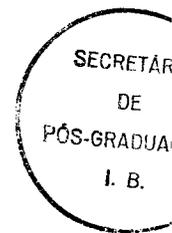


BC/31045
IB/81211

NILMA LÚCIA VIGUETTI CAMPOS



ESTUDO DE SELEÇÃO PREFERENCIAL *IN VITRO* DE
MOSAICOS DE SÍNDROME DE TURNER POR INTERMÉDIO
DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a
Nilma Lúcia Viguetti
Campos
e aprovada pela Comissão Julgadora

13/05/97

Andréa Trevas Maciel Guerra

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

ORIENTADORA: ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA

Campinas - SP
1997

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
V.º	
N.º C.º	
V.º	E
N.º B.º	31075
N.º S.º	251177
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R.º 1.º 50
DATA	12/07/97
N.º CPD	9.000.454789

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

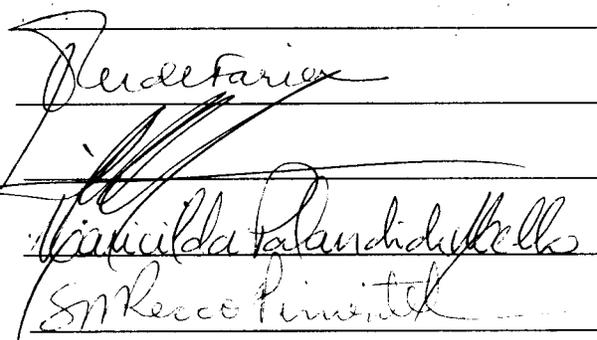
Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra

Profa. Dra. Antônia Paula Marques de Faria

Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel


The image shows five horizontal lines, each with a handwritten signature written across it. The signatures correspond to the names listed to the left: Andréa Trevas Maciel Guerra, Antônia Paula Marques de Faria, Aquiles Eugênio Piedrabuena, Maricilda Palandi de Mello, and Shirlei Maria Recco-Pimentel.

SUPLENTES

Prof. Dr. André Moreno Morcillo

Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Viguetti-Campos, Nilma Lúcia

V689e Estudo de seleção preferencial *in vitro* de mosaicos de síndrome de Turner por intermédio de hibridização *in situ* por fluorescência. / Nilma Lúcia Viguetti-Campos. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997.
52 f: ilus.

Orientadora: Andréa Trevas Maciel Guerra
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Hibridização *in situ*. 2. Cariótipos. 3. Síndromes.
I. Guerra, Andréa Trevas Maciel. II. Universidade Estadual de
Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

A felicidade às vezes é uma benção, mas geralmente é uma conquista. O instante mágico nos ajuda a sair em busca de sonhos. Vamos sofrer, vamos ter momentos difíceis, vamos enfrentar muitas decepções. Mas tudo isso é passageiro, e não deixa marcas.

Paulo Coelho

Dedico este trabalho a meu marido Sidney Pio de Campos, que me deu apoio emocional e computacional durante toda elaboração de minha tese, nos momentos em que o computador resolveu entrar em “pânico”.

Agradecimentos Especiais

A Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra, pela sua dedicada orientação e perseverança.

A Profa. Dra. Christine Hackel, pelo auxílio dado a realização de meu trabalho e ao retoque final no mesmo.

Aos Profs. Drs. Aquiles Eugênio Piedrabuena, Antônia Paula Marques de Faria e Shirley Maria Recco-Pimentel, pelas enriquecedoras correções e sugestões dadas na pré-banca.

Aos amigos que convivem comigo diariamente, pelo apoio recebido no decorrer deste trabalho.

A secretária da pós-graduação da Genética, Tereza por toda colaboração durante o curso.

A agência financiadora CNPQ, pela concessão de bolsa durante 4 anos.

A FAEP pela verba concedida ao projeto.

Índice

INTRODUÇÃO	1
SÍNDROME DE TURNER.....	1
MOSAICISMO E SELEÇÃO <i>IN VITRO</i>	5
HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	10
OBJETIVOS.....	15
CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES.....	37
RESUMO	38
SUMMARY	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
APÊNDICE A	47
APÊNDICE B	49

Introdução

Síndrome de Turner

Descrita por Henry Turner em 1938, a síndrome de Turner caracteriza-se classicamente por um fenótipo feminino associado a baixa estatura, infantilismo sexual com amenorréia primária e esterilidade, além de diversas malformações somáticas.

Polani *et al.* (1954) constataram a ausência do corpúsculo de Barr em certas pacientes que apresentavam agenesia ovariana, porém, somente em 1959, Ford *et al.* observaram o cariótipo 45,X nessas pacientes, descrevendo a primeira anomalia dos cromossomos sexuais. Posteriormente, foram detectadas outras aberrações envolvendo esses cromossomos, com quadro clínico muito semelhante ao das pacientes 45,X, e que também estão incluídas entre as constituições cromossômicas da síndrome de Turner. Kleczkowska *et al.* (1989), estudando 478 portadoras de síndrome de Turner atendidas no decorrer de 24 anos, verificaram que 52% apresentavam cariótipo 45,X, 11% eram mosaicos 45,X/46,XX, 5% mosaicos 45,X/47,XXX, 16% isocromossomos de braço longo ou curto do cromossomo X, 4% correspondem a cromossomo X em anel, 8% a outras aberrações estruturais do cromossomo X, e 4% a mosaicos 45,X/46,XY. Essa variabilidade cariotípica determina uma grande variabilidade fenotípica, dificultando o diagnóstico clínico, até mesmo para especialistas da área. Na verdade, em alguns casos, a baixa estatura pode ser o único sinal clínico detectável.

Além do infantilismo sexual, a baixa estatura é uma característica básica da síndrome de Turner. Costuma ser observada desde o nascimento, mantendo-se, em geral, mais de dois desvios padrão abaixo da média. Há uma combinação de retardamento de crescimento intra-útero com declínio gradual da velocidade de crescimento durante a infância e ausência do estirão puberal, sendo observado, via de regra, atraso de maturação óssea.

Ao exame físico, são comuns diversos sinais dismórficos, tais como face triangular, fendas palpebrais oblíquas para baixo, palato em ogiva, retrognatismo, pavilhões auriculares inclinados

para trás, implantação de cabelos na nuca e em tridente, pescoço curto com pregas pterigonuais (pescoço alado), tórax em escudo com aumento do diâmetro ântero-posterior, distância intermamilar aumentada, encurtamento de quarto e quinto metacarpianos e metatarsianos, unhas hiperconvexas e nevos pigmentados principalmente em face, antebraço e tórax. Na criança recém-nascida, é característica a tríade baixa estatura, linfedema de mãos e pés e excesso de pele no pescoço (de Grouchy e Turleau, 1984).

