatogênese em homens normais, na presença de gônadas disgenéticas, estranhamente as predispõe a desenvolver gonadoblastoma. Este gene foi denominado GBY (locos do GonadoBlastoma no cromossomo Y).

Etiologia do Gonadoblastoma

O termo gonadoblastoma, foi primeiramente usado por Scully (1953), para designar uma forma de neoplasia histologicamente definida pela ocorrência de ambas as células germinativas e elementos derivados dos cordões sexuais, que se assemelham às células da granulosa ou de Sertoli e, às vezes, a elementos do estroma que parecem células luteínicas, ou de Leydig.

É assim denominado, por se originar em gônadas disgenéticas, ou seja, gônadas anormais que não são reconhecidas nem como testículo nem como ovário, e por recapitular o desenvolvimento gonadal. Reconhecendo este fato Verp & Simpson (1987) sugeriram dois modelos para explicar a etiologia do gonadoblastoma.

O primeiro modelo baseou-se no fato de que, em indivíduos com gônadas disgenéticas, a preponderância do gonadoblastoma simplesmente reflete a elevada susceptibilidade à neoplasia apresentada pelo tecido com desenvolvimento anormal. No segundo modelo, em casos onde a

disgenesia gonadal é o resultado de uma alteração em um gene localizado no cromossomo X, o gonadoblastoma seria causado por uma mutação.

Dados epidemiológicos posteriores, demonstraram, entretanto, serem ambos os modelos improváveis, o gonadoblastoma ocorre exclusivamente em uma população selecionada, isto é, em indivíduos com gônadas disgenéticas e material do cromossomo Y (Page, 1987).

Em pacientes que são fenotipicamente mulheres, o gonadoblastoma ocorre naquelas com cariótipo 46,XY ou mosaico 45,X/46,XY (Teter et al., 1964; Robinson et al., 1964; Strumpf, 1965; Teter & Boczkowski, 1967; Andrews, 1971; Schellhas, 1974; Manueal et al., 1976; Williamson et al., 1976; Tyrkus et al., 1984) raramente ocorrendo naquelas com cariótipo 45,X ou 46,XX. O tumor também se desenvolve em mulheres com disgenesia gonadal e um cromossomo Y com alteração estrutural em todas ou em algumas células.

O gonadoblastoma está presente, algumas vezes, em indivíduos com ambiguidade sexual, cromossomo Y e testículo anormal, que pode ser abdominal ou inguinal (Scully, 1970).

Está claro, portanto, que se a disgenesia gonadal sozinha predispucesse ao aparecimento do gonadoblastoma, então, o tumor deveria ocorrer em proporções consideráveis tanto em mulheres com cromossomo Y quanto naquelas sem cromossomo Y em seu cariótipo. Entretanto, somente em uma pequena proporção de pacientes esse tipo de tumor se desenvolve na aparente ausência de material do cromossomo Y,

sendo que, nesses casos, a presença de DNA do Y foi excluída somente por análises realizadas com técnicas citogenéticas convencionais.

Do mesmo modo, se um gene ligado ao X e mutações autossômicas, por mecanismos independentes, ocasionassem disgenesia gonadal e gonadoblastoma, o tumor deveria ser limitado aos indivíduos que carregassem tais mutações. Entretanto, frequentemente encontram-se em mulheres sem tais mutações mendelianas nas quais a disgenesia gonadal é fruto de um mosaicismo com uma das linhagens celulares apresentando cromossomo Y, ou naquelas onde o Y carece da região de determinação sexual (Magenis et al., 1984a, 1987; Disteche et al., 1986b).

Sendo a síndrome de Turner a alteração mais comum do desenvolvimento gonadal em mulheres, também é nessas pacientes que se encontra o maior índice de desenvolvimento do tumor. Há acentuada variabilidade fenotípica entre as portadoras dessa síndrome, em função, principalmente, da variabilidade cariotípica. É encontrado, em associação com o infantilismo sexual, baixa estatura e amenorréia primária de origem gonadal, um quadro clínico malformativo.

Ao exame físico, podem ser observadas diversas manifestações somáticas características, entre as quais, face triangular, fendas palpebrais oblíquas para baixo, pescoço curto com pregas pterigonucais (pescoço "alado") e cubitus valgus.

Embora uma grande proporção tenha constituição cromossômica 45,X, vários tipos de mosaicismo podem ser encontrados envolvendo o cromossomo X, quer com alterações estruturais ou numéricas, ou ainda envolvendo um ou mais cromossomos Y, íntegros ou não (Ferguson-Smith, 1965; Magenis et al., 1980; Fryns et al., 1980; Magenis et al., 1982). Diferentes sinais fenotípicos podem também serem observados como sugestivos de um mosaicismo críptico (Hook & Warburton, 1983).

Embora nas pacientes com cariótipo 45,X o risco de malignização seja praticamente zero, a probabilidade aumenta entre as pacientes com síndrome de Turner, cujo cariótipo inclui um ou mais cromossomos Y, íntegros ou deficientes (Sandberg, 1985). Esse risco de malignização tem sido estabelecido em 15-25% (Simpson & Photopoulos, 1976; Schellhas et al., 1974).

Visto que o risco de desenvolvimento de neoplasia altamente maligna do tecido germinativo, começa a aumentar nas pacientes depois da puberdade, chegando a 70% (Magenis et al., 1984a), a detecção precoce de material do cromossomo Y, com consequente remoção cirúrgica de suas gônadas tem, portanto, um importante caráter profilático.

O papel do cromossomo Y na etiologia do gonadoblastoma foi ressaltado em vários trabalhos, sugerindo que esta habilidade para promover neoplasia dificilmente estaria relacionada com a heterocromatina do cromossomo Y, devendo ser decorrente da ação de um gene da eucromatina.

Ao analisar o cariótipo de algumas pacientes que desenvolveram gonadoblastoma, Schellas et al. (1974), observaram que somente 10% dos casos não estavam associados à presença de material do cromossomo Y, apresentando uma constituição genética que variava de 46,XX a diversos padrões de aneuploidias do cromossomo X. Os autores sugeriram, devido a alta correlação existente entre o tumor nas células germinativas e a presença de DNA do cromossomo Y, que esses indivíduos poderiam apresentar baixo nível de mosaicismo, não detectado, contendo material do cromossomo Y.

Lukusa et al. (1986) relataram 3 pacientes com cariótipo 45,X/46,XYnf que não haviam desenvolvido gonadoblastoma. Esta curiosa observação confirmou a teoria de que o Ynf (Y não fluorescente) é um dic(Yp), com só um centrômero ativo, e por isso chamado pseudodicêntrico (Daniel et al., 1980; Magenis & Doulon, 1982). Uma vez que em tais pacientes os fatores ou genes, localizados no Yq, responsáveis pelo desenvolvimento do gonadoblastoma não estavam presentes, o cromossomo Ynf não tem a propriedade de induzir tal degeneração maligna gonadal.

Com base nesses fatos Page (1986, 1987) sugeriu que, no contexto de uma gônada disgenética, algum gene estrutural ou regulador do cromossomo Y (GBY) atuaria como um oncogene e, na presença de gônadas com diferenciação sexual masculina normal, seria responsável pela espermatogênese.

A combinação do GBY e uma gônada disgenética constitui uma forte, mas não absoluta, predisposição ao desenvolvimento do tumor. Fatores adicionais, como mutações somáticas ou algum evento fisiológico, podem ser necessários para ativar a oncogenicidade do GBY.

Na verdade, é ainda difícil afirmar se o GBY, o H-Y e ainda o fator de espermatogênese, também conhecido como *azoospermia factor*, tratam-se de locos distintos ou não. Um mapa de deleção poderá esclarecer se existe alguma relação deles com o fator de crescimento (Alvesalo & de la Chapelle, 1981) localizado no Yq.

Esses genes poderão ser mapeados com maior precisão pela hibridização do DNA de indivíduos que apresentem disgenesia gonadal, gonadoblastoma e alterações estruturais envolvendo o braço longo do cromossomo Y, com sondas de DNA Y-específicas.

Assumindo-se que o cromossomo Y desempenha um importante papel no desenvolvimento do gonadoblastoma e, embora ainda não se possa afirmar qual região predispõe à malignização, a detecção de material do cromossomo Y nas pacientes com risco de desenvolver este tipo de tumor representa muito mais do que simples interesse acadêmico.

Em muitos casos é impossível determinar, pelas técnicas citogenéticas, se um cromossomo com alteração origina-se do cromossomo X ou do cromossomo Y. Nasqueles pacientes onde ocorre virilização ou presença de genitália ambígua, pode-se assumir que o cromossomo marcador seja um

remanescente do Y, ou no mínimo contenha os determinantes genéticos relacionados com a diferenciação testicular (Wilson et al., 1986).

Por outro lado, em pacientes que demonstram ausência de características físicas sugestivas de produção de testosterona fetal ou pós-fetal, não pode ser excluída a possibilidade de que o cromossomo marcador seja derivado do cromossomo Y.

Nesses casos, é de crucial importância determinar se existe ou não, em suas células, material genético derivado do cromossomo Y, pois dessa caracterização depende a indicação de uma gonadectomia para prevenir o desenvolvimento do tumor.

Aplicações de Sondas Y-específicas em Diagnóstico Clínico

Alterações do cromossomo Y envolvendo a porção geneticamente ativa, podem originar síndromes de "reversão sexual". Tais síndromes incluem homens 46,XX (Magenis et al., 1982; Guellaen et al., 1984; Page et al., 1985; Affara et al., 1986; Muller et al., 1986a; Vergnaud et al., 1986), mulheres 46,XY (Disteche et al., 1986b; Muller et al., 1986a,c) e homens 45,X (Disteche et al., 1986a; Maserati et al., 1986; Fraccaro et al., 1987; Gal et al., 1987) ou podem causar infertilidade quando porções da eucromatina do braço

longo estão ausentes (Tiepolo & Zuffardi, 1976).

A detecção de translocações em homens 46,XX, por técnicas citogenéticas, foi possível em um pequeno número de casos (Madan & Walker, 1974; Wachtel et al., 1976; Magenis et al., 1982). Isso foi interpretado de acordo com a hipótese de Ferguson-Smith (1966) como evidência da troca desigual entre o cromossomo X e o cromossomo Y, incluindo o gene da determinação do testículo, em zigoto 46,XX.

Entretanto, alterações que resultam em indivíduos com "reversão sexual", frequentemente não podem ser diagnosticadas por métodos citogenéticos, sendo necessária a utilização de técnicas moleculares para o seu diagnóstico.

Os métodos moleculares realmente confirmaram, que a maioria de homens 46,XX contêm quantidades variáveis de sequências de DNA Y-específicas translocadas para o cromossomo X (Guellaen et al., 1984; Koenig et al., 1985; Page et al., 1985; Affara et al., 1986; Muller et al., 1986a,b,c; Vergnaud et al., 1986; Andersson et al., 1986). Com a aplicação de técnicas de hibridização *in situ* nesses pacientes demonstrou-se que o material do cromossomo Y está translocado para a porção distal do braço curto do cromossomo X (Magenis et al., 1984a; Andersso et al., 1986; Muller et al., 1987b).

Similarmente, o uso de sondas de DNA Y-específicas demonstrou a ocorrência de deleção em casos sem alterações citogenéticas (Muller et al., 1986a,b; Distèche et al., 1986a), embora os métodos citogenéticos já tivessem indicado

a deficiência no braço curto do cromossomo Y em alguns casos de mulheres 46,XY (Rosenfeld et al., 1979; Magenis et al., 1984b). A aplicação de sondas Y-específicas também, confirmou a existência de translocações entre o cromossomo Y e autossomos nos casos homens 45,X (Schempp et al., 1985; Distèche et al., 1986a; Maserati et al., 1986; Gal et al., 1987; Kozma & Adinolfi, 1988) e permite o diagnóstico de deficiência na porção eucromática do braço longo do cromossomo Y em homens 46,XY inférteis (Andersson et al., 1988).

As técnicas moleculares também têm sido de grande valia na análise de pacientes com síndrome de Turner (McDonough & Tho, 1983; Gemmil et al., 1987; Muller et al., 1987a).

A sonda Y97, por reconhecer uma sequência da região centromérica, tem sido largamente utilizada para detecção de material do cromossomo Y em pacientes com suspeita de mosaicismo cromossômico. Mesmo em casos de cromossomo Y deficiente, esta tem sido a sonda preferencialmente escolhida, uma vez que cromossomos marcadores estáveis usualmente apresentam centrômero.

Diversos trabalhos têm sido realizados para avaliar a sensibilidade e especificidade da sonda Y97 em análises de *southern* e *dotblot*. Esses estudos pretendem determinar a frequência mínima da linhagem XY que pode ser detectável pelos métodos adotados. (Stalvey & Erickson, 1987; Tho & McDonough, 1987; Gal et al., 1987; Tho et al.,

1988; Kaluzewski et al., 1988; Erickson et al., 1990).

Por outro lado, a sonda pY3,4, que reconhece especificamente sequências repetidas da heterocromatina, não pode detectar material do cromossomo Y, caso a porção fluorescente esteja deletada, embora seja uma ferramenta sensível para detectar mosaicismo com baixa frequência da linhagem XY. Fragmentos não fluorescentes podem ser tão pequenos que somente o centrômero e uma reduzida porção paracentrômica do Y, estão presentes.

Nos casos de hibridização negativa para a sonda Y97, estaria indicada a análise subsequente com as sondas do braço curto do cromossomo Y. Dentre elas pDP105, pPD1007 e pY53,3.

Quando a sequência de nucleotídeos numa sonda é conhecida, como é o caso do pDP1007 e pY53,3, é possível sintetizar iniciadores para serem utilizados na técnica de amplificação gênica (PCR). Esse método permite a detecção, com alta sensibilidade, de sequências Y-específicas em diagnóstico pré e pós-natal (Ebensperger et al., 1989).

OBJETIVOS

- . Detectar, através da hibridização com sondas de DNA Y-específicas, a presença ou ausência de sequências de DNA do cromossomo Y, em uma amostra de pacientes com estigmas turnerianos.

- . Determinar qual o menor nível de mosaicismo detectável e qual a sonda Y-específica mais eficiente, dentro das condições utilizadas em nosso laboratório.

- . Padronizar um método prático e rápido, que possa ser aplicado, paralelamente com a citogenética, na rotina de identificação de material do cromossomo Y.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes

Foram estudadas 14 pacientes com estigmas turnerianos que, após análise citogenética, demonstraram cariótipo com mosaicismo, sendo uma das linhagens 45,X e uma segunda população celular com constituição cromossômica heterogênea. As pacientes foram divididas em três grupos, classificadas de acordo com a constituição cromossômica da segunda linhagem. No primeiro grupo estão cinco pacientes que apresentavam 46,X,+mar (Fig.3A). O segundo grupo é constituído por cinco pacientes com um ou mais cromossomos Y aparentemente íntegros e, no terceiro grupo, aparecem quatro pacientes com um cromossomo em anel cuja origem não pode ser determinada pela citogenética como sendo derivado do cromossomo X ou do cromossomo Y (Fig.3B).

Os dados clínicos encontram-se resumidos na tabela I, os dados citogenéticos na tabela II e, detalhadamente citados no anexo I.

Além das pacientes, foram incluídas nesta amostragem os seguintes DNAs controle: homem 46,XY; mulher 46,XX; homem 47,XYY; homem 47,XXY; mulher 45,X; homem 46,X,dic(Y)(q11.2101)(Moreira-Filho, 1987) e linhagens 45,X+frag/46,X,i(Y)(qter>cen>qter)(3774), 45,X/46,X,del(Y)(pter>q11.2)(2668), 45,X/46,X,del(Y)(pter>q11)

As pacientes que foram encaminhadas ao Ambulatório de Genética Clínica da Unicamp estavam sob a responsabilidade do corpo clínico do Depto. de Genética Médica da Unicamp, sendo a análise citogenética realizada pelo Sr. Antônio Conceição e Costa e Sra. Edi Lúcia Sartorato. Àquelas indicadas a nós pelo Depto. de Medicina da Escola Paulista de Medicina (EPM) - disciplina de Endocrinologia, estavam sendo acompanhadas pela Dra. Ieda T.N. Vereschi e, ao Depto. de Pediatria da EPM pela Dra. Ângela de Castro. As análises citogenéticas das pacientes encaminhadas pela EPM foram realizadas pela Dra. Joyce A. D. Andrade - Disciplina de Genética - EPM .

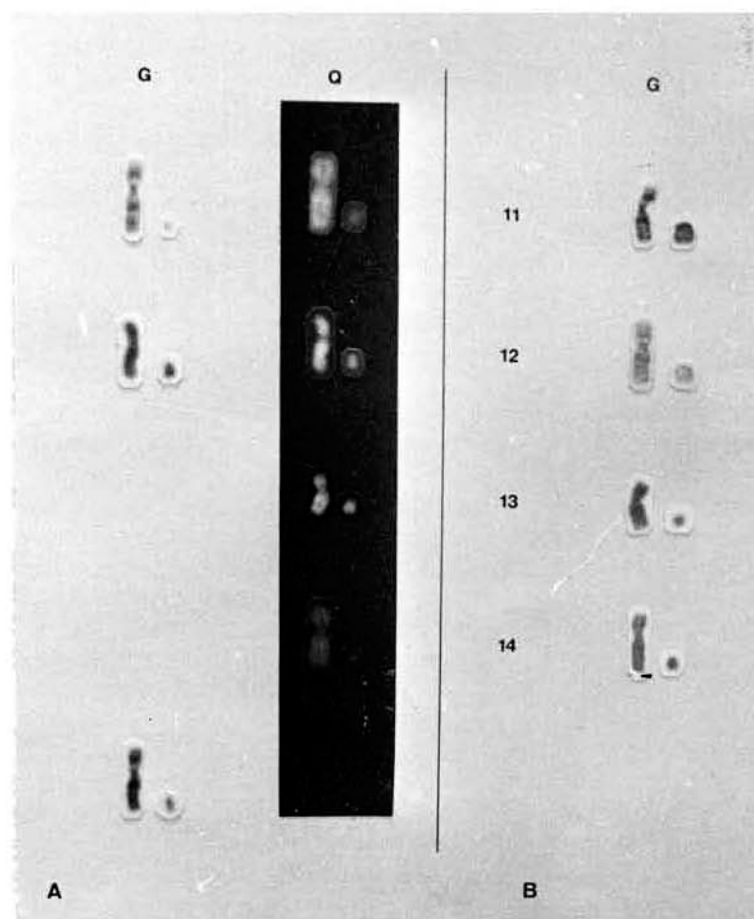


Figura 3. Cromossomos X e marcadores (grupo I) (A) e, cromossomos X e anéis (grupo III) (B) corados com técnicas de banda G (casos 1,2,5,11,12,13 e 14) e banda Q (casos 1,2,3,4).

Tabela I. Resumo da citogenética das pacientes

Casos		Cariótipo	% da linhagem diferente de 45,X sangue	% da linhagem diferente de 45,X gônada	Gonadectomia
Grupo I	1	45,X/46,X,+mar	78%	ND	-
	2	45,X/46,X,+mar	4%	ND	+
	3	45,X/46,X,+mar	1%	0%	+
	4	45,X/46,X,+mar	51%	ND	-
	5	45,X/46,X,+mar	60%	7%	+
	6	45,X/46,XY	60%	35% - GD 15% - GE	+
	7	45,X/46,XY	64%	ND	+
	8	45,X/47,XXY	50%	10%	+
	9	45,X/46,XY	60%	ND	-
	10	45,X/46,XY	90%	6% - GD 2.3% - GE	+
Grupo III	11	45,X/46,X,r(?)	32%	ND	-
	12	45,X/46,X,r(?)	28%	ND	-
	13	45,X/46,X,r(?)	66%	ND	-
	14	45,X/46,X,r(?)	21%	ND	-

GE - Gônada esquerda

GD - Gônada direita

ND - Não Determinado

(+) gonadectomia já realizada

(-) gonadectomia ainda não realizada

Tabela II. Resumo das características clínicas das pacientes

Casos	Idade	Genitália Externa	Genitália Interna	Anatomo-Patológico
1	3 anos	normal	ovário não visibilizado	ND
2	20 anos	clitoromegalia	ovário não visibilizado	GD- ausência de CG, nódulos formados por CL e estruturas tubulares sugestivas de epidídimo. GE- estroma com aglomerados de CL. Porções de trompa e de epidídimo.
3	26 anos	fusão de pequenos lábios	ND	TE- Com microcalcificação OE- Com estruturas similares a epidídimo TD e OD - formados por tecido fibroso sem CG mas, com células hilares hiperplásicas
4	20 anos	clitoromegalia genitália infantil	ovário rudimentar ovário filiformes	ND
5	24 anos	normal	útero hipoplásico ovário não visibilizado	ND
6	23 anos	clitoromegalia, peq. grd. lábios hipopl.	útero rudimentar e anexos não visibilizados.	ovário disgenético com células hilares trompa sem alterações histológicas.
7	13 anos	normal	US útero e ovário não foram visualizados.	ausência de útero, restos de tuba uterina e ovário em fita.
8	19 anos	discreta hipoplasia grandes lábios	US útero e ovário não visualizados	ausência de CG e folículo ovariano, apenas tecido fibroso calcificado.
9	25 anos	clitoromegalia	ND	ND
10	20 anos	clitoromegalia	US útero e anexos não visibilizados	ovário em fitas e como útero apenas uma dobra de tecido.
11	10 anos	normal	US útero não visibilizado	ND
12	10 anos	normal	US útero não visibilizado	ND
13	13 anos	ausência de pelos pubianos	US útero e ovário com dimensões reduzidas	ND
14	6 anos	normal	ND	ND

US - UltraSonografia
CG - Células Germinativas
CL - Células de Leydig

GE - Gônada Esquerda
GD - Gônada Direita
TE - Trompa Esquerda

TD - Trompa Direita
OD - Ovário Direito
OE - Ovário Esquerdo

Metodologia

Extração de DNA de Sangue Total

Amostras de 20 ml de sangue periférico contendo EDTA (1,2 mg/ml) foram centrifugadas (2000 rpm por 10 minutos), para separação e descarte do plasma. As hemácias foram lisadas pela adição de um tampão hipotônico (Tris 10mM, pH 7,6; MgCl₂ 5mM e NaCl 10mM). Após centrifugação a 2.500 rpm por 15', o sobrenadante foi retirado, descartado, e o sedimento constituído de leucócitos foi ressuspensionado em 30 ml desse mesmo tampão. Essa operação foi repetida até a completa lise das hemácias.

A lise dos leucócitos ocorreu pela adição de 10 ml de tampão de lise de glóbulos brancos (Uréia 7M; NaCl 0,3M ; EDTA 10mM; Tris-HCl 10mM pH 7,5), 2% de SDS e incubação à 37° C durante 10'.

O DNA do material lisado foi extraído 2 vezes com mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) tamponado com Tris 20mM e uma vez com mistura de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1).

O sobrenadante foi precipitado com 2,5 vezes o volume de etanol absoluto e 0,2M acetato de sódio à -20°C por no mínimo 16 horas.

Após a precipitação, o DNA foi lavado 2 vezes com etanol 70%, seco ao ar, e ressuspendido em 1ml de tampão TE 10:1 (Tris 10mM e EDTA 1mM, pH 7,5).

As concentrações do DNA foram obtidas após leitura em espectrofotômetro, a 260 nm, em uma diluição de 50ul DNA/950ul TE seguindo a fórmula :

$$\text{O.D 260} \times \text{diluição} = \text{ug DNA /ml}$$

$$0,0197$$

A qualidade do DNA foi verificada através da relação 260/280 nm. O DNA foi considerado de alta pureza quando obteve-se índices de 1,8 a 2,0 nesta relação.

Digestão do DNA.

Amostras contendo 7 ug do DNA das pacientes e dos controles, foram digeridas, segundo as recomendações do fabricante, com 3 unidades de enzima de restrição Eco RI (BRL) por ug de DNA, e incubadas por 16 horas à 37°C. Após a digestão o DNA foi precipitado com 0,2 M de acetato de sódio, 2,5 vezes o volume de etanol absoluto e RNA de levedura (0,14 ng/ul).

O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70%, secado ao ar e ressuspendido em 15 ul de TE 10:1, pH 7,5.

À cada amostra foi acrescentado 3 ul de azul de bromofenol (0,25% de bromofenol, 50% de glicose).

Eletroforese do DNA Genômico Digerido

Os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram separados, por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE, pH 8,0 (anexo II), por aproximadamente 16 horas, a 35 volts.

A migração das amostras de DNA de pacientes e indivíduos- controle normais, masculino e feminino, foi realizada juntamente com um marcador de peso molecular (1ug de DNA do fago lambda digerido com Hind III - Pharmacia - cat. 27-404B-01) .

Após a corrida eletroforética o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 ug/ml) para visualização do DNA quando transiluminado com luz ultra-violeta.

Transferência

O gel contendo as amostras foi submetido aos tratamentos:

- a) Depuração: em solução de HCl 0,25 M por 15' à temperatura ambiente com agitação.
- b) Desnaturação: em solução de NaOH 0,5M e NaCl 1,5 M, à temperatura ambiente com duas lavagens de 15' cada.
- c) Neutralização: em solução de Tris-HCl 2M, pH 7,5 e NaCl 1,5 M com duas lavagens de 30 minutos cada.

Entre cada tratamento, o gel foi lavado com água bidestilada estéril.

Para a transferência do DNA o gel foi colocado sobre folhas de papel Whatmann 3MM embebidas em uma solução de 20 x SSC (anexo II). Sobre o gel foi colocado a membrana de nylon "S & S Nytran" (cat. 01870), previamente embebida em água, evitando-se a formação de bolhas de ar. As bordas do gel foram isoladas com Vitafilm para que a solução passasse somente através do gel.

Sobre esse conjunto colocamos duas folhas de papel Whatmann 3MM, do mesmo tamanho do gel, além de uma grande quantidade de papel absorvente pressionado com um peso homogeneamente distribuído. Após transferência, realizada durante a noite, o DNA foi fixado ao filtro à 80°C por 2 horas (Southern, 1975).

O gel transferido foi novamente corado para se verificar a eficiência do processo.

Dot Blot

Nesse método de análise o DNA genômico não é digerido. Antes da aplicação do DNA, as amostras são tratadas com NaOH 0,4M e EDTA 25mM à 95°C por 10' para desnaturação e, depois, imersas em gelo picado por 5 minutos.

A preparação dos filtros foi realizada, usando um aparelho de filtração (Minifold I- Scheleider and Schull, cat. SRC 96).

Para montagem desta técnica foram pré-tratadas 2 folhas de papel de filtro SPS GB003 com 2 x SSC (anexo II) e colocadas sobre a placa de filtração. Sobre esse conjunto é colocado a membrana de nylon "S & S nytran" (cat.01870) pré-tratada com 2 x SSC. Para prevenir a formação de bolhas passa-se um bastão de vidro sobre a membrana. Após a montagem, as amostras desnaturadas são aplicadas e o DNA é fixado à 80°C por 2 horas.

Sondas Utilizadas

Sonda pDP1007 - Fragmento genômico Hind III de 1,3 Kb derivado do intervalo 1A2 do cromossomo Y (Page et al., 1987). Esta sonda detecta sequências de DNA do loco ZFY no cromossomo Y e do loco Xp21-p22.3 no cromossomo X que correspondem, respectivamente, aos fragmentos EcoRI de 3,0 Kb e de 1,8 Kb (Weissenbach, et al., 1989).