São freqüentes as malformações cardiovasculares (em 50% dos casos), predominando a coarctação da aorta. Recentemente, após a introdução da ecocardiografia, verificou-se que existe também uma alta incidência de válvula aórtica bicúspide nessas pacientes (Lippe, 1991). Segundo Litvak *et al.* (1978) as anomalias renais e/ou do sistema urinário coletor são ainda mais freqüentes (35 a 70% dos casos). Além disso, são comuns o estrabismo, a miopia acentuada e a hipoacusia neurossensorial. Há um aumento na incidência de doenças auto-imunes, em particular tireoidites, que acabam por determinar hipotireodismo primário (Pai *et al.* 1977). O hipogonadismo apresentado pelas portadoras de síndrome de Turner é de origem gonadal, acompanhando-se, portanto, de níveis elevados de gonadotrofinas hipofisárias. Os ovários são substituídos por tecido fibroso (gônadas em fita), com ausência de elementos da linhagem germinativa. A inteligência, em geral, é normal (de Grouchy e Turleau, 1984), embora existam demonstrações de que as pacientes com síndrome de Turner tenham deficiência no desempenho em áreas específicas, tais como no processamento espaço temporal (Silbert *et al.* 1977), estabilidade de percepção (Nyborg *et al.*, 1977), coordenação visual-motora e aprendizagem motora (Waber, 1979). Apesar de todos os pesquisadores concordarem que existe um déficit cognitivo específico, as áreas de disfunção cognitiva presumida diferem de um relato para outro. Deve-se levar em conta, ainda, que a portadora da síndrome de Turner, devido a baixa estatura e ao hipogonadismo, tende a ser tratada de maneira infantilizada pelos demais, o que certamente prejudica sua auto-imagem e seu desempenho social.

O tratamento dessas pacientes consiste na administração de estrógenos e progestágenos para induzir o surgimento de caracteres sexuais secundários e de ciclos menstruais. Atualmente, existe uma tendência a postergar essa terapia de substituição, e estimular a velocidade de crescimento com

o uso de hormônio de crescimento, oxandrolona, e/ou estrógenos em dose muito baixa (Rosenfeld, 1992).

Em pacientes com cariótipo 45,X, assim como naquelas que apresentam cromossomo Y em sua constituição cromossômica, não se observa corpúsculo de Barr (cromatina X) em núcleos interfásicos da mucosa oral, o que indica, de imediato, a existência de aberração dos cromossomos sexuais. Nos casos de mosaïcismo e de alterações estruturais que coexistem com linhagens 45,X, essa indicação é dada pela frequência de cromatina X abaixo do normal (< 15%) e, também, em alguns casos, pela presença de cromatinas duplas. Existem, porém, alterações estruturais em que se observa cromatina X única e com frequência normal. Sendo assim, embora a cromatina X seja um exame de triagem extremamente útil, ela não detecta a totalidade dos casos de alterações do cromossomo X. Além disso, o que torna obrigatório o estudo citogenético nas pacientes com suspeita clínica de síndrome de Turner é a necessidade de se identificar aquelas com cariótipo contendo um ou mais cromossomos Y, íntegros ou não, em virtude desses indivíduos possuírem um alto risco de desenvolver tumores gonadais malignos (Vergnaud *et al.* 1986).

O cariótipo 45,X é o mais freqüente entre abortos espontâneos, estando presente em quase 9% deles (Hassold *et al.* 1986). Existe um alto índice de seleção intra-uterina contra esses conceptos (>95%), o que levou Kelly *et al.* (1992) a sugerirem que a sobrevivência de um feto com síndrome de Turner exige a presença de mosaïcismo, embora esse nem sempre seja detectado. Hassold *et al.* (1992) identificaram mosaïcismo cromossômico com linhagens 46,XX ou 46,XY entre abortos espontâneos com síndrome de Turner, indicando que mesmo o mosaïcismo não assegura a sobrevivência até o término da gestação, de fetos com linhagem 45,X.

Na experiência de Hall *et al.* (1982), o diagnóstico da síndrome de Turner é feito, em cerca de um terço dos casos, no período neonatal, um terço no decorrer da infância, e o terço restante na adolescência. Além da grande variabilidade fenotípica e da grande dificuldade do não especialista em reconhecer os sinais dismórficos presentes nessa síndrome, a escassez de serviços de Genética Clínica e Citogenética Médica em nosso país faz com que, entre nós, um número maior de pacientes seja diagnosticado tardiamente.

Ao realizarmos o estudo citogenético de 38 meninas com baixa estatura proporcionada e bom desenvolvimento neuropsicomotor, verificamos que 7 (18,4%) eram portadoras de aberrações

dos cromossomos sexuais (Viguetti, 1991). Porém, em outros 14 casos nos quais o cariótipo foi normal em cultura de linfócitos, encontramos uma frequência de cromatina X, em núcleos de mucosa bucal, abaixo de 15%, sendo 8 deles abaixo de 10%. É possível que algumas dessas pacientes fossem portadoras de um criptomosaicismo com linhagem 45,X não detectável com a metodologia utilizada. Isso poderia, em parte, ser devido a uma seleção *in vitro*, favorecendo a linhagem 46,XX em pacientes que apresentam um cariótipo 45,X/46,XX. Assim sendo, seria possível que estudos citogenéticos realizados diretamente, sem cultivo, aumentassem a chance de detecção desses possíveis mosaicismos. A hipótese da seleção *in vitro* baseia-se em vários estudos experimentais que serão detalhados a seguir.

Mosaicismo e Seleção *in vitro*

Mosaicismo cromossômico é definido como a presença de mais de uma linhagem celular em um indivíduo, sendo que todas as linhagens originaram-se de um único zigoto. É frequente que o mosaicismo envolva cromossomos sexuais, e esse fenômeno, por sua vez, é comumente observado em pacientes com síndrome de Turner (Elias *et al.* 1980).

A frequência de casos aparentemente sem mosaicismo (45,X) em relação àqueles com cariótipo 45,X/46,XX, 46,X,i(Xq) e 45,X/46,X,i(Xq) é consideravelmente maior em fetos do que em nativos com síndrome de Turner (Hook e Warburton 1983; Hassold *et al.* 1988). Essa observação, como já foi dito anteriormente, tem levado à especulação de que a presença de uma segunda linhagem aumenta a probabilidade de sobrevivência até o termo e que a maioria, senão todos os indivíduos nativos 45,X, originam-se de um erro mitótico logo após a formação do zigoto; eles, na verdade, teriam cariótipo em mosaico, não detectável pelos métodos convencionais (Hook e Warburton, 1983; Hassold *et al.* 1985; Connor e Loughlin 1989). Acredita-se, assim, que o mosaicismo seja necessário durante a gestação, tendo um efeito protetor sobre o feto, provavelmente pela presença, em dose dupla, de alguns *loci* que se encontram no braço longo do cromossomo X (Hook e Warburton, 1983).