Sonda pDP105 - Fragmento genômico Hind III de 5,5 Kb que detecta uma família de sequências Y-específicas, repetidas e localizadas em múltiplos locos. Detecta fragmentos Taq I Y-específicos de 2,5Kb do intervalo 3 e de 5,2Kb, um marcador do intervalo 6. Quando o DNA genômico

é digerido com enzima Eco RI, essa sonda reconhece um fragmento de 3,0 Kb derivado do intervalo 3 (Bernstein, et al., 1987; Gal et al., 1987).

Sonda pDP97 - Fragmento Eco RI genômico de 5,3 Kb que detecta uma família de sequência Y-específica repetida em tandem. É um subclone derivado do cosmídeo Y97 (Wolfe et al., 1985). Em condições de alta estringência, detecta um fragmento Eco RI de 5,5 Kb, um marcador do centrômero do cromossomo Y humano (Bernstein, et al., 1987; Gal, et al., 1987).

Sonda pY-5 - Fragmento Hind III de 850 pb isolado de um banco do cromossomo Y construído por citometria de fluxo. Detecta um fragmento Eco RI Y-específico de 11 Kb, marcador do intervalo 5 (Farah et al., trabalho não publicado).

Sonda pY3.4 - Fragmento Hae III que detecta sequências de DNA Y-específicas altamente repetidas derivadas da porção heterocromática do Yq (intervalo 7). Em alta estringência detecta um fragmento Eco RI de 3.4 Kb (Lau et al., 1984).

(Fig. 4)

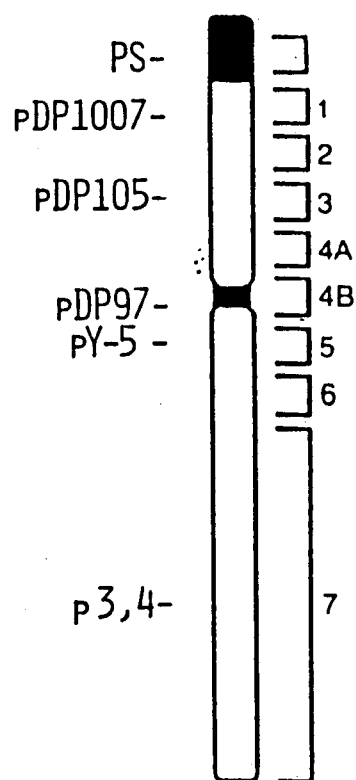


Figura 4. Localização das sondas utilizadas segundo o mapa proposto por Vergnaud et al., 1986.

Amplificação e Extração de Fragmentos

Bactérias *E.coli* JM101, previamente transformadas com plasmídios contendo as sondas, foram cultivadas por aproximadamente 16 horas em 5 ml do meio LB (1% de bacto-triptone, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl, pH 7,5) com ampicilina (50 ng/ml).

O DNA plasmidial foi extraído e purificado a partir de 50 ml de cultura de bactérias, inoculadas com 50 μ l do pré-inóculo, segundo as recomendações do fabricante do Kit utilizado (Kit Circleprep BIO 101 cat. CP 100).

Cinquenta μ g de DNA plasmidial foram digeridas com 3 U por μ g de DNA da enzima de restrição adequada.

Após a separação eletroforética, a banda correspondente à sonda foi cortada do gel e o DNA extraído utilizando o Kit Gene Clean, segundo as recomendações do fabricante (Kit Gene Clean BIO 101- cat. 3105).

Marcação das Sondas

A marcação radiativa das sondas com nucleotídeos ^{32}P -dATP e ^{32}P -dCTP adquiridos da Amersham International (Amersham UK PB 10204), foi realizada segundo os protocolos dos Kits de "random priming" (USB - cat. 70200) e "nick-translation" (BRL - cat.8160).

Nós utilizamos 100-300 ng de DNA da sonda em reações de "random priming" e 0,3-1ug de DNA em reações de "nick- translation".

A remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita por cromatografia em coluna de sephadex G-50 equilibrada com TE 10:1, pH 8,0 (Maniatis et al., 1982). A eficiência de incorporação, dos nucleotídeos radiativos, foi avaliada em equipamento de cintilação líquida. Aproximadamente 2×10^6 cpm/ml de solução foram utilizadas em cada hibridização. A sonda foi desnaturada à 100°C durante 10 minutos, sendo imediatamente colocada em gelo picado para evitar renaturação.

Hibridização

As membranas contendo as amostras de DNA, foram colocadas em sacos plásticos com solução de pré-hibridização A (50% formamida deionizada, 1M NaPO₄ pH 7,4, 1 x Denhardt's (anexo II), 3x SSC (anexo II), 20mg de DNA de fita simples de salmon e 15 ug de RNA de levedura). Após a retirada cuidadosa de eventuais bolhas, o saco plástico foi selado e incubado à 42°C por no mínimo 4 horas, quando então retiramos a solução de pré-hibridização a qual foi substituída pela solução de hibridização A (4 partes da solução de pré-hibridização A: 1 parte de dextran sulfato

com a sonda marcada radiativamente). Os sacos plásticos foram novamente selados e incubados à 42°C por, aproximadamente, 16 horas.

Algumas membranas foram pré-hibridizadas e hibridizadas à 52°C e em solução B (50% formamida, 1M NaCl, 1% SDS), quando utilizada a sonda pDP 97 (Stalvey & Erickson, 1987).

A remoção do excesso de sonda foi feita com lavagens específicas para cada sonda empregada.

As seguintes soluções foram utilizadas para a lavagem dos filtros.

Solução 1

SSC		2 X
Denhart's		1 X

Solução 2

SSC		0.1 X
SDS		1 %

Solução 3

SSC		1 X
SDS		0.1 %

Solução 4

SSC 0.5 X

SDS 1 %

Solução 5

SSC 1 X

Solução 6

SSC 0.1 X

Solução 7

SSC 0.2 X

SDS 1 %

Solução 8

SSC 0.1 X

SDS 0.1 %

Os filtros hibridizados com a sonda pDP1007 foram lavados uma vez com a solução 3, à temperatura ambiente, e duas vezes com a solução 5 à 56°C por 30'.

Para as sondas pDP105, pDP97, pY-5 e pY3.4 lavamos os filtros uma vez com a solução 1, à temperatura ambiente por 40', e por duas vezes com a solução 2 à 56°C por 30'. Foi realizada uma última lavagem com a solução 6 à temperatura ambiente.

Os filtros em Southern que foram hibridizados à 52°C com a solução B e a sonda pDP97, foram lavados com diferente concentração de sal e temperatura. Portanto, a lavagem realizada com a solução 2, descrita acima, foi substituída pela solução 4 à 65°C.

Para os filtros em dot blot, a solução 2 foi substituída pela solução 7 ou 8 à 65°C. Alguns filtros foram relavados com a solução 2 mas a 65°C.

As membranas, após as lavagens, foram colocadas sobre papel de filtro 3MM para retirar excesso de umidade e, depois, envoltas em vitafilm para exposição à um filme de autoradiografia (KODAK X-OMAT AR - cat 1651454).

Para aumentar o sinal da marcação, foram utilizados dois intensificadores (Lightning Plus - Sigma-cat-847623). O conjunto, formado pela membrana, o filme e os intensificadores, foi colocado em um cassete (KODAK x-ray cassette) e, exposto à - 70°C por um período de tempo que variava de 2 a 15 dias.

As membranas eram reutilizadas após remoção da sonda feita pela imersão em solução de pré-hibridização à 65°C por 1 hora.

Paralelamente, realizamos filtros em Southern com misturas de DNA masculino e feminino, em quantidades decrescentes de DNA masculino, contendo a quantidade total de 10 ug de DNA por amostra, utilizando as mesmas condições de digestão e transferência dos outros filtros. A

hibridização foi realizada à 52°C com a sonda pDP 97, seguindo, portanto, as condições específicas de lavagem .

RESULTADOS

Southern blot

Os resultados obtidos, a partir da hibridização do DNA das pacientes com as sondas Y-específicas, revelaram:

Grupo I - Pacientes com cariótipo 45,X/46,X,+mar

Os casos 1,2,3,4 do grupo I são negativos para as sequências de DNA Y-específicas detectáveis por todas sondas utilizadas (Fig.5 e tabela III).

O caso 5 do grupo I revelou-se positivo para todas as sondas que detectam sequencias de braço curto (Yp), e para a sonda Y-5 que detecta sequências da porção eucromática do braço longo (Yq) (Fig.6 e tabela III).

Grupo II - Pacientes com cariótipo 45,X/46,XY e 45,X/47,XXY

As pacientes do grupo II (casos 6,7,8,9,10), como esperado, são positivas para as todas as sondas utilizadas, ou seja, nenhuma deleção foi detectada no cromossomo Y (Fig.7 e tabela IV).

Grupo III- Pacientes com cariótipo 45,X/46,X,r(?)

As pacientes do grupo III (casos 11,12,13,14) são negativas para todas as sequências de DNA Y-específicas detectáveis pelas sondas utilizadas (Fig 7 e tabela V).

No filtro realizado com misturas de DNA de origem masculina e feminina contendo quantidades decrescentes de DNA masculino e, hibridizados com a sonda pDP97, foi possível detectar sequências Y-específicas na amostra com somente 5% de DNA masculino (Fig. 8 e tabela VI).

Dot blot

Diversos experimentos foram realizados para se determinar a sonda e as condições de estringência que melhor pudessem discriminar a presença de material do cromossomo Y em filtro de dot blot, visando a padronização de uma técnica rápida para triagem de pacientes em rotina diagnóstica. Os filtros utilizados para esta finalidade, continham sempre DNA de controles normais, masculino e feminino, de pacientes com marcador e/ou cromossomo Y íntegro em mosaico e de misturas apresentando quantidade decrescente de DNA masculino. Estas tentativas, aparecem resumidas na tabela VII.

No experimento 1, filtros hibridizados com as sondas (pDP105, pDP97, pY-5 e pY3.4), foram tratados sob as mesmas condições. A única sonda capaz de discriminar entre DNA de origem masculina e feminina foi a sonda pY3.4 (Fig.9).

No experimento 2 aplicamos diferentes quantidades de DNA nos filtros. Aparentemente, este fator não influenciou os resultados, sendo que, em nenhum caso foi possível discriminar, com segurana, entre DNA de origem masculina e feminina.

Passamos a utilizar a solução B de hibridização para a sonda pDP97 segundo sugestão de Stalvey & Erickson (1987). No experimento 3, seguimos exatamente as condições sugeridas pelos autores (Fig.10). Entretanto, os resultados não demonstraram sensibilidade adequada, mesmo quando o filtro foi relavado em solução 2 por mais 10'em (experimento 4), por mais 20' (experimento 6) por mais 30' (experimento 5), reexposta por tempo menor (experimento 6) ou ainda lavado com diferente solução, diferentes temperaturas, relavado e exposto com diferente tempo de exposição (experimento 7).

Tabela III. Resultados das hibridizações das DNA das pacientes do grupo I indicando (+) presença ou (-) ausência de fragmentos Y-específicos

CASOS	SONDAS					% da linhagem 46,X,+mar
	pDP1007	pDP105	pDP97	pY-5	pY3.4	
1	-	-	-	ND	-	78%
2	-	-	-	ND	-	4%
3	-	-	-	ND	-	1%
4	-	-	-	ND	-	51%
5	+	+	+	+	ND	60%

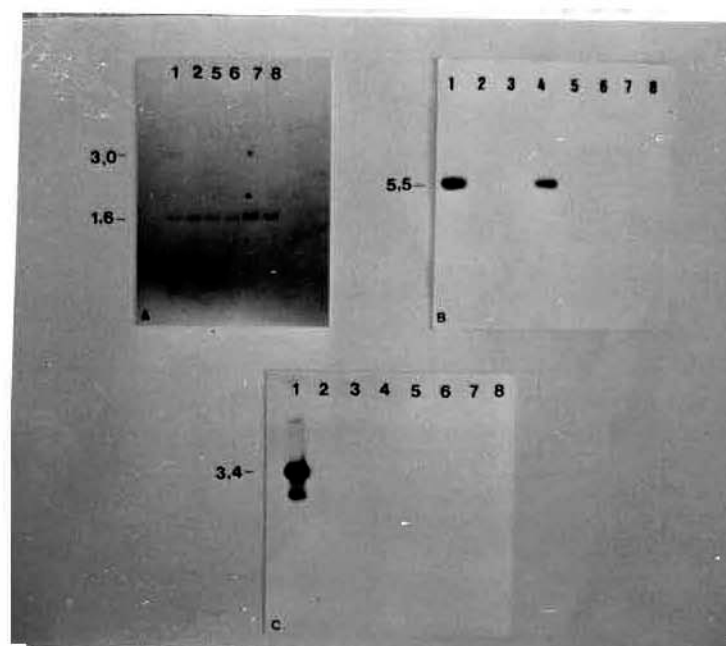


Figura 5. Autorradiografia do DNA genômico de homem normal (1), mulher normal (2), mulher 45,X (3), homem 46,X, dic (Y) (q11.2101) (4) e das pacientes do grupo I, caso 001 (5), 02 (6), 03 (7), 04 (8) com as sondas Y-específicas pDP1007 (A), pDP97 (B) e pY3.4 (C).

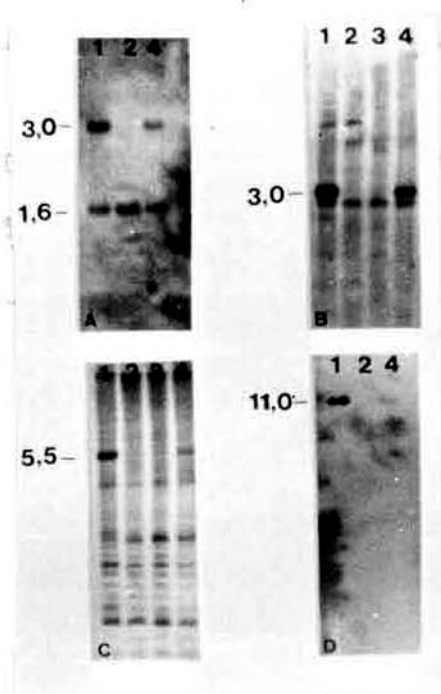


Figura 6. Autorradiografia do DNA genômico de homem normal (1), mulher normal (2) e das pacientes do grupo I, caso 2 (3) e caso 5 (4) com as sondas Y-específicas pDP1007 (A), pDP105 (B), pDP97 (C) e pY-5 (D).

Tabela IV. Resultados das hibridizações do DNA das pacientes do grupo II indicando presença (+) de fragmentos Y-específicos.

CASOS	SONDAS					CARIÓTIPO	% da linh. com Y
	pDP1007	pDP105	pDP97	pY-5	pY3.4		
6	+	+	+	+	+	45,X/47,XYY	50%
7	+	+	+	+	+	45,X/46,XY	66%
8	+	+	+	+	+	45,X/46,XY	90%
9	+	+	+	+	+	45,/46,XY	60%
10	+	+	+	+	+	45,X/46,XY	64%

Tabela V. Resultado das hibridizações do DNA das pacientes do grupo III indicando (-) ausência de fragmentos Y-específicos.

CASOS	SONDAS					% da linhagem 46,X,r,(?)
	pDP1007	pDP105	pDP97	pY-5	pY3.4	
11	-	-	-	-	-	32%
12	-	-	-	-	-	28%
13	-	-	-	-	-	66%
14	-	-	-	-	-	21%

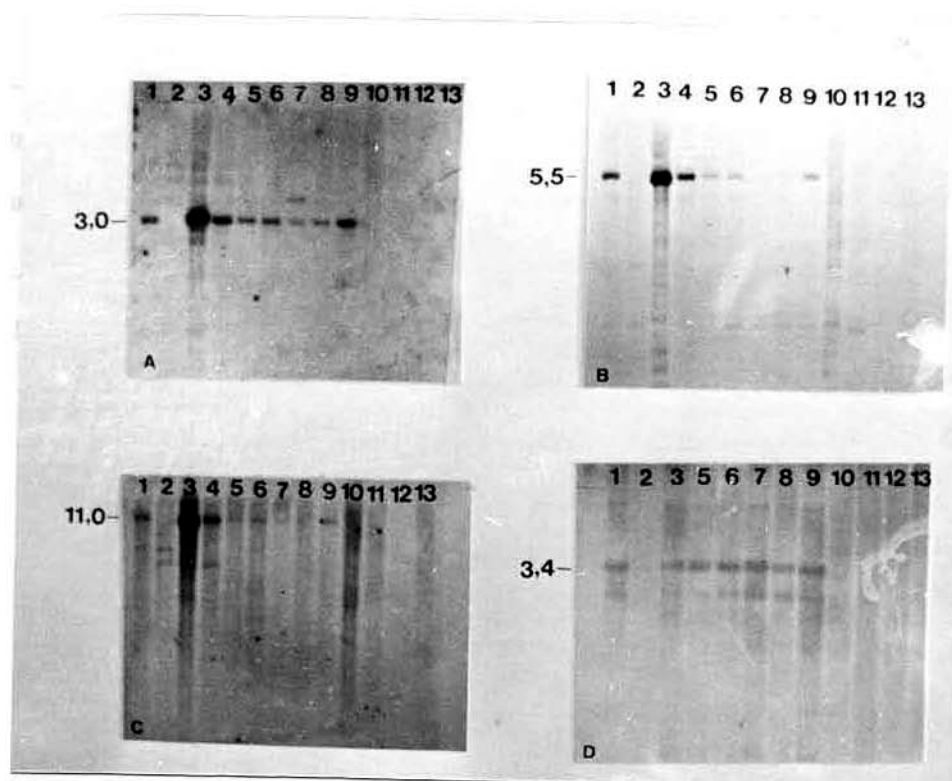


Figura 7. Autorradiografia do DNA genômico de homem normal (1), mulher normal (2), homem 47,XYY (3), homem 47, XXY (4), e das pacientes do grupo II casos 6 (5), 7 (6), 8 (7), 9 (8), 10 (9) e, do grupo III casos 11 (10), 12 (11), 13 (12) e 14 (13) com as sondas Y-específicas pDP105 (A), pDP97 (B), pY-5 (C) e pY3.4 (D).

Tabela VI. Resultados obtidos a partir de hibridizações com misturas de DNAs genômicos masculinos e femininos e a sonda pDP97, indicando (+) presença ou (-) ausência do fragmento EcoRI Y-específico de 5.5 Kb.

ug de DNA genômico masculino (%)		ug de DNA genômico feminino (%)		resultado para a sonda pDP97
10ug	(100)	-	(0)	+
5ug	(50)	5ug	(50)	+
2ug	(20)	8ug	(80)	+
1ug	(10)	9ug	(90)	+
0,5ug	(5)	9,5ug	(95)	+
0,2ug	(2)	9,8ug	(98)	-
0,1ug	(1)	9,9ug	(99)	-
-		10ug	(100)	-

* Foram utilizados em cada amostra um total de 10ug de DNA genômicos digeridos com enzima de restrição EcoRI .

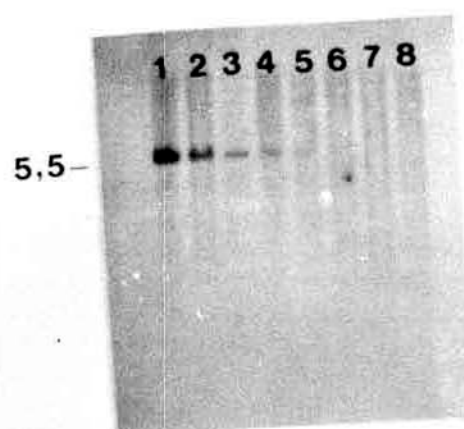


Figura 8. Autorradiografia das misturas de DNA genômico masculino e feminino digeridos com EcoRI em quantidades decrescentes de DNA masculino 10ug (1), 5ug (2), 2ug (3), 1ug (4), 0.5ug (5), 0.2ug (6) e 0.1ug (7) com a sonda pDP97

Tabela VII. Resultados obtidos em dot blot indicando discriminação (D) ou não (ND) de DNA genômico masculino e feminino.

Exp.	DNA ug	Sonda	Solução Híbrida.	Solução Lavagem	T ⁰ C	Tempo de Lavagem	Tempo Exposição	Resultados
1	2	pDP105 pDP97 pY-5 pY3.4	A	2	56 ⁰	30min.	7 dias 2 dias 2 dias 2 dias	ND ND ND D
2	1 2 3 4	pDP97	A	2	56 ⁰	30min.	2 dias	ND ND ND ND
3	2	pDP97	B	7	65 ⁰	30min.	2 dias	ND
4	2	pDP97	B	7 relav. 2	65 ⁰ 65 ⁰	30min. 10min.	2 dias 2 dias	ND ND
5	2	pDP97	B	7 relav. 2	65 ⁰ 65 ⁰	30min. 30min.	2 dias 2 dias	ND ND
6	2	pDP97	B	7 relav. 2	65 ⁰ 65 ⁰	30min. 20min.	2 dias 1 dia 1 dia	ND ND ND
7	5	pDP97	B	8	60 ⁰ 65 ⁰ 68 ⁰	30min. 30min. 30min.	3 dias 3 dias 1 dia 3 dias	ND ND ND ND

* Soluções mencionadas encontram-se citadas na metodologia

* Relav. - Filtros relavados

DISCUSSÃO

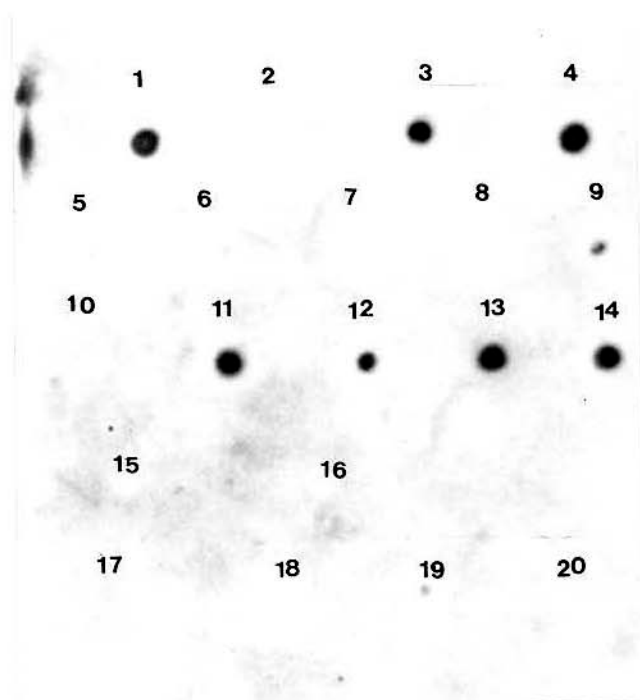


Figura 9. Autorradiografia dos DNAs genômicos em dot blot com a sonda pY3.4. Homem normal (1), mulher normal (2), homem 48,XXX (3), homem 48,XYYY (4), pacientes do grupo I casos 3 (5), 2 (6), 1 (7), 4 (8), linhagem 3774 (9); pacientes do grupo II casos 6 (10), 7 (11), 8 (12), 9 (13), 10 (14), as linhagens 2668 (15), 2730 (16), e as pacientes do grupo III casos 11 (17), 12 (18), 13 (19), 14 (20).

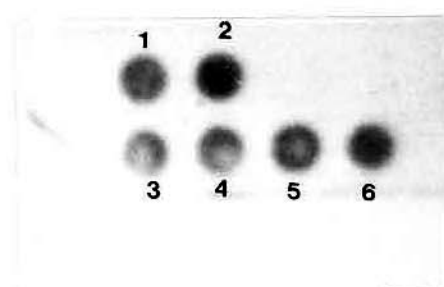


Figura 10. Autorradiografia dos DNAs genômicos, em dot blot, de homem normal (1), mulher normal (2) e de misturas de DNA masculino e feminino em quantidades crescentes de DNA masculino 0.2ug (3), 0.5ug (4), 1ug (5) e 5ug (6) com a sonda pDP97.

É bem conhecido, o fato de que, alterações neoplásicas nas gônadas, ocorrem com alta frequência nos indivíduos com disgenesia gonadal e DNA do cromossomo Y em seu genoma e, por outro lado, que é infrequente a ocorrência de tumor entre pacientes sem material genético do cromossomo Y.

A maioria das neoplasias degenerativas se desenvolve entre a idade de 15 e 30 anos (Manueal et al., 1976). O risco de tumorização aumenta sensivelmente com a idade, podendo aproximar-se de 70%. Portanto, a detecção precoce de material do cromossomo Y nessa população, pode reduzir, por meio de cirurgia profilática, o risco de gonadoblastoma.

Nas técnicas citogenéticas, o cromossomo Y é geralmente identificado após coloração com banda Q, através da intensa fluorescência emitida pela região heterocromática do braço longo (Yq12). Entretanto, alterações estruturais do cromossomo Y, podem ocorrer nessa região e resultar na perda desta característica, tornando impossível determinar se o cromossomo marcador origina-se do cromossomo X ou do cromossomo Y.

Portanto, não podemos eliminar a possibilidade de que exista DNA do cromossomo Y, simplesmente pela ausência desta região na análise citogenética. Além disso, em pacientes com disgenesia gonadal, frequentemente encontramos mosaicismo celular, com uma das linhagens

apresentando um ou mais cromossomos Y, íntegros ou deficientes, não detectáveis pela citogenética.

Há também que se considerar que, fora a região fluorescente brilhante da heterocromatina, tanto o cromossomo Y como o cromossomo X, bandeiam pobremente com técnicas de banda Q e G, dificultando muito a distinção entre eles, quando são deficientes.

As técnicas da biologia molecular podem, pela análise direta com sondas de DNA Y-específicas, complementar eficientemente o estudo citogenético, para a caracterização de cromossomos marcadores.

Apesar de não ter sido ainda identificado o fator genético que desencadeia o tumor em gônadas anormais, existe a sugestão de que este gene localiza-se na porção eucromática não fluorescente do braço longo do cromossomo Y (Page, 1987).

Baseado no exposto acima, nós utilizamos, na análise de pacientes com disgenesia gonadal e fenótipo feminino, um painel de sondas Y-específicas, visando cobrir a extensão máxima do cromossomo Y.

As pacientes de nossa amostra, foram divididas em 3 grupos, de acordo com o cariótipo presente. Aquelas com cromossomo marcador, ou em anel (grupos I e III), foram analisadas com o objetivo principal de determinar se o cromossomo com alteração estrutural era derivado do cromossomo Y. Nas pacientes que apresentavam uma das

linhagens celulares, com um ou mais cromossomos Y,, aparentemente íntegro pelos métodos citogenéticos (grupo II), pretendemos estabelecer o nível mínimo de mosaicismo detectável pelas técnicas empregadas. Entretanto, como a taxa de mosaicismo foi muito constante na nossa amostra, analisamos também misturas de DNA masculino e feminino com quantidades diferentes criando, por assim dizer, "mosaicos artificiais".

A primeira parte deste trabalho, consistiu na análise do DNA das pacientes pelo método de Southern. Os casos de 1 a 4 do grupo I foram negativos em todas as hibridizações realizadas (Tabela III). Dada a diversidade das sondas Y-específicas que empregamos, pode-se afirmar, com grande margem de segurança que, nesses casos, o cromossomo marcador não é derivado do cromossomo Y. Com relação ao caso 5 do grupo I, certamente podemos afirmar que, o cromossomo marcador originou-se do cromossomo Y, pois sequências de DNA específicas para este cromossomo, foram detectadas com todas as sondas utilizadas (Tabela III).