A detecção de mosaicismo cromossômico depende de vários fatores, incluindo o número de células analisadas (Hook 1977), o número e os tipos de tecidos estudados, as técnicas de cultura aplicadas, e se existe ou não seleção *in vivo* ou *in vitro* contra uma das linhagens celulares (Procter *et al.* 1984).

Segundo Held (1992), a detecção de mosaicismo pode ser aperfeiçoada, substancialmente, pela investigação de um segundo tecido, embora no estudo por ele realizado 20 a 25 % das pacientes tenham permanecido com cariótipo 45,X. Esse autor sugere duas explicações para o fato dessas gestações não terem sido perdidas precocemente. Uma delas seria a de mosaicismo embrionário presente em um órgão necessário à sobrevivência intra-uterina, mas não encontrado nos tecidos investigados, como o mosaicismo confinado à placenta (Kalousek *et al.* 1987). A outra hipótese seria a de mosaicismo presente no início da embriogênese, com subsequente perda da segunda linhagem celular durante o desenvolvimento embrionário. Recentemente, Fernandez *et al.*

(1996) verificaram que o estudo de várias centenas de metáfases por hibridização *in situ*, com sondas específicas para os cromossomos X e Y, permitia que se detectasse uma segunda linhagem na grande maioria dos casos em que o cariótipo convencional era 45,X. Em alguns indivíduos, o nível de mosaicismo em células de sangue periférico é tão baixo que não chega a ser detectado por técnicas de biologia molecular que fazem uso direto do DNA extraído dos leucócitos, sendo necessário multiplicar numericamente os segmentos de DNA em estudo por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Held *et al.* 1992).

Segundo Nielsen (1976), em indivíduos com mosaicismo cromossômico tem sido relatado que a proporção das várias linhagens celulares modifica-se ao longo dos anos, sendo que em alguns casos ocorre um aumento e em outros diminuição da frequência da linhagem normal. Entretanto, em outros casos o mosaicismo parece estável.

Vários grupos de investigadores têm estudado a cinética do crescimento *in vitro* e os parâmetros do ciclo celular das células 45,X, com resultados inconsistentes. Hoehn *et al.* (1980) não encontraram diferença no tempo de duplicação da população de células 45,X, quando comparadas a células euplóides. Barlow (1972) e Kukharencó *et al.* (1978) encontraram uma diminuição na duração do ciclo celular de células 45,X, o que determinaria uma diminuição do tempo de duplicação dessa população de células, enquanto Simpson e Le Beau (1981) e Curé *et al.* (1974) chegaram a resultados inversos, segundo eles, o tempo de duplicação é prolongado em linhagens de fibroblastos 45,X e naquelas com certas deleções do cromossomo X, quando comparadas a linhagens 46,XX.

Verp *et al.* (1988) observaram, *in vitro*, a existência de uma desvantagem seletiva das células 45,X e 46,X del (X)(p11) que é consistente com os achados de Simpson e Le Beau sobre tempo de geração celular e fase S prolongados em fibroblastos com essas constituições cromossômicas, e também com estudos *in vivo* demonstrando uma diminuição longitudinal progressiva da linhagem celular anormal em crianças com mosaicismo cromossômico (Nielsen & Krag-Olsen, 1980).

Quanto aos resultados contraditórios obtidos pelos outros pesquisadores com relação à proliferação de células 45,X, esses podem ser atribuídos, como salientam Verp *et al.* (1988), a diferenças nas técnicas utilizadas. Kukharencó *et al.* (1978) empregaram o mesmo método da

porcentagem de mitoses marcadas (Quastler e Sherman, 1959), também usado por Simpson e Le Beau (1981), mas, ao contrário desses últimos, como já foi dito, encontraram um ciclo mitótico mais curto para células 45,X. Entretanto, no trabalho de Kukhareenko (1978) havia poucas mitoses marcadas na segunda divisão, fazendo com que a estimativa acurada do tempo de geração tenha sido dificultado. Além disso, as linhagens celulares utilizadas por esses autores estavam entre a 16° e 23° passagem, o que significa que 50% do tempo de vida da cultura celular já havia sido completado. Já Simpson e Le Beau (1981) usaram células que estavam entre a 2° e a 8° passagem.

Barlow (1972) também havia encontrado um ciclo celular mais curto nas células 45,X, mas, em seus experimentos, as células foram expostas a colquicina por 10 h, e, a seguir, a marcação com timidina por 3h. Inibidores mitóticos tais como a colquicina não bloqueiam a população inteira de células mitóticas, nem bloqueiam as células indefinidamente. Portanto, células 45,X e 46,XX podem ter sido bloqueadas diferencialmente, aumentando a proporção aparente de células mitóticas 45,X. Além disso, 10 h seria um tempo relativamente curto para monitorar a dinâmica de uma população celular (Verp *et al.*, 1988).

Por sua vez, tanto Hoehn *et al.* (1980) quanto Cure *et al.* (1974) determinaram o tempo de duplicação celular por meio da análise de curvas de crescimento. Esse método não mede o tempo do ciclo celular diretamente, mas determina o aumento absoluto no número de células. O tempo de duplicação de uma população obtido dessa forma, portanto, é uma função da fração de células que está se dividindo, e do tempo de geração das células individuais. Um tempo de duplicação da população prolongado, como encontrado por Hoehn *et al.* (1980), tanto poderia ser o resultado de um tempo de geração prolongado quanto de uma fração reduzida de células em divisão. Além disso, erros na contagem das células ou na inoculação dos frascos de cultura, assim como diferenças na amostra (abortos espontâneos, crianças e adultos) e no meio de cultura também podem ter colaborado para os resultados contraditórios observados nos dois estudos em questão (Verp *et al.*, 1988).

O mecanismo pelo qual a ausência de todo ou parte do cromossomo X conferiria desvantagem seletiva de crescimento é desconhecido. Segundo Verp *et al.* (1988), genes que influenciam a duração do ciclo celular podem existir em ambos, braço curto e longo do cromossomo X, análogos aos múltiplos determinantes de estatura e manutenção ovariana no

cromossomo X. A ausência ou perturbação de tais determinantes poderia prolongar o tempo de geração celular, levando a uma desvantagem seletiva para células 45,X e del (X), mas o mecanismo de ação sobre o tempo de geração celular e a fase S é motivo de especulação. Uma possibilidade é que no sexo feminino o produto do gene determinante do tempo de geração celular seja necessário em dose dupla para a manutenção de uma taxa normal de síntese de DNA. Esta hipótese implica, também, em que tais determinantes escapem da inativação, ou que eles devem ser ativados no início do estágio de desenvolvimento.