Esses resultados conduziram à gonadectomia, no caso 5, e o material foi encaminhado para análise citogenética, revelando que a porcentagem de mosaicismo, envolvendo o cromossomo marcador na gônada, apresentava níveis bem inferiores daqueles verificados no sangue periférico (gônada 7% e no sangue 60%).

Esta observação justifica a diferenciação feminina ocorrida neste caso, apesar da porção do cromossomo Y presente ser suficiente para induzir a formação do testículo.

Os casos do grupo II (com cromossomo Y aparentemente íntegro) mostraram-se positivos, como o esperado, para todas as sondas Y-específicas (Tabela IV). Assim, os resultados obtidos nas pacientes do grupo I e II sugerem que, o fenótipo feminino observado nesses casos, reflete a distribuição da linhagem celular XY na gônada.

Na análise das pacientes do grupo III, com mosaicismo na qual está presente um cromossomo em anel, nenhuma sequência de DNA específica para o cromossomo Y foi detectado. Como os cromossomos em anel observados em nossa amostra apresentam tamanho considerável, os resultados indicam que, estes cromossomos não se originaram a partir do cromossomo Y, sendo provavelmente derivados do cromossomo X. Nessas pacientes, portanto, não sugerimos a realização da gonadectomia,

Com o objetivo de se determinar qual o nível de mosaicismo mínimo detectável, e qual a melhor sonda para ser utilizada no método de Southern, analisamos os "mosaicos artificiais", preparados a partir de misturas de DNA masculino e feminino.

Os resultados obtidos, a partir deste experimento (Tabela VI), permite-nos concluir que a metodologia

empregada é de alta sensibilidade, pois é capaz de detectar mosaicismos celulares com 95% do DNA genômico feminino e somente 5% do DNA genômico masculino, hibridizado com a sonda pDP97. Esta sonda tem sido indicada por vários autores como sendo a mais eficiente na detecção de baixos níveis de mosaicismos (Stalvey & Erickson 1987,1988), pois além de detectar sequências repetidas do cromossomo Y, o que aumenta sua sensibilidade, estão localizadas na região centrométrica normalmente presente num cromossomo marcador estável.

Portanto, a sonda pDP97 é a mais conveniente para análise em rotina de pacientes com baixo nível de mosaicismos da linhagem XY ou com cromossomos marcadores tão pequenos que contenham somente a região centromérica e paracentromérica. As demais sondas devem ser utilizadas na análise subsequente das pacientes com hibridização negativa para as sondas pDP97, bem como naquelas pacientes com suspeita de apresentarem DNA do cromossomo Y translocado para o cromossomo X ou autossomos.

O nível de sensibilidade de 5%, estabelecido em nosso trabalho, está em conformidade com outros estudos da literatura, que também encontraram níveis semelhantes (Stalvey & Erickson,1987,1988).

Vale a pena destacar que nos casos 2 e 3 do grupo I o cromossomo marcador não foi detectado como derivado do Y, como esperado, uma vez, a frequência desta linhagem no sangue periférico, material utilizado para a análise do DNA,

estava abaixo do nível mínimo de sensibilidade (4% no caso 2 e 1% no caso 3).

Em casos como estes, nem a análise de DNA pelo método de Southern, nem métodos citogenéticos podem excluir, com segurança, o risco de gonadoblastoma. Uma vez que não se consegue afastar, com segurança, a presença de DNA do cromossom Y nestes casos, a realização ou não da gonadectomia deve se basear em critérios clínicos.

Na tentativa de se padronizar um método prático para ser utilizado em rotina no diagnóstico de tais pacientes, nós realizamos inúmeros experimentos com sondas Y-específicas, hibridizadas com DNA genômico aplicadas ao filtro de nylon pelo método de dot blot. Esse método além de ser mais rápido, quando comparado com o método de Southern, apresenta também um custo mais baixo pois não utiliza enzima de restrição e material de eletroforese, uma vez que o DNA não é digerido.

Nos nossos experimentos, a única sonda capaz de discriminar DNA genômico masculino do feminino é a sonda pY3.4. Esta sonda, altamente utilizada na rotina de determinação do sexo fetal, não é ideal para caracterização e identificação de cromossomos marcadores, pois detecta sequências derivadas da região heterocromática, usualmente muito variável.

A sonda pDP97, que apresenta alta sensibilidade e especificidade em Southern, em dot blot não foi capaz de

discriminar DNA de origem masculina do de feminina. Como pode ser observado na figura 6 C, a sonda pDP97 é capaz de detectar sequências de DNA, tanto no homem, como na mulher normal. A especificidade desta sonda decorre do padrão observado quando o DNA genômico é digerido, o que não acontece no método de dot blot. Embora exista uma publicação que relata ser possível a discriminação, devido a alta estringência utilizada por meio de lavagens com baixa concentração de sal e alta temperatura (Stalvey & Erickson, 1987), nós não conseguimos repetir estes resultados em nosso laboratório.

Ficou demonstrado, através dos resultados obtidos, que em pacientes com alto risco de desenvolver gonadoblastoma, a análise molecular, juntamente com a citogenética, devem ser utilizadas para exclusão ou confirmação de DNA do cromossomo Y. Este diagnóstico é fundamental, pois, dele depende a conduta médica a ser adotada.

Embora este diagnóstico ainda não possa ser realizado com segurança, em 100% dos casos, o isolamento do gene responsável pelo gonadoblastoma permitirá a utilização de sonda específica para esta região do cromossomo Y.

Além disso, o conhecimento da sequência de nucleotídeos do gene GBY, possibilitará a síntese de oligonucleotídeos, que poderão ser empregados como iniciadores na técnica de amplificação gênica (PCR)

aumentando, ainda mais, os níveis de sensibilidade e especificidade.

CONCLUSÕES

. A hibridização com sondas Y-específicas permite detectar a origem de cromossomos com aberrações estruturais não esclarecidas pelos métodos citogenéticos.

. Nos casos onde os métodos moleculares e/ou citogenéticos não podem excluir a presença de DNA do cromossomo Y em pacientes com risco de gonadoblastoma, a indicação de gonadectomia deve se basear em critérios clínicos.

. O nível mínimo de mosaicismo, no qual é possível se identificar com segurança a linhagem celular com material do cromossomo Y, pelo método de Southern com a sonda pDP97, é de 5%.

. Nas condições utilizadas, o método de dot blot se mostrou eficiente para a discriminação entre o DNA de origem masculina e feminina, somente quando a sonda empregada foi a pY3.4.

RESUMO

Entre as pacientes com disgenesia gonadal aquelas que contêm um ou mais cromossomos Y, íntegros ou não, em seu genoma, apresentam um risco aumentado em 15-25% de desenvolver uma forma rara de neoplasia gonadal, o gonadoblastoma.

Este tumor pode ser evitado pela gonadectomia precoce, sendo portanto de extrema importância a detecção precisa de material do cromossomo Y nestas pacientes. Entretanto, indivíduos com gônadas disgenéticas frequentemente exibem mosaicismos com uma das linhagens celulares apresentando cromossomo Y, ou fragmentos cromossômicos, não identificáveis ao nível citogenético.

Com o objetivo de se estabelecer um método simples e sensível para a detecção de material do cromossomo Y nas pacientes com disgenesia gonadal, nós hibridizamos o DNA destas pacientes com um painel de sondas de DNA Y-específicas.

Foram analisadas quatorze pacientes com estigmas turnerianos e cujos cariótipos incluem uma linhagem celular 45,X, além de uma segunda população de células com constituição heterogênea. Quanto à segunda população celular, as pacientes se distribuíram da seguinte maneira: cinco apresentaram cromossomo marcador (45,X/46,X,+mar), quatro pacientes exibiram cromossomo em anel (45,X/46,X,r(?)) e nas cinco restantes o cromossomo Y era aparentemente íntegro.

Nossos resultados evidenciam que a análise molecular, em associação com a citogenética, apuram o nível de sensibilidade para a detecção da presença de material do cromossomo Y. Pelo método de Southern é possível detectar material genético de origem masculina quando este representa no mínimo 5% do DNA analisado.

SUMMARY

Among patients with gonadal dysgenesis, those with normal or altered Y chromosomes in their genome have an increased risk (15-25%) of developing a rare form of gonadal neoplasia, the gonadoblastoma.

This tumor can be prevented by early gonadectomy, therefore the precise detection of Y-chromosomal material is extremely important. However, individuals with gonadal dysgenesis frequently exhibit mosaicism with a cell line containing Y chromosome or chromosome fragments that cannot be diagnosed by cytogenetics analysis.

In order to establish a simple and sensitive method to detect Y-chromosomal material in patients with gonadal dysgenesis, we have hybridized their DNAs with a panel of Y-specific DNA probes.

Fourteen patients with Turner stigmata were analysed. Their karyotypes include a 45,X cell line and a second cell population with heterogeneous constitution. Concerning the second cell population, the patients were distributed as the following: five presented a marker chromosome (45,X/46,X,+mar), four exhibited a ring chromosome (45,X/46,X,r(?)) and the other five the Y chromosome was apparently normal (45,X/46,XY).

Our results showed that the molecular approach in association with cytogenetics, can increase the level of accuracy and sensibility for detection of Y-chromosomal material. By the Southern blot method we are able to detect

male genetic material when it is present in at least 5% of the analysed DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFARA, N.A.; FERGUSON-SMITH, M.A.; TOLMIE, J.; KWOK, K.; MITCHELL, M.; JAMIESON, D.; COOKE, A. & FLORENTIN, L. Variable transfer of Y-specific sequences in XX males. *Nucl. Acids Res.* 14:5375-5387, 1986.
- ALVESALO, L. & de la CHAPELLE, A. Tooth size in two males with deletion of the long arm of the Y chromosome. *Ann. Genet.* 54:49-54, 1981.
- ANDERSSON, M.; PAGE, D.C. & de la CHAPELLE, A. Chromosome Y-specific DNA is transferred to the short arm of the X chromosome in human XX males. *Science* 233:786-788, 1986.
- ANDERSSON, M.; PAGE, D.C.; BROWN, L.G.; ELFFUING, K. & de la CHAPELLE, A. Characterization of a (Y;4) translocation by DNA hybridization. *Hum. Genet.* 778:377-381, 1988.
- ANDREWS, J. Streak gonads and the Y-chromosome. *BR. J. Obstet. Gynecol.* 78:448-457, 1971.
- BEIGUELMAN, B. *Citogenética Humana* 3^o ed. São Paulo, Ed. Guanabara Koogan, 1982.
- BERNSTEIN, R.; ROSENDORFF, J.; RAMSAY, M.; PINTO, M.R. & PAGE, D.C. A unique dicentric X;Y translocation with Xq and Yp breakpoints: cytogenetic and molecular studies. *Am. J. Hum. Genet.* 41:145-156, 1987.

- BILLINCHAM, R.E. & SILVERS, W.K. Induction of tolerance of skin isografts from male donors in female mice. *Science* 128:780, 1958.
- BISHOP, C.E.; GUELLAEN, G.; GELDERWERTH, D.; VOSS, R.; FELLOUS, M. & WEISSENBAACH, J. Single - copy DNA sequences specific for the human Y chromosome. *Nature* 303: 831-832, 1983.
- BISHOP, C.; GUELLAEN, G.; GELDERWERTH, D.; FELLOUS, M. & WEISSENBAACH, J. Extensive sequence homologies between Y and other human chromosome. *J.Mol. Biol.* 173:403-417, 1984.
- BOSTOCK, C.J.; GOSDEN, J.R. & MITCHELL, A.R. Localisation of a male-specific DNA fragment to a sub-region of the human Y chromosome. *Nature* 272:324-328, 1978.
- BRITTEN, R.J. & DAVIDSON, E.H. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* 165: 349-357, 1969.
- BUCKLE, V.; MONDELLO, C.; DARLING, S.; CRAIG, I.W. & GOODFELLOW, P.N. Homologous expressed genes in human sex chromosome pairing region. *Nature Lond.* 317:739-741, 1985.
- BURGOYNE, P.S. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. *Hum. Genet.* 61:85-90, 1982.

- BURGOYNE, P.S. The role of mammalian Y chromosome in spermatogenesis. *Development* 101 supplement: 133-141, 1987.
- BURGOYNE, P.S. Thumbs down for zinc finger? *Nature* 342:860, 1989.
- BURK, R.D.; PATRICK, M.A. & SMITH, K.D. Characterization and evolution of a single-copy sequence from the human Y chromosome. *Mol. Cell. Biol.* 5:576-581, 1985.
- CASPERSSON, T.; LOMAKKA, G. & ZECH, L. The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes-distinguishing characters and variability. *Hereditas* 67:89-102, 1971.
- COOKE, H.J. Repeated sequences specific of human males. *Nature* 262:182-186, 1976.
- COOKE, H.J. & MCKAY, R.D.G. Evolution of a human Y chromosome-specific repeated sequence. *Cell* 13:453-460, 1978.
- COOKE, H.J.; SCHMIDTKE, I. & GOSDEN, J.R. Characterization of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma* 87:491-502, 1982.
- CRAIG, I.W. & TOLLEY, E. Steroid sulphatase and conservation of mammalian X chromosomes. *Trends in Genetics* 22:201-204, 1986.