O tempo de geração celular prolongado poderia explicar o atraso de crescimento intra-uterino, a placenta hipoplásica (Honoré *et al.* 1976), a baixa estatura e as anomalias somáticas devidas ao número diminuído de células durante a organogênese, e que são comumente observadas em indivíduos com um cromossomo X ausente ou aberrante. Um controle rígido da duração do ciclo celular poderia também ser crucial para o desenvolvimento do embrião. O tempo de geração celular significativamente aumentado poderia interferir no início de processos críticos, resultando em morte do embrião e aborto espontâneo. Os poucos conceptos que sobrevivem ao nascimento podem ter distúrbios menos graves no tempo de geração celular do que os conceptos 45,X que resultam em abortos espontâneos (Verp *et al.* 1988). De fato, no trabalho de Cure *et al.* (1974) o tempo de duplicação prolongado encontrado em células derivadas de abortos espontâneos foi de 33 a 45h nas células 45,X, em contraposição a 17 a 25h nas células 46,XX.

A observação de que a frequência de troca de cromátides irmãs (TCI) é aumentada em células 45,X e com anormalidades estruturais do X (Iqbal *et al.* 1984) também é consistente com a hipótese de um tempo de geração prolongado. Logicamente, o ciclo celular aumentado, a desvantagem seletiva e o atraso de crescimento fetal poderiam ser um mero efeito não específico do desequilíbrio cromossômico (Mittwoch 1971). Entretanto, enquanto alguns pesquisadores têm demonstrado um aumento na duração do ciclo celular em fibroblastos portadores de trissomias autossômicas em humanos (Kaback e Bernstein 1970; Schneider & Epstein 1972; Segal & McCoy 1973; Cure *et al.* 1974; Paton *et al.* 1974) e murinos (Hongell 1981; Hongell e Gropp 1982), outros não têm encontrado nenhuma diferença significativa com relação as células normais em fibroblastos trissômicos humanos (Kukharensko *et al.* 1974; Hoehn *et al.* 1980; Kajii *et al.* 1980; Hassold & Sandison 1983) e de murinos (Gropp 1982; Nielsen *et al.* 1985), e outros ainda

observaram uma diminuição no tempo do ciclo celular de células com trissomia do 21 (Heidemann *et al.* 1983). Além disso, a gravidade do efeito sobre o ciclo mitótico não tem correlação com a quantidade de material cromossômico envolvido, seja a mais ou a menos (Epstein, 1986). Portanto, ao invés de um efeito genérico de desequilíbrio cromossômico, o mecanismo poderia ser especificamente relacionado à deficiência do produto gênico de determinantes do ciclo celular existentes no cromossomo X (Verp *et al.* 1988).

Uma estratégia para verificar se existe alguma alteração significativa na proporção de células com um e dois cromossomos X, durante o cultivo de linfócitos realizado para se obter preparações cromossômicas, seria o estudo de núcleos interfásicos por meio de hibridização *in situ* com sondas específicas para o cromossomo X. O próximo tópico, portanto, será dedicado a essa nova ferramenta de estudo em citogenética humana.

Hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* permite a detecção de seqüências de ácidos nucléicos, tanto RNA quanto DNA, em preparações citológicas. Esse método foi aplicado, primariamente, no mapeamento de seqüências de DNA específicas de determinados cromossomos. Ele se baseia nos estudos pioneiros de Gall e Pardue (1971), que utilizaram sondas de RNA ribossômico 18 + 28S marcado para detectar esses genes no nucléolo de Xenopus laevis, e no estudo de Jones (1970), que localizou DNA satélite nas regiões heterocromáticas centroméricas de cromossomos de camundongos. Estudos subseqüentes, por esses e outros investigadores, estenderam a aplicação dessa técnica ao mapeamento de outras seqüências repetidas de DNA em genomas de diferentes espécies.

Por meio dessa técnica, DNAs clonados podem ser utilizados como sondas na identificação de outros segmentos de DNA ou de RNA com seqüências de pares de bases que lhes são complementares. Essa identificação baseia-se na habilidade da fita simples de ácido nucléico encontrar sua fita complementar em solução e renaturar (ou hibridizar) em uma perfeita dupla hélice de ponte de hidrogênio. A sonda de DNA pode ser marcada radioativamente ou com algum grupo químico de fácil detecção. Esse DNA é então desnaturado (isto é, aquecido para separar as duas fitas) e misturado com o ácido nucléico-alvo, também desnaturado, que pode estar ligado a uma membrana de filtro ou fixado em sua localização original, em uma célula ou tecido. A mistura de ácidos nucléicos é então anelada, ou seja, ela é mantida numa temperatura abaixo da temperatura de renaturação da dupla hélice nativa. Sendo assim, ligações formadas entre seqüências pareadas incorretamente têm vida curta, enquanto que seqüências com pareamento perfeito permanecem estáveis. A taxa de renaturação depende da freqüência de colisão entre seqüências complementares que, por sua vez, depende da concentração dessas seqüências. Na técnica de hibridização *in situ*, a alta concentração da sonda de DNA marcado torna possível detectar seqüências de ácidos nucléicos complementares na preparação alvo com alta velocidade e sensibilidade (Therman e Susman, 1994).

A hibridização *in situ* pode ser utilizada para identificar todo um cromossomo ou pequenas regiões destes, diretamente sobre preparações citológicas fixadas em lâmina. O método usado para detectar a sonda de DNA vai depender, então, da marcação utilizada: radioativa ou por

fluorescência. Se a sonda for marcada radioativamente (geralmente com trítium -3H , que decai produzindo uma partícula β de baixa energia), a lâmina é coberta com emulsão fotográfica e estocada no escuro para permitir a marcação radioativa dos grãos de prata presentes na emulsão. A emulsão fotográfica é, então, revelada e os grãos de prata escuros marcam a localização da sonda ligada ao DNA-alvo. A resolução obtida por esse tipo de procedimento autorradiográfico é limitada, porque, ao decair, a partícula β do átomo de 3H pode viajar alguma distância antes de atingir o grão de prata. Desse modo, é freqüente que grãos de prata sejam encontrados em um halo com um raio de, aproximadamente, $0,5\ \mu\text{m}$ ao redor do sítio marcado.

Uma resolução muito melhor é obtida com sondas que podem ser detectadas por fluorescência. A sonda é um DNA no qual a timidina é substituída pela uracila biotilada. Os grupamentos biotina sobre esse DNA modificado não afetam sua propriedade de pareamento, mas o tornam alvo de uma proteína que se liga especificamente à biotina, a avidina, encontrada em alta concentração em ovo branco, ou à streptavidina, uma proteína similar produzida pela bactéria *Streptomyces avidinii*. Após o DNA biotilado ter hibridizado com a seqüência complementar no cromossomo, a avidina marcada com fluoresceína é adicionada. A fluorescência pode ser ainda aumentada adicionando-se um anticorpo anti-avidina marcado com fluoresceína, o que permite a formação de uma camada fina de moléculas fluorescentes ao redor do DNA marcado com a biotina. Os segmentos do cromossomo assim marcados podem, então, ser visualizados em um microscópio de fluorescência.

Métodos para estudar cromossomos usando sondas não radioativas estão aumentando rapidamente (Trask, 1991; Lichter e Ward, 1990). Sondas de DNA contendo bromodesoxiuracila, digoxigenina, dinitrofenol, e outros grupos, podem ser detectadas por anticorpos fluorescentes altamente específicos. Novas sondas nas quais os grupos fluorescentes estão ligados diretamente à sonda do DNA, estão sendo desenvolvidas, eliminando a necessidade de adicionar uma molécula fluorescente que se ligue à sonda. Essas técnicas estão tornando possível preparar um conjunto de sondas específicas que “pintam” diferentes cromossomos, ou diferentes partes dos cromossomos, em diferentes cores (Sasavage, 1992).

Segundo Lichter e Ward (1990), o fato da hibridização *in situ* não isotópica ter se tornado mais popular pode ser atribuído a vários fatores, tais como: a) as sondas podem ser modificadas com “moléculas repórter” (por exemplo, biotina), tanto enzimática quanto quimicamente, e sua

detecção, em geral mediada por proteínas ligadas às “moléculas repórter” (como a avidina), pode ser obtida por diferentes caminhos conforme a necessidade experimental específica; b) sondas marcadas com fluorocromos podem ser visualizadas com microscópio de fluorescência e quantificadas por aparelho de contagem de ftons; compostos pesados, tais como ouro coloidal, podem revelar, de maneira mais precisa, a localização da sonda por meio de microscopia eletrônica; c) os sinais de hibridização podem ser mais precisamente localizados do que sinais isotópicos capturados por uma camada de emulsão, permitindo uma análise com resolução espacial superior e com melhoria dos aspectos quantitativos e qualitativos; d) os métodos de detecção não isotópicos são consideravelmente mais rápidos do que os procedimentos autoradiográficos, e, em alguns casos, como na detecção via quimiluminescência, podem ter maior sensibilidade; e) as sondas não isotópicas são quimicamente estáveis e não são sujeitas a exigências de arranjos especiais; f) diferentes sistemas de detecção de “moléculas repórter” podem ser utilizados para permitir a análise simultânea de várias sondas; g) uma variedade de procedimentos de amplificação podem ser aplicados para aumentar a sensibilidade na detecção do material cromossômico-alvo.

Deve-se salientar, ainda, que um microscópio de imagem digital pode fornecer melhoramentos adicionais na detecção do sinal e no aumento adicional da taxa de sinal. Além disso, a técnica de supressão de hibridização, que inibe os sinais de hibridização de elementos de sequência altamente repetitivas, presentes em toda parte do genoma da maioria dos eucariotos, facilita o uso direto de sondas de qualquer complexidade genética desejada, eliminando a necessidade de gasto de tempo para subclonar sondas de sequência única (Lichter e Ward, 1990).

Em relação ao cromossomo X humano, a procura de sondas moleculares que permitissem a sua identificação por hibridização *in situ* baseou-se no estudo das sequências de DNA alfa satélite. A família alfóide (ou alfa satélite) de seqüências tem sido encontrada em todos os primatas e hibridiza-se, preferencialmente, com a região centromérica dos cromossomos (Singer, 1982). A família de DNA alfóide repetitivo humano consiste de longas unidades monoméricas que se apresentam em arranjos em *tandem*, de 170 pares de base, e está agrupada na heterocromatina constitutiva dos cromossomos humanos (Wu e Manuelidis, 1980).

Os dados obtidos por Waye e Willard (1985) suportam a hipótese de que os cromossomos humanos podem ser caracterizados individualmente por subconjuntos específicos e diferentes de

DNA α satélite, definidos tanto pela periodicidade gerada pela enzima de restrição quanto por sua seqüência primária.

Uma seqüência de DNA alfoide específica do cromossomo X humano, de 2,0Kb, foi identificada por intermédio da clivagem de DNA humano pela enzima Bam HI (Yang *et al.*, 1982; Willard *et al.*, 1983). A clonagem desse fragmento em plasmídios permitiu o mapeamento da seqüência repetida na região Xp11-Xq12, tendo sido estimada a existência de, aproximadamente, 5.000 cópias dessa unidade de 2,0Kb na região pericentromérica, o que pode representar 5 a 10% do material genético desse cromossomo. Essa seqüência repetida revelou-se, em experimentos de hibridização, sob condições de estringência, ser específica para o cromossomo X humano, sendo utilizada como uma sonda de DNA que permite a identificação do centrômero do cromossomo X.

Inicialmente, a hibridização *in situ* foi aplicada com o objetivo de detectar anormalidades em investigações citogenéticas selecionadas, sendo utilizadas, portanto, em preparações de células em divisão (Pinkel *et al.*, 1986). Mais tarde, a aplicação da hibridização *in situ* estendeu-se à secções histológicas embebidas em parafina, principalmente para detecção de RNA ou DNA viral (Porter *et al.*, 1988; Viegas-Péquignot *et al.*, 1989). Recentemente, passou a ser aplicada para a identificação de aberrações numéricas de cromossomos em núcleos interfásicos de tumores malignos; desse modo, a hibridização *in situ* tornou-se a base da chamada “citogenética de interfase” (Hopman *et al.*, 1991; Tiainen *et al.*, 1992).

Citogenética de interfase, um termo introduzido por Cremer *et al.* (1986), vem designando uma nova e especializada proposta para a identificação de aneuploidias em núcleos interfásicos usando sondas de DNA cromossômico específico em um procedimento de hibridização *in situ*. A hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluorescent in situ hybridization-FISH*) está sendo muito utilizada na prática clínica (Lichter e Wand, 1990). Sua alta sensibilidade e o fato de exigir a simples detecção de sinais em núcleos trazem a vantagem de permitir a determinação do número exato de cromossomos por meio da análise de um grande número de células, sendo extremamente útil na determinação da verdadeira porcentagem da linhagem celular anomala, em casos de mosaicismo em diferentes órgãos e tecidos que não estejam em divisão.