- DANIEL, A.; LYONS, N.; CASEY, J.H. & GRAS, L. Two dicentric Y chromosomes, one without the Y heterocromatic segment. Review of the Y isochromosomes. *Hum.Genet.* 54: 31-39, 1980.
- DISTECHE, M.C.; BROWN, L. SAAL, H.; FRIEDMAN, C.; THULINE, H.C.; HOAR, D.I.; PAGON, R.A. & PAGE, D.C. Molecular detection of a translocation (Y;15) in a 45,X male. *Hum.Genet.* 74:372-377, 1986a.
- DISTECHE, M.C.; CASANOVA, M.; SAAL, H.; FRIEDMAN, C.; SYBERT, V.; GRAHAM, J.; THULINE, H.; PAGE, D.C. & FELLOUS, M. Small deletion of the short arm of the Y chromosome in 46,XY females. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:7841-7844, 1986b.
- EBENSPERGER, C.; STUDER, R. & EPPLEN, J.T. Specific amplification of the ZFY gene to screen sex in man. *Hum. Genet.* 82:289-90, 1989.
- EICHWALD, E.J. & SILMSER, C.R. Untitled. *Transpl. Bull.* 2:148-149, 1955.
- ERICKSON, R.P.; VERGA, V. & DASOUKI, M. Use of a Probe for the Putative Sex Determining Gene, Zinc Finger Y, in the Study of patients With Ambiguous Genitalia and XY Gonadal Dysgenesis. *Am. J. Med. Genet.* 36:232-236, 1990.

- FERGUSON-SMITH, M.A. Karyotype-phenotype correlation in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. *J. Med. Genet.* 2:142-155, 1965.
- FERGUSON-SMITH, M.A. X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism and of XX Klinefelter's Syndrome. *Lancet* ii:475-476, 1966.
- FERGUSON-SMITH, M.A. Techniques of human chromosome analysis. *La ricerca clin. lab.* 4:279-335, 1974.
- FRACCARD, M.; LINDSTEN, J. & Lo CURTO, F. The origin and phenotype of XO males. *Hum. Genet.* 75:392, 1987.
- FRASER, N.; BALLABIO, A.; ZOLLON, M.; PERSICO, G. & GRAIG, I. Identification of incomplet coding sequences for steroid sulphatase on the human Y chromosome: evidence for a an ancestral pseudoautosoma gene? *Development* 101 supplement:127-132, 1987.
- FRYNS, J.P.; PEDERSEN, J.C.; GODERIS, P. & VAN DER BERGHE, H. Non-fluorescent Y-chromosome in mixed gonadal dysgenesis with 45,X/46,XY mosaicism. *Ann.Genet.* 23:54-56, 1980.

- FRYNS, J.P.; KLECZKOWSKA, A. & VAN DEN BERGHE, H.
Clinical manifestations of Y chromosome deletions in man. In the Y chromosome, Part B: Clinical aspects of Y chromosome abnormalities New York: Alan R.Liss. Inc. pp.151-170, 1985.
- GAL, A.; WEBER, B.; NERI, G.; SERRA, A.; MULLER, U.; SCHEMPP, W. & PAGE, D.C. A 45,X male with Y-specific DNA translocated onto chromosome 15. Am. J. Hum. Genet. 40:477-488, 1987.
- GALAU, G.A.; KLEIN, W.H.; DAVIS, M.M.; WOLD, B.J.; BRITTEN, R.J. & DAVIDSON, E.H. Structural gene sets active in embryo and adult tissues of the sea urchin. Cell 7: 487-505, 1976.
- GANSCHERT-AHLERT, D.; PAWLOWISTZKI, I.H. & GAL, A. Three cases of 45,X/46,X,Ynf mosaicism. Hum. Genet. 76:153-156, 1987.
- GELLER, R.L.; SHAPIRO, L.J. & MOHANDAS, T.K. Fine mapping of the distal short arm of the human X chromosome using X/Y translocations. Am. J. Hum. Genet. 38:884-890, 1986.
- GEMMIL, R.M.; PEARCE-BIRGE, L.; BIXENMAN, H.; HECHT, B.K. & ALLANSON, J.E. Y Chromosome-specific DNA sequences in Turner-Syndrome Mosaicism. Am. J. Hum. Genet. 41:157-167, 1987.

- GERMAN, J.; SIMPSON, J.L. & McLEMORE, G.
Abnormalities of human sex chromosomes I. A
ring Y without mosaicism. *Ann. genet.* 16:225,
1973.
- GERMAN, J. Gonadal dysmorphism explained as a
dosage effect of a locus on the sex
chromosomes, the Gonad-differentiation Locus
(GDL). *Am. J. Hum. Genet.* 42: 414-421, 1988.
- GOODFELLOW, P. Expression of the 12E7 antigen in
controlled independently by genes on the human
X and Y chromosomes. *Different* 23:535-539,
1983.
- GOODFELLOW, P.J.; DARLING, S.M.; THOMAS, N.S. &
GOODFELLOW, P.N. A pseudoautosomal gene in man.
Science 234: 740-743, 1986.
- GROPP, A. & OHNO, S. The presence of a common
embryonic blastema for ovarian and testicular
parenchymal (follicular, interstitial and
tubular) cell in cattle. *Bostaurus .Z.
Zellforsch .* 74:505-528, 1966.
- GUBBAY, J.; COLLIGNON, J.; KOOPMAN, P. CAPEL, B.;
ECONOMOU, A.; MUNSTERBERG, A.; VIVIAN, N.;
GOODFELLOW, P. & LOVELL-BADGE, R. A gene
mapping to the sex-determining region of the
mouse is a member of a novel family of
embryonically expressed genes. *Nature*

346:245-249, 1990.

GUELLAEN, G.; CASANOVA, M.; BISHOP, C.; ELDWORTH, D.; AUDRE, G.; FELLOUS, M. & WEISSENBAACH, J. Human XX males with Y single-copy DNA fragments. *Nature* 307:172-173, 1984.

HOOK, E.B. & WARBURTON, D. The distributuion of chromosomal phenotypes associated with Turner's syndrome: liveborn prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum. Genet.* 64:24-27, 1983.

HUMAN GENE MAPPIN 8 (HGM8) . 8th International Workshop human gene mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 40:ns 1-4, 1985.

JACOBS, P.A. & STRONG, J.A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302, 1959.

JIRASÉK, J.E. Principles of reproductive endrocnology in disorders of sexual determination of sexual (ed.J.L.Simpson) Academic Press, New York. p.51, . C. R. Soc. Biol.141:135, 1947.

JOST, A. Problems of fetal endocrinology the gonadal and hypophyse al hormones. *Rec. Progr. Horm. Res.* 8:379-418, 1953.

- KALUZEWSKI, B.; JAKUBOWSKI, L.; DEBIEC-RYCHTER, M.; KARRL-HEINZ, G.; LIMON, J. & GIBAS, Z. Two mosaic cases with nonfluorescent Y chromosome analysed with Y-specific DNA probes. *Am. J. Med. Genet.* 31:489-503, 1988.
- KOENING, M.; MOISAN, J.P.; HEILING, R. & MANDEL, J.L. Homologies between X and Y chromosomes detected by DNA probes: localization and evolution. *Nucleic Acids. Res.* 13:5485-5501, 1985.
- KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; COLLIGNON, J. & LOVELL-BADGE, R. Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 342:940-942, 1989.
- KOZMA, M. & ADINOLFI, M. In situ fluorescence hybridization of Y translocation: cytogenetic analysis using probes Y190 and Y431. *Clin. Genet.* 33:156-161, 1988.
- KUNKEL, L.M.; SMITH, K.D. & BOYER, S.H. Human Y chromosome specific reiterated DNA. *Science* 191:1189-1190, 1976.
- KUNKEL, L.M.; SMITH, K.D.; BOYER, S.H.; BORGAONKAN, D.S.; WACHTEL, S.S.; MULLER, O.J.; BREG, W.R.; JONES JR., H.W. & RARY, J.M. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc.*

Natl.Acad. Sci.USA 74:1245-1249, 1977.

LALANDE, M.; KUNKEL, L.M.; FLINT, A. & LATT, S.A.
Development and use of metaphase chromosome
flow-sorting methodology to obtain recombinant
phage libraries enriched to parts of X
chromosome. Cytometry 5:101-107, 1984.

LAU, Y.F.; HUANG, J.C.; DOZY, A.M. & KAN, Y.W. A
rapid screening test for antenatal sex
determination. Lancet 1:14-16, 1984.

LEVY, R.; DILLEY, J.; FOX, R.J. & WARNKE, R. A
human thymus leukaemia antigen defined by
hybridoma monoclonal antibodies. Proc. Natl.
Acad.Sci.USA 76:6552-6556, 1979.

LUKUSA, T.; FRYNS, J.P. & VAN DEN BERGHE, H.
Gonadoblastoma fluorescence. Clin. Genet.
29:317-320, 1986.

MADAN, K. & WALKER, S. Possible - evidence for Yp
+ in a XX male. Lancet i:1223, 1974.

MAGENIS, R.E.; BREG, W.R.; CLARK, K.A.; HOOK, E.B.
PALMER, C.G.; PASZTOR, L.M.; SUMMITT, R.L.; &
VAN DIKE, D. Distribution of sex complement in
651 patients with Turners Syndrome. Am. J.
Hum. Genet. 32: 79A, 1980

MAGENIS, R.E. & DOULON, L. Non-fluorescent Y
chromosome Cytology evidence of origin. Hum.
Genet. 60:133-138, 1982.

- MAGENIS, R.E.; WEEBB, M.J.; McKEAN, R.S.; TOMAR, D.; ALLEN, L.J.; KAMMER, H.; VAN DYKE, D.L. & LOURIEN, E. Translocation (X;Y) (p22.3;p11.2) in XX males: etiology of male phenotype. *Hum. Genet.* 62:271-276, 1982.
- MAGENIS, R.E.; TOMAR, D.; SHEEHY, R.; FELLOUS, M.; BISHOP, C. & CASANOVA, M. Y short arm material translocated to distal X short arm in XX males: evidence from in situ hybridization of Y-specific single copy DNA probes. *Am.J. Hum. Genet.* 36:102, 1984a.
- MAGENIS, R.E.; THOCHEN, M.L.; HOLAHAN, K.P.; CAREY, T.; ALLEN, L. & BROWN, M.G. Turner syndrome resulting from partial deletion of Y chromosome short arm: localization of male determinants. *J. pediatrics* 105:916-919, 1984b.
- MAGENIS, R.E.; CASANOVA, M.; FELLOUS, M.; OLSON, S. & SHEEHY, R. Further cytologic evidence for Xp-Yp translocation in XX males using in situ hybridization with Y-derived probe. *Hum. Genet.* 75:288-233, 1987.
- MANIATIS, T.; FRISTSCH, E.F. & SAMBROOK, J. *Molecular cloning: A laboratory.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, 1982.

- MANUEAL, M.; KATAYAMA, K.P. & JONES, H.W. The age of occurrence of gonadal tumors in intersex patients with a Y-chromosome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 124:293-300, 1976.
- MARDON, G. & PAGE, D.C. The sex-determining region of the mouse Y chromosome encodes a protein with a highly acidic domain and 13 zinc fingers. *Cell* 56:765-770, 1989.
- MASERATI, E.; WAIBEL, F.; WEBER, B.; FRACCARO, M.; GAL, A.; PASQUALI, F.; SCHEMPP, W.; SCHERER, G.; VACCARO, R.; WEISSENBAACH, J. & WOLF, U. 45, X male with a Yp/18 translocation. *Hum. Genet.* 74:126-132, 1986.
- McLAREN, A.; SIMPSON, E.; TOMONOKI, K.; CHANDLER, P. & HOGG, H. Male sexual differentiation mice lacking H-Y antigen. *Nature, Lond.* 312:552-555, 1984.
- McCLUNG, C.E. The accessory chromosome - sex determinant? *Biol. Bull.* 3: 43-84, 1902.
- McDOUNOUGH, P.G. & THO, S.P.T. The spectrum of 45,X/46,XY gonadal dysgenesis and its implications, a study of 19 patients. *Pediatr Adolesc Gynecol* 1:1, 1983.

- McDONOUGH, P.G.; THO, S.P.T. & TRILL, J.J. Use of two different deoxyribonucleic acid probes to detect Y chromosome deoxyribonucleic acid in subjects with anormal and altered Y chromosomes. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 154:737, 1986.
- MOREIRA-FILHO, C.A.; WACHTEL, S.S.; DANIEL, A. & PRIEST, J.H. H-Y typing by ELISA in a 46,X,dic(Y)(q11.2101) male: gene-dosage effects of a nonmosaic short arm duplication. *Am. J. Med. Genet.* 26:709-717, 1987.
- MORGAN, T.H. Sex - limited inheritance in drosophila. *Science* 32:120-122, 1910.
- MULLER, U.; DONLON, T.; SCHMID, M.; FITCH, N.; RICHER, C.L.; LALANDE, M. & LATT, S.A. Deletion mapping of the testis determining locus with DNA probes in 46,XX males and in 46,XY,dic (Y) females. *Nucl. Acids. Res.* 16:6489-6505, 1986a.
- MULLER, U.; LALANDE, M.; DISTECHE, C.M. & LATT, S.A. Construction, analysis, and application to 46,XY gonadal dysgenesis of a recombinant phage DNA library from flow sorted human Y chromosomes. *Cytometry* 7:418-424, 1986b.

MULLER, U.; LALANDE, M.; DONLON, T.A. & LATT, S.A. Moderately repeated DNA sequences specific for the short arm of the human Y chromosome are present in XX males and reduced in copy number in an XY female. Nucl. Acids Res. 14:1325-1340, 1986c.

MULLER, U.; DONLON, T.A.; KUNKEL, S.M.; LALANDE, M. & LATT, S.A. Y-190, a DNA probe for the sensitive detection of Y-derived marker chromosomes and mosaicism. Hum. Genet. 75:109-113, 1987a.

MULLER, U.; LATT, S.A. & DONLON, T. Y-specific DNA sequences in male patients with 46,XX and 47,XXX karyotypes. Am. J. Med. Gen. 28:393-401, 1987b.

NISHIOKA, Y. & LAMOTHE, E. Isolation of human chromosomal major repetitive sequences from a flow-sorted Y chromosomal library. AM. J. Hum. Genet. 27(3):711-717, 1987.