A detecção e, especialmente, a exclusão de mosaicismo cromossômico foram tarefas muito difíceis até há poucos anos (Grumbach e Conte, 1992). A síndrome de Turner, particularmente, com sua diversidade genotípica, parece ser um modelo conveniente para demonstrar o valor da aplicação

dessa nova técnica, já que a hipótese atual é de que talvez não existam portadoras da síndrome de Turner com cariótipo 45,X, mas que todas elas, na verdade, sejam mosaicos. É importante, portanto, pesquisar exaustivamente a existência de outra linhagem, que pode conter um segundo cromossomo X ou um Y, estruturalmente normal ou anormal, e determinar acuradamente sua composição e porcentagem.

Muitas das discrepâncias encontradas nas tentativas de correlação cariótipo-fenótipo na síndrome de Turner certamente se devem a investigação citogenética inadequada (Disteche *et al.*, 1986). Pela mesma razão, a presumida existência de linhagem celular 46,XX como a explicação mais razoável para as raras gestações em algumas pacientes com síndrome de Turner (Reyes *et al.*, 1976) raramente chega a ser comprovada. Os avanços da citogenética molecular vem mudando esse panorama, já que as sondas de X e Y permitem a detecção de ambos os cromossomos sexuais sem a necessidade de cultivo celular, e em tecidos que antes não eram acessíveis para a investigação citogenética de rotina. Além disso, a citogenética molecular pode ser utilizada no estudo de seleção *in vitro* de linhagem 45,X.

OBJETIVOS

- O presente trabalho teve como objetivo principal investigar a existência de seleção *in vitro* de linhagens 45,X em culturas de linfócitos de pacientes com diagnóstico prévio de mosaicismo 45,X/46,XX, utilizando a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), a fim de aplicarmos esse conhecimento à investigação citogenética de supostos criptomosaicismos de linhagens 45,X.

- Verificou-se ainda, o efeito do tempo de cultura e do tempo de congelamento das lâminas sobre: a qualidade das lâminas utilizadas para FISH e a frequência de núcleos sem marcação.

- Finalmente, comparou-se na medida do possível, a frequência de células 45,X encontradas no exame de cariótipo e a de núcleos com um único sinal obtido por meio da hibridização *in situ*.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

A casuística (Tabela 1) foi composta de 10 pacientes com síndrome de Turner em mosaico, cujo diagnóstico citogenético era 45,X/46,XX, com idades variando de 6 meses a 19 anos (média = 9a), selecionadas no período de dezembro de 1992 a novembro de 1994 nos Ambulatórios de Crescimento e Desenvolvimento do Departamento de Pediatria e do GIEDDS (Grupo Interdisciplinar de Estudos de Determinação e Diferenciação do Sexo) do Departamento de Genética Médica, no Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Após os devidos esclarecimentos quanto aos objetivos do projeto e procedimentos a serem realizados, os responsáveis pelas pacientes assinaram um termo de consentimento (Apêndice A). A fim de evitar transtornos, a coleta de sangue foi feita, de preferência, por ocasião da obtenção da coleta de sangue para dosagem de hormônios tireoidianos, realizada periodicamente nas pacientes com síndrome de Turner.

O material foi sempre processado logo após a coleta, sendo distribuído em 3 grupos de 3 frascos, contendo meio de cultura. No primeiro deles (grupo A) a hipotonia foi feita logo após, sem que as células chegassem a ser cultivadas. No segundo (grupo B), a cultura foi interrompida após 48h e, no terceiro (grupo C), após 72h. Não foi adicionada colquicina ao meio em nenhum dos frascos, visto que a análise seria feita em núcleos interfásicos.

As lâminas foram conservadas em freezer a -20°C por um período que variou de 6 a 29 meses antes que viessem a ser analisadas.

As lâminas obtidas a partir dos frascos A, B e C das 10 pacientes foram então submetidas a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), com uma sonda α satélite centromérica específica para o cromossomo X (DXZ1) marcada com biotina (Oncor, Gaithersburg, MD, U.S.A.), seguindo o protocolo descrito adiante. Dada a existência de obstáculos burocráticos incontornáveis que impediram, por duas vezes, que os “kits” da ONCOR adquiridos chegassem ao nosso laboratório em condições de uso, essa análise precisou ser realizada em Denver, USA, no laboratório da Profa. Dra. Marileila Varela Garcia, pela Profa. Dra. Christine Hackel, do Departamento de Genética Médica - FCM - UNICAMP.

De cada paciente, foram analisados cerca de 300 núcleos interfásicos de cada grupo de lâminas obtidas dos frascos A, B e C, em um total de cerca de 900 núcleos por paciente.

Verificou-se, assim, a frequência de núcleos com 0, 1, 2 e 3 sinais fluorescentes obtidos por meio de FISH com sonda centromérica de X. Na análise desses núcleos foram utilizados os mesmos critérios elaborados por Hopman *et al.* (1988) para avaliar os sinais de FISH sobre células de tumor isoladas, ou seja o núcleo não deveria estar sobreposto; as células não deveriam estar assimetricamente cobertas por citoplasma; os sinais deveriam ter aproximadamente a mesma intensidade de fluorescência homogênea; não foram levados em conta pontos de hibridização menores; manchas ou sinais fluorescentes difusos (*patchy signals*) somente puderam ser incluídos quando os sinais estavam completamente separados um do outro; dois sinais muito próximos, com aspecto bipartido (*split spots*), foram considerados correspondentes a um único cromossomo. As figuras 1a e 1b (Apêndice B) mostram os tipos de núcleos encontrados.

Na análise estatística dos dados foram utilizados o teste não-paramétrico de Friedman, que se aplica a dados emparelhados, o teste *t*, e o teste exato de Fisher.

São descritos a seguir os protocolos utilizados para cultura de linfócitos e hibridização *in situ* por fluorescência

Cultivo de Linfócitos de Sangue Periférico (modificada de Moorehead *et al.* 1960)

a.1. Colheita

Foram colhidos 3 a 5 ml de sangue por meio de punção venosa com agulha e seringa descartáveis previamente heparinizadas (0,1ml de heparina-Liquemine), após assepsia local com álcool 70%.

a.2. Cultura de Linfócitos

O sangue foi inoculado em 9 frascos de cultura (18 gotas de sangue total heparinizado em cada um dos frascos), que continham meio (HAM-F10 ou RPMI 1690), 20% de soro fetal bovino e 5 gotas de fitohemaglutinina P em cada frasco, num total de 5ml de meio.

Toda a operação foi realizada em câmara asséptica ou fluxo laminar, próximo a um bico de Bunsen, com material estéril. Seis frascos de cultura foram colocados em estufa a 37°C, sendo que 3 deles permaneceram em cultura por 48h e os 3 restantes por 72h, enquanto que nos 3 restantes a hipotonia foi realizada de imediato.

a.3. Hipotonia Progressiva (Pinto Jr., 1988, comunicação pessoal)

Foi utilizada solução hipotônica de KCl 0,075M aquecida a 37°C, sendo que foi acrescentado, a cada tubo, 1ml dessa solução, por 5 vezes, com intervalos de 10 minutos. A cada acréscimo, foi ressuspensionado delicadamente o sedimento com pipeta Pasteur. Após 50 minutos, a hipotonia foi interrompida acrescentando-se 0,5ml de fixador (metanol- ácido acético 3:1) recém preparado.

a.4. Fixação

O material foi centrifugado, por 5 minutos, a 900 rpm. Após retirar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado e aspirado com pipeta Pasteur. Foram acrescentados 4ml de fixador a cada tubo, gotejando delicadamente o conteúdo da pipeta. O material foi ressuspensionado e centrifugado a 900 rpm por 5 minutos. Após retirar o sobrenadante, esse procedimento foi repetido por mais três vezes. Após a última lavagem com fixador, foi deixada uma quantidade de sobrenadante proporcional ao sedimento.

a.5. Preparação das Lâminas

As lâminas limpas foram imersas numa solução de álcool e éter e enxugadas com papel absorvente. Foram pingadas 3 a 4 gotas do material ressuspensionado sobre a lâmina levemente inclinada, deixando secar a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram embaladas e congeladas, até que pudessem ser hibridizadas.

Hibridização *in situ* por fluorescência

b.1. Tratamento das Lâminas

As lâminas foram incubadas a 4°C em etanol 70% por 2 a 25 dias.

A seguir foram desidratadas em uma série de etanóis (70, 85 e 100%), por 2 minutos cada, após o quê foram secas ao ar.

As lâminas foram, então, imersas em ácido acético 70%, sob agitação, por 1 minuto, e após colocadas em PBS (Phosphate-buffered saline) sob agitação, por 1 minuto.

A seguir, foram colocadas em três séries de PBS (Phosphate-buffered saline) (pH 7,2) por 4 minutos cada, sob agitação (~120 rpm).

Foram então novamente desidratadas em uma série de etanóis (70, 85 e 100%), por 2 minutos cada, e secas ao ar.

As lâminas foram incubadas em RNase por 1h a 37°C (150 µl por lâmina de uma solução contendo 100 µg/ml de RNase dissolvida em 2XSSC cobrindo-se em seguida com laminula de 22X50mm em câmara úmida com 2XSSC)

Foram então lavadas em três séries de 2XSSC pH 7,0, por 4 minutos em cada, sob agitação (~120rpm) e, em seguida, desidratadas em uma série de etanóis (70, 85 e 100%), por 2 minutos cada, e secas ao ar.

A seguir, as lâminas foram incubadas, por 5 minutos, em pepsina 0,01% em HCl 0,01M a 37°C. Para isso, foram pré-aquecidos 50 ml de água e 42 µl de HCl 12N; na hora do uso, foram adicionados 50µl de pepsina a 8%. Após esse tratamento, foram lavadas em PBS por 5 minutos, sob agitação (~120 rpm) e incubadas em formaldeído 1% em PBS, por 10 minutos, a 37°C (foram pré aquecidos 50ml de PBS e adicionados 1,37ml de formaldeído 37% Fisher).

Foram ainda lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos, sob agitação (~120 rpm), desidratadas em uma série de etanóis (70, 85 e 100%), por 2 minutos cada, e secas ao ar.

b.2. Desnaturação das Lâminas

Foram pré-aquecidos 40 ml de Formamida a 70%/ 2XSSC pH 7,0 em uma cuba de vidro em banho maria a 75°C (a solução de desnaturação deve estar a 70°C). As lâminas foram colocadas por 4 minutos nessa solução, e depois desidratadas em uma série de etanóis (70, 80 e 95%) a -20°C por 2 minutos cada, e em seguida secas ao ar.

As lâminas foram então reexaminadas em microscópio de contraste de fase, para que se verificasse se as células estavam pálidas quando comparadas com a aparência anterior à hibridização. Em caso positivo elas não eram utilizadas, visto que a hibridização não seria adequada.

As lâminas foram usadas no mesmo dia em que foram desnaturadas.

b.3. Preparação da sonda

A solução da sonda foi aquecida por 5 minutos a 37°C, em seguida foi homogenizada e centrifugada por 2 a 3 segundos. Adicionou-se 1µl da sonda e 50µl de Hybrisol VI, e essa solução foi homogeneizada gentilmente. Em seguida, foi desnaturada em banho-maria a 70°C por 10 minutos e, logo depois, colocada a 4°C, por 2 a 3 minutos.

A solução foi centrifugada por 2 a 3 segundos e, em seguida, colocada no banho a 4°C até que tudo estivesse pronto para a hibridização (a solução da sonda em hybrisol pode ser estocada a -20°C).

b.4. Hibridização

1. Foram colocados 15µl da mistura de hibridização sobre a lâmina.
2. A lâmina foi coberta com uma laminula de 22X50mm.
3. Os lados das laminulas foram selados com cimento de borracha.
4. Em seguida, as lâminas foram colocadas em câmara úmida, que foi umedecida com 2XSSC, a 37°C, por uma noite.

b.5. Lavagem pós-hibridização

1. O cimento de borracha foi removido com uma pinça.
2. As lâminas foram incubadas em 0,25XSSC pH 7,0 pré-aquecido a 72°C, por 5 minutos, sem agitação, sendo que a temperatura do banho-maria era de 75°C).
3. As lâminas foram lavadas duas vezes em Tampão de Lavagem I, por 5 minutos cada, sob agitação (~120rpm).

b.6. Detecção

Os anticorpos foram protegidos da luz e os boréis foram cobertos com papel alumínio; todo o procedimento foi realizado na penumbra.

1. Foi colocada sobre as lâminas uma solução de FITC-avidina (FA), diluída em tampão de bloqueamento I (1:500), e em seguida, elas foram cobertas com lamínula e mantidas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.

2. Na seqüência as lâminas foram lavadas em três séries de tampão de lavagem I, por 5 minutos cada, sob agitação (~120rpm).

3. As lâminas foram então lavadas em tampão de lavagem II por 5 minutos, sob agitação (120rpm).

4. As lâminas foram cobertas com anti-avidina de cabra biotinizada (BA) diluída em tampão de bloqueamento II (1:200), em seguida cobertas com lamínula e deixadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.

5. Em seguida, as lâminas foram lavadas em três séries de tampão de lavagem II por 5 minutos cada, sob agitação (~120rpm).