PAGE, D.C.; de la CHAPELLE, A. & WEISSENBAACH, J. Chromosome Y-specific DNA in related human XX males. Nature 315:224-226, 1985.

PAGE, D.C. Sex reversal: deletion mapping the male-determining function of the human Y chromosome. In molecular biology of Homo sapiens. Cold Spring Harbor Symposium on

- Quantitative Biology 51:229-235, 1986.
- PAGE, D.C.; MOSHER, R.; SIMPSON, E.M.; FISHER, E.M.
MARDON, G.; POLLACK, J.; MCGILLIVRA, B.; de la
CHAPELLE, A. & BROWN, L. The sex - determining
region of the human Y chromosome encodes a
finger protein. Cell 51: 1091-1104, 1987.
- PAGE, D.C. Hypothesis: a Y-chromosomal gene
causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads.
Development 101 supplement:151-155, 1987.
- PAGE, D.C.; FISHER, E.M.C.; MCGILLIVRAY, B. &
BROWN, L.G. Additional deletion in sex-
determining region of human Y chromosome
resolves paradox of X,t(Y;22) female. Nature
346:279, 1990.
- PAINTER, T. Studies in mammalian spermatogenesis.
II. The spermatogenesis of man. J. Exp.
Zoology 37:291-335, 1923.
- PALMER, M.S.; SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; ELLIS,
N.A.; GOODFELLOW, P.N.; ABBAS, N.E. & FELLOUS,
M. Genetic evidence that ZFY is not the
testis-determining factor. Nature 342:937,
1989.
- PARIS CONFERENCE . SUPPLEMENT . Standardization in
Human Genetics. Birth Defects XI(9):182, 1975.

- PRITCHARD, C.A.; GOODFELLOW, P.J. & GOODFELLOW, P.N. Mapping the limits of the human pseudoautosomal region and a candidate sequence for the male -determining gene. *Nature* 38:273-275, 1987.
- ROBINSON, A.; PRIEST, E. & BIGLER, P.C. Male pseudohermaphrodite with XY/XO mosaicism and bilateral gonadoblastoma. *Lancet* i:111-112, 1964.
- ROSENFELD, R.G.; LUZZATTI, L.; HINTZ, R.L.; LILLER, O.J.; KOO, G.C. & WATCHEL, S.S. Sexual and somatic determinants of the human Y chromosome. Studies in a 46XYp-phenotypic female. *Am.J. Hum.Genet.* 31:458-468, 1979.
- SANDEBERG, A.A. The Y chromosome in human neoplasia. The Y chromosome. Parte B: clinical aspects of Y chromosome abnormalities, Alan R. Liss, New York. Pp.377-793, 1985.
- SCHELLHAS, H.F. Malignant potential of the dysgenetic gonad. *Obstet. Gynecol.* 44:455-462, 1974.
- SCHEMPP, W. & MULLER, U. High resolution replication patterns of the human Y chromosome. Intra and interindividual variation. *Chromosoma* 86: 229-237, 1982.

- SCHEMPP, W.; WERBWR, B.; SERRA, A.; NERI, G.; GAL, A. & WOLF, U. A male 45,X with evidence of translocation of Y eucromatin onto chromosome 15. *Hum. Genet.* 71:150-154, 1985.
- SCULLY, R.E. Gonadoblastoma: a gonadal tumor related to the dysgerminoma (seminoma) and capable of sex-hormone production. *Cancer* 6:445-463, 1953.
- SCULLY, R.E. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 25:1340-1356, 1970.
- SIMPSON, J.L. Gonadal dysgenesis and abnormalities of the human sex chromosomes: Current status of phenotypic-karyotypic correlation. *Birth defects: Orig. Art. Ser.* 11(4) :113, 1975.
- SIMPSON, J.L. Disorders of sexual differentiation. Academic Press, N. Y., 1976.
- SIMPSON, J.L. & PHOTOPHOULOS, G. The relationship of neoplasia to disorders of abnormal sexual differentiation. *Birth Defects* 12:15-20, 1976.
- SIMPSON, E. & GORDON, R.D. Responsiveness to H-Y antigen Ir gene complementation and target cell specificity. *Immunol. Rev.* 35:59-75, 1987.

- SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; PALMER, M.S.; HAWKINS, J.R.; GRIFFITHS, B.L.; SMITH, M.J.; FOSTER, J.W. FRISCHAUT, A.M.; LOVELL-BADGE, R. & GOODFELLOW, P.N. A gene from the sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244, 1990.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoreses. *J. Molec. Biol.* 98:503-517, 1975.
- STALVEY, J.R.D. & ERICKSON, R.P. An improved method for detecting Y chromosomal DNA. *Hum. Genet.* 76:240-243, 1987.
- STEVENS, N.M. Studies in spermatogenesis with especial reference to the "accessory chromosome". *Carnegie Institute Report* 36 (Washington, D.C.), 1905.
- STRUMPF, I.J. Gonadoblastoma in a patient with gonadal dysgenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 92:992-995, 1965.
- SZABO, P.; KUNKEL, L. & YU, L.C. Chromosomal distribution of DNA sequences derived from the human Y chromosome in human higher primates. *Citogenet. Cell. Genet.* 25:212, 1979.

- TETER, J.; PHILIP, J. & WECEWIEZ, G. Mixed gonadal dysgenesis with gonadoblastoma in situ. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 90:929-935, 1964.
- TETER, J. & BOCZKOWSKI, K. Occurrence of tumors in dysgenetic gonads. *Cancer* 20:1301-1310, 1967.
- THO, S.P.T. & McDONOUGH, P.G. Use of Y DNA probes to identify children at risk for dysgenetic gonadal tumors. *Clin. Obstet. Gynecol.* 30 (3):671-681, 1987.
- THO, S.P.T.; BEZADIAN, A.; BYRD, J.R. & McDONOUGH, P.G. Use of human alfa-satellite deoxyribonucleic acid to detect Y-specific centromeric sequences. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159 (6):1553-1557, 1988.
- TIEPOLO, L. & ZUFFARDI, O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y-chromosome long arm. *Hum. Genet.* 34:119-124, 1976.
- TYRKUS, M.; MCCORQUODATE, M.; POSTELLON, D. & FRANCO-SAENZ, R. Atypical gonadal dysgenesis: the role of Yq in determining phenotype and malignancy risk. *Clin. Genet.* 25:259-266, 1984.

- VERGNAUD, G.; PAGE, D.C.; SIMMLER, M.C.; BROWN, L, ROYER, F.; NOEL, B.; BOTSTEIN, D.; de la CHAPELLE, A. & WEISSENBAACH, J.A. Deletion map of the human Y chromosome based on DNA hibridization. *Am. J .Hum. Genet.* 38:109-124, 1986.
- VERP, M.S. & SIMPSON, J.L. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 25:191-218, 1987.
- WACHTEL, S.S.; KOO, G.C.; ZUCKERMAN, E.E.; HAMMER LING, U.; CHEID, M. & BOYSE, E.A. Serological cross reactivity between H-Y (male) antigens of mouse and man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1215-1218, 1974.
- WACHTEL, S.S.; KOO, G.C. & BOYSE, E.A. Evolutionary conservation of H-Y(male) antigen. *Nature* 254:270-272, 1975.
- WACHTEL, S.S.; KOO, G.C.; BREG, W.R.; THALER, H.T. DILLARD, G.M.; ROSENTHAL, I.M.; DOSIK, H.; GERALD, P.S.; SALENGER, P.; NEW, M.; LIERBER, E. & MILLER, O.J. Serologic detection of a Y-linked gene in XX males and XX true hermaphrodites. *New Engl.J.Med.* 295:750-754, 1976.

- WEISSENBAACH, J.; GOODFELLOW, P.N. & SMITH, K.D.
Report of the committee on the genetic
constitution of the Y chromosome. *Cytogenet.
Cell Genet.* 51:438-449, 1989.
- WILLIAMSON, H.O.; UNDERWOOD, P.B.; KREUTNER, A.K.;
ROGERS, J.F.; MATHUR, R.S. & PRATT-THOMAS, H.R.
Gonadoblastoma: clinicopathologic correlation
in six patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.*
126:529-585, 1976.
- WOLFE, J.; ERICSON, R.P. & RIGBY, P.W.J. Cosmid
clones derived from both euchromatic and
heterocromatic regions of the human Y
chromosome. *EMBO J.* 3:1997, 1984.
- WOLFE, J.; DARLING, S.M.; ERICSON, R.P.; CRAIG,
I.W.; BUCKLE, V.J.; RIGBY, P.W.Y.; WILLARD, H.F.
& GOODFELLOW, P.N. Isolation and
characterization of an alphoid centromeric
repeated family from the human Y chromosome. *J.
Mol. Biol.* 182:477-485, 1985.
- WILSON, E.B. The chromosomes in relation to the
determination of sex in insects. *Science*
22:500-502, 1905.
- WILSON, D.M.; HINTZ, R.L.; ROSS, J.C. & ROSENFELD,
R.G. Sex chromosome fragment in a phenotypically
normal female. *Clin. Genet.* 25 (1):36-39, 1986.

- ZUFFARDI, O.; MARASCHIO, P.; CURTO, F.L.; MULLER, U.; GIARDOLA, A. & PEROTTI, L. The role of Yp in sex determination: New evidence from X/Y translocations. *Am. J. Med. Genet.* 12:175-184, 1982.
- YONG, K.E.; WILLARD, H.F. & SMITH, K.D. Molecular and chromosomal organization and analysis of DNA metylation of the human Y chromosome specific 2,1 Kb Hae III DNA fragment. *Am. J. Hum. Genet.* 33:60A, 1983.

ANEXOS

Anexo I

Valores séricos normais para as determinações hormonais

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

Mulheres

Fase folicular		5 a 20 mUI/ml
Meio ciclo		15 a 30 mUI/ml
Fase lútea		5 a 15 mUI/ml
Menopausa		50 a 100 mUI/ml

LH - Hormônio Luteinizante

mulheres

Fase extra ovular	...	0 a 50 ng/ml
Meio do ciclo		135 a 530 ng/ml
Fase pré e pós menopausa.		80 a 650 ng/ml

Fase folicular		1,2 a 12,5 mUI/ml
Fase ovular		12 a 82,2 mUI/ml
Fase lútea		0,4 a 19 mUI/ml
menopausa		14 a 48 mUI/ml

Testosterona		0,27 a 1,1 ng/ml
--------------	-------	------------------

Progesterona

	Fase folicular		0,25 a 2,0 ng/ml
	Fase lútea		2,5 a 25,0 ng/ml
	Menopausa		0,1 a 0,6 ng/ml
T3			80 a 200 ng/ml
T4			4,5 a 12,5 ng/ml
TSH			até 6 mUI/ml
Prolactina			5 a 25 ng/ml
GH			até 7 ng/ml

GRUPO I. Pacientes com cariótipo 45,X/46,X,+mar

Caso 1. JCO ,3 anos, com fenótipo feminino, foi encaminhada ao Ambulatório de Genética Clínica da Unicamp por apresentar malformações congênitas, febre crônica e infecção. Não apresentava ganho de peso . Na análise das metáfases (32 metáfases analisadas) foram observadas duas linhagens celulares, uma 45,X e, a outra encontrada em 78% das células, 46,X,+mar.

Dados antropométricos: estatura 79 cm, peso 9 Kg.

Nos dados físicos foi observado baixa implantação do cabelo, distância intermamilar aumentada e não foi possível visualizar os ovários, o que pode ocorrer nesta faixa etária.

Caso 2. MLL, 20a ,fenótipo feminino, a paciente foi encaminhada para o Ambulatório de Genética da Unicamp por não apresentar evolução no crescimento e convulsões. O exame do cariótipo revelou 45,X/46,X,+mar, sendo que as células com cromossomo marcador apareciam numa frequência de 4% (50 metáfases analisadas)

Dados antropométricos: estatura 131 cm, peso 30Kg.

No exame físico observou-se: pescoço curto e alado, cubitus valgo, mamas em estágio de desenvolvimento II

e com hipertelorismo, genitália externa com clitoromegalia, aumento de pilificação pubiana, pelos axilares escassos, hiperplasia de grandes lábios, útero pequeno. No exame de ultrasonografia foi observado um útero mediano de volume reduzido não sendo possível identificar ovário.

As dosagens hormonais eram: T3 2 = 1.1 ng/ml; T4 = 8.5 ug%; FSH= acima 50 mUI/ml; LH = 48 mUI/ml; progesterona = 0.1 ng/ml.

A paciente iniciou tratamento com hormonioterapia e foi observado mudanças nos caracteres sexuais secundários.

Na gonadectomia encontrou-se útero hipoplásico, gônada direita em fita e gônada esquerda aparentemente normal.

No exame anatomo-patológico foi observado que a gônada direita apresentava um aspecto fibroso semelhante ao de um estroma ovariano revestido de mesotélio mas, desprovido de células germinativas. Presença de nódulos formados por células de Leydig e de fragmentos de estruturas tubulares revestidas por epitélio cilíndrico, sugestivo de morfologia de epidídimo. A gônada esquerda apresentava estroma com restos mesonéfricos e aglomerados de células de Leydig. Também estavam presentes porções de trompa e de epidídimo.

Caso 3. RAM, 26 anos, fenótipo feminino, foi encaminhada ao Ambulatório de Genética da Unicamp por apresentar amenorréia primária. A análise do cariótipo da paciente, incluindo

banda G, revelou cariótipo 45,X/46,X,+G não fluorescente. A linhagem de células com um cromossomo G extra aparecia numa frequência de 1% (83 metáfases analisadas).

Dados antropométricos: estatura 140 cm, peso 51Kg.

Os dados clínicos demonstraram: estatura regular, pescoço alado, cubitus valgo, mamilos hipocorados e invertidos, pilificação axilar escassa, pilificação pubiana em estágio III, coalescência de pequenos lábios obliturando o óstio vaginal, presença de orifício puntiforme neste local, infertilidade, idade óssea 14 anos e, nenhuma anormalidade cardiovascular.

As dosagens hormonais eram: FSH = 50mUI/ml; LH = 53 mUI/ml

A paciente foi submetida a gonadectomia e o material enviado para cariotipagem e exame anatomo-patológico.

O exame anatomo-patológico revelou que a trompa e o ovário direito eram dois fragmentos constituídos, predominantemente, por tecido fibroso vascularizado. Um alongado e, o outro arredondado, elástico, pseudo-acinzentado, medindo em conjunto 2 cm. Um dos fragmentos é de estroma ovariano cortical desprovido de células germinativas que apresenta um pequeno cisto e, aglomerado de células hilares hiperplásicas. A trompa e o ovário esquerdo eram um fragmento alongado, tendo uma das extremidades um formato arredondado, medindo 2.5 x 1 cm. A trompa

apresentava microcalcificação e ovário com estruturas similares a epidídimo.

O cariótipo das gônadas revelou que 100% das células eram 45,X (100 metáfases analisadas).

Caso 4. AR, 20 anos, fenótipo feminino foi encaminhada ao Ambulatório de Genética clínica da Unicamp e apresentava cariótipo 45,X/46,X,+mar sendo o cromossomo marcador um fragmento metacêntrico não identificado como Y com coloração em banda Q (32 metáfases analisadas).

Os primeiros dados físicos demonstraram um déficit de crescimento, cubitus valgo, baixa implantação do cabelo, manchas no corpo, pilificação axilar e pubiana escassa, mamas com tecido glandular e de volume aumentado, obesidade, pubarca, desenvolvimento de caracteres sexuais secundários lentos. Após hormonioterapia com estrógenos conjugados apresentou desenvolvimento do botão mamário e pilificação pubiana, além de um crescimento lento.

Um segundo exame revelou clitoromegalia, abdome sem massa palpável, pele com presença de lesões queratinosas e verrugosas, pelos pubianos em estágio II, orelhas oblíquas, genitália infantil e, sem anormalidades cardiovasculares.

Na ecografia foi observado útero de pequenas dimensões, paredes regulares, sem conteúdo. Ovários apenas

visibilizados, filiformes. A linha média apresentava uma pequena estrutura sólida, correspondente a um útero rudimentar.

As dosagens hormonais eram: T3=205 ng%; T4 =14ug%; LH= 430 ng/ml; FSH= 65mUI/ml.

Antígeno H-Y negativo. A paciente menstruou por dois dias em agosto de 1987.

Foi indicado gonadectomia.

Caso 5. CSO, 24 anos, fenótipo feminino, paciente encaminhada por apresentar amenorréia primária ao Depto. de Medicina da EPM - disciplina de Endocrinologia. Em 60% das metáfases (32 analisadas) a partir de cultura de linfócitos encontrou-se um pequeno cromossomo marcador. Assim a paciente é um mosaico com as linhagens 45,X/46,X+mar O cariótipo foi estudado através de banda G e coloração convencional.

Dados antropométricos: estatura 144 cm, envergadura 144 ; peso 44 Kg.

O exame físico revelou baixa estatura, distância intermamilar normal, infecções urinárias de repetição desde a infância.

A ultrasonografia observou-se útero hipoplásico e os ovários não foram definitivamente localizados.

As dosagens hormonais eram: LH = 12.5 mUI/ml; FSH = 28.5 mUI/ml; GH = basal 5.2 e 180' após indução com clonidina = 13.7 mUI/ml; TSH basal = 2.2 mUI/ml e 120' após indução com TRH = 4.3 mUI/ml; T3 = 187 ng/ml e T4 = 11,9 ug/ml.

Foi realizado gonadectomia e o material encaminhado para exame de cariótipo no qual observou-se que 7% das células apresentava cromossomo marcador.

GRUPO II. Pacientes com cariótipo 45,X/46,XY ou 45,X/47,XYY

Caso 6. RFM, 23 anos, fenótipo feminino, encaminhada ao Ambulatório de Genética clínica da Unicamp por apresentar baixa estatura e amenorréia primária.

A análise das metáfases do sangue periférico revelou o cromossomo Y em 60% das células, sendo assim, a paciente é um mosaico do tipo 45,X/46,XY (50 metáfases analisadas).

Ao exame físico observou-se: cubitus valgo, pescoço normal, mamilos pré-púberes, hipoplasia dos pequenos e grandes lábios, pelos axilares ausentes, pelos pubianos em estágio de desenvolvimento III, desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, clitoromegalia.

Dados antropométricos: estatura 140 cm, peso 46 Kg.

No exame de ecografia bidimensional foi observado útero de volume bem reduzido, textura homogênea, cavidade vazia, anexos não visibilizados, rim direito não localizado.

As dosagens hormonais eram: T3 = 216 ng%; T4 = 10 ug%, FSH = 50 mUI/ml; LH = 56 mUI/ml; testosterona = 0.39 ng/ml.

A paciente menstruou sem irregularidades após a hormonioterapia com progesterona.

O material da gonadectomia foi encaminhado para realização de exame anatomo-patológico e cariótipo de gônadas. O exame anátomo-patológico revelou ovário disgenético com células hilares. Trompa uterina sem alterações histológicas.

O cariótipo da gônada revelou que a linhagem 46,XY estava presente em 35% das células da gônada direita e 15% das células na gônada esquerda.

Caso 7. AFC, 13 anos, fenótipo feminino, encaminhada ao Depto. de Pediatria da EPM por apresentar amenorréia primária. Na análise das 50 metáfases estudadas através de coloração convencional, banda G e banda Q foram encontrada duas linhagens celulares sendo uma 45,X e outra 46,XY,

presente em 64% das células. O cromossomo Y foi evidenciado com banda distal fluorescente.

Nos dados físicos foi observado: baixa estatura, implantação baixa do cabelo, cubitus valgo, pescoço curto, hipertelorismo mamário, amenorréia primária

Dados antropométricos: estatura 123 cm, envergadura 123 cm, peso 31 Kg.

Na ultrasonografia não foi visualizado útero e nem ovário.

A paciente foi submetida a gonadectomia e foram observadas duas fitas ovarianas, restos de tuba uterina e ausência de útero.

Caso 8. MMS, 19 anos, fenótipo feminino, encaminhada ao Ambulatório de Genética clínica da Unicamp por deficiência no crescimento. Na análise de 32 metáfases foi observada a presença de material do cromossomo Y em 50% das células analisadas sendo, portanto, a paciente um mosaico do tipo 45,X/47,XYY.

Os dados clínicos revelaram: cubitus valgo, pescoço curto, implantação do cabelo normal, estatura baixa, pele seca e descamativa, escassez de tecido glandular mamário e ausência de botão mamário, nevos na face, tendência à obesidade, pilificação axilar aumentada, pilificação pubiana aumentada, genitália externa normal com discreta hipoplasia

de pequenos e grandes lábios, amenorréia primária.

Dados antropométricas: estatura 129 cm, peso 32 Kg.

A ultrasonografia revelou ligamentos redondos atróficos, ausência de útero, ausência de gônadas.

As dosagens hormonais eram: T3 =140 ng%; T4 = 8.0 ug%

A paciente foi submetida a gonadectomia e o material encaminhado para exame anatomo-patológico e cariótipo de gônadas.

O exame anatomo-patológico revelou que a paciente não apresentava tecido gonadal apenas, tecido fibroso vascularizado com nódulo calcificado. Ausência de folículo ovariano e células germinativas.

O cariótipo das gônadas revelou presença de material de cromossomo Y em 10% das células analisadas, tanto na gônada esquerdada como na direita (14 metáfases analisadas).

Caso 9. MP, 25 anos, fenótipo feminino, encaminhada ao Ambulatório de Genética clínica da Unicamp por apresentar amenorréia primária. A análise do cariótipo revelou um mosaicismo com 66% das células contendo material do cromossomo Y, portanto, com cariótipo 45,X/46,XY (32 metáfases analisadas).

Ao exame físico observou-se: baixa estatura, áreas de aplasia do couro cabeludo que era de alta implantação, aparecimento espontâneo de caracteres sexuais secundários, clitoromegalia e, sem alterações cardiovasculares..

As dosagens hormonais revelaram FSH baixo.

Dados antropométricos : estatura 140 cm, envergadura 155 cm, peso 52 Kg.

Caso 10. OSB, 20 anos, fenótipo feminino, encaminhada por apresentar deficiência de crescimento. Na análise de 32 metáfases do sangue periférico foi observado a presença de material de cromossomo Y em 90% das células, portanto, cariótipo 45,X/46,XY.

Os dados clínicos demonstraram : pescoço alado, cubitus valgo, hipoplasia mamária, mamilos invertidos, hipertrofia de clitóris, pilificação longa, hímem ausente, sinais característicos da síndrome de Turner.

Dados antropométricos: estatura 140 cm ; peso 41 Kg

Na ultrasonografia pélvica não foi observado útero, em sua topografia observa-se presença de massa sólida, fina, alongada, ecotextura homogênea, medindo 3.9 x 0.4 x 1.8 cm com volume de 1.2 cm cúbicos, sugestivo de útero rudimentar. Anexos não visibilizados.

As dosagens hormonais eram: FSH =143 mUI/ml; LH = 62 mUI/ml, TSH = 2.5 mUI/ml; prolactina = 22.8 ng/ml; T3 = 243 ng%; T4 = 11.4 ug%

A paciente foi submetida a gonadectomia e o material encaminhado para exame de cariótipo de gônadas e exame anatomo-patológico.

No exame anatomo-patológico observou-se ovários em fita e como útero, apenas uma dobra de tecido.O cariótipo da gônada revelou material de cromossomo Y em 6% na gônada direita (100 metáfases analisadas)e 2.3% na gônada esquerda (767 metáfases analisadas).

GRUPO III. Pacientes com cariótipo 45,X/46,X,r(?)

Caso 11. ESR, 10 anos, fenótipo feminino, encaminhada ao Depto. de Pediatria da EPM por apresentar deficiência no crescimento.

Na análise de 50 metáfases, por métodos de coloração convencional e banda G, foram encontradas duas linhagens celulares. Uma das linhagens era 45,X e a outra 46,X,r(?), sendo a linhagem com cromossomo em anel observada em 32% das metáfases .

Nos dados físicos foram observados: baixa estatura, pescoço curto, cubitus valgo,baixa implantação do

cabelo, hipertelorismo mamári, nenhuma anormalidade cardiovascular.

Na ultrasonografia não foi possível visibilizar ovários.

Caso 12. CSC, 10 anos, fenótipo feminino, encaminhada ao Depto. de Pediatria da EPM por apresentar baixa estatura.

Na análise de 50 metáfase através de banda G e por coloração convencional foram encontradas duas linhagens celulares. Além da linhagem 45,X foi encontrado em 28% das metáfases estudadas uma outra linhagem celular 46,X,r(?) .

Os dados clínicos revelaram baixa estatura, pescoço curto, implantação baixa do cabelo, cubitus valgo, hipertelorismo mamário, pelos pubianos em estágio II e, sem anormalidades cardiovasculares.

Dados antropométricos : estatura 123 cm, envergadura 124 cm, peso 30 Kg.

Na ultrasonografia não foi possível visualizar ovários.

Caso 13. APSS , 13 anos, fenótipo feminino, encaminhada ao Depto. de Medicina - Disciplina de Endocrinologia da EPM por apresentar baixa estatura.

Verificou-se em 66% das células o cariótipo 46,X,r(?) e nas demais células, 45,X cromossomos. Este resultado foi obtido pelos métodos de coloração convencional e por banda G. (50 metáfases analisadas) O cromossomo em anel mostra-se não fluorescente em banda Q e no bandeamento C apresenta uma única marcação que corresponde ao centrômero.

Os dados clínicos revelaram: baixa estatura, baixa implantação do cabelo, cubitus valgo, amenorréia primária, hipertelorismo mamário, escassez de pelos pubianos, sem anormalidades cardiovasculares..

Dados antropométricos: estatura 123 cm, envergadura 119 cm.

A paciente foi tratada com hormonioterapia.

Na ultrasonografia observou-se útero com dimensões reduzidas, ovário direito com 1,2 x 00,7 cm e ovário esquerdo com 1,5 x 0,9 cm.

As dosagens hormonais eram: LH = 23 mUI/ml; Testosterona = 64 ng/dl; T4 = 11.5 ng/dl; TSH = 2mUI/ml.

Caso 14. SHS, 6 anos, fenótipo feminino, encaminhada ao Ambulatório de Genética clínica da Unicamp por apresentar atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. A análise de 150 metáfases a partir de sangue periférico revelou a presença de uma linhagem 46,X,r(?) em 21% das células, além da linhagem 45,X.

Os dados clínicos revelam orelhas com baixa implantação, pescoço curto e acentuado retardo no desenvolvimento estatural.

Dados antropométricos : estatura 59 cm, peso 45 Kg.

As dosagens hormonais eram: T3 = 217 ng/dl; T4 = 7.7 ug/dl ; TSH = 8.3 mUI/ml.

Os dados clínicos revelam orelhas com baixa implantação, pescoço curto e acentuado retardo no desenvolvimento estatural.

Dados antropométricos : estatura 59 cm, peso 45 Kg.

As dosagens hormonais eram: T3 = 217 ng/dl; T4 = 7.7 ug/dl ; TSH = 8.3 mUI/ml.

Anexo II

Soluções

. Tampão TEB, pH 8,0

Trizma base (sigma T-1509)		10,8g/l
ácido Bórico		5,5g/l
EDTA 0,2 M		10,0g/l

. 20 X SSC

Cloreto de Sódio		3,0 M
Citrato de Sódio		0,3 M

. Solução de Denhardt's

Polivinil-pirrolidona (PVD-360)		2g/100ml
Ficoll 400		2g/100ml
BSA (Sigma A-4378)		2g/100ml