6. Novamente foi colocada sobre as lâminas uma solução FITC-avidina (FA) diluída em tampão de bloqueamento II (1:500), em seguida foram cobertas com lamínula e deixadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.

7. As lâminas foram lavadas em três séries de tampão de lavagem II por 5 minutos cada, sob agitação (~120rpm).

b.7. Final

1. As lâminas foram lavadas 2 vezes em PBS pH 7,2 por 5 minutos em temperatura ambiente, sob agitação (~120rpm).

2. Foram então desidratadas em uma série de etanóis, 2 minutos em cada, 70, 85 e 100%.

3. Em seguida, foram coradas com uma mistura de DAPI/DABCO 1:1, e cobertas com uma lamínula de vidro.

4. As lâminas foram estocadas por 20 min a 4°C, ou até o dia seguinte.

b.8. Análise

As lâminas foram analisadas em teste-cego em fotomicroscópio Zeiss Axiophot 20 com epi-fluorescência, equipado com filtros individuais para FITC, DAPI e um filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red (Chroma Technology Corp). As imagens digitalizadas foram processadas em um microscópio de fluorescência Olympus acoplado a um fotômetro de alto desempenho do tipo CH250/A acoplado a uma camera CCD, interfaceado por uma estação de trabalho (MacIntosh II) e controlado por um *software* de análise e processamento de imagem desenvolvido por BDS-Image (Biological Detection Systems Inc.-Rockville, MD), que foi usado para produzir imagens amarelo-vermelho do tipo pseudocor com otimização da razão entre o *background* e os sinais.

SOLUÇÕES

1.Tampão de Lavagem I

0,05% de Tween 20 em 4XSSC pH 7,0 (pode ser estocado à temperatura ambiente por várias semanas, devendo o pH ser checado antes do uso).

2.Tampão de Lavagem II

0,05% de Tween 20 em 0,1M de Tris-HCl pH 7,5/ 0,15M NaCl (também pode ser estocado à temperatura ambiente por várias semanas, devendo o pH ser checado antes do uso).

3.Tampão de Bloqueamento I

Leite em pó desnatado diluído a 5% em Tampão de Lavagem I; foi preparado no momento do uso, diluindo-se 0,15 g de leite desnatado em 3ml de Tampão de Lavagem I. A solução foi incubada a 65°C por 15 a 20 minutos, homogenizada por alguns minutos, centrifugada por 15 minutos (1200rpm), e o sobrenadante transferido para um novo tubo, descartando-se o pellet.

4.Tampão de Bloqueamento II

Leite em pó desnatado diluído a 5% em Tampão de Lavagem II; foi repetido o procedimento realizado no Tampão de Bloqueamento I, mas a solução foi centrifugada 2 vezes por 15 minutos antes de descartar o pellet.

5.Solução Estoque de Antifade DABCO

Foram dissolvidos 0,233g de DABCO em 800µl de água obtida de filtro milliq; foram então adicionados 200µl de Tris-HCl 1M pH8,0 e 9ml de glicerol. As alíquotas foram separadas em tubos revestidos de papel alumínio e estocadas a 4°C.

Resultados

A tabela 1 mostra a frequência de células 45,X obtidas no exame de cariótipo, o número de metáfases que foram analisadas e a data que o cariótipo foi realizado. Além disso, mostra a data de coleta do sangue utilizado para preparar as lâminas utilizadas na hibridização *in situ* por fluorescência, o tempo entre o exame de cariótipo e a coleta para hibridização *in situ* por fluorescência, bem como o tempo que as lâminas ficaram congeladas até que a técnica fosse feita.

A tabela 2 mostra os resultados da análise dos núcleos interfásicos feita nas preparações submetidas a hibridização *in situ* com sondas centroméricas de X, tanto no que se refere às marcações esperadas (um ou dois sinais) quanto a outras observadas (núcleos com nenhum ou com três sinais), além dos núcleos excluídos, inadequados para análise (Fig. 2a e 2b - Apêndice B).

Chama a atenção, nessa tabela, a alta frequência de núcleos com três sinais nos casos 9 e 10. No caso nove, particularmente, foi possível observar em algumas metáfases encontradas na lâmina a existência de um cromossomo X dicêntrico na linhagem 46,XX (Fig.3 - Apêndice B).

Na tabela 3, encontram-se os dados a respeito da frequência, de acordo com o tipo de preparação (direta, 48 ou 72h) dos núcleos com uma única marcação fluorescente sobre o total de células com um ou dois sinais. Observa-se, pelo teste não-paramétrico de Friedman, que o tempo de cultura não influenciou a frequência desses núcleos.

As tabelas subseqüentes, por sua vez, mostram que o tempo de cultura também não influenciou de modo significativo a frequência de núcleos excluídos (tabela 4), de núcleos sem marcação fluorescente (tabela 5), nem a de núcleos com três marcações (tabela 6). Observa-se, porém, uma tendência a se obter, conforme aumenta o tempo de cultura, uma melhor qualidade na preparação, com menos núcleos excluídos (tabela 4), e um aumento da frequência de núcleos com três sinais, conforme demonstrado na (tabela 6). Essa última mostra ainda que há heterogeneidade na amostra com referência a núcleos com três sinais, a ponto de inviabilizar a utilização da análise de variância (Fig.4 - Apêndice B).

A tendência na melhoria da qualidade da preparação foi observada na prática, pois, nas lâminas obtidas após 72h de cultura, a análise era bastante facilitada (Fig. 5a e 5b - Apêndice B).

Quanto ao tempo de congelamento, observa-se pelo teste *t* que, embora ele não tenha levado a um aumento da frequência de núcleos excluídos (tabela 7), há uma elevação significativa na frequência de núcleos em que não se obtém qualquer sinal (tabela 8).

A tabela 7 mostra dados a respeito da frequência, por paciente, de núcleos excluídos para análise de hibridização *in situ* e o tempo de congelamento dessas lâminas, e o teste *t* feito com base nesses dados, onde verificamos que não existe uma diminuição significativa da porcentagem de núcleos excluídos, quando as lâminas permanecem menos de doze meses congeladas.

A tabela 8 mostra dados a respeito da frequência, por paciente, de núcleos sem marcação fluorescente pela técnica de hibridização *in situ* e o tempo de congelamento dessas lâminas, além do teste *t* feito com base nesses dados, onde verificamos que em lâminas congeladas a mais de doze meses existe um aumento da porcentagem de núcleos sem marcação fluorescente.

Finalmente, foi feita a análise comparativa entre a proporção de células 45,X no cariótipo e a de núcleos com um único sinal fluorescente sobre o total de núcleos com um ou dois sinais após 72h de cultura (tabela 9). Dentre os quatro casos em que o tempo entre a realização do cariótipo e a coleta de material para FISH foi inferior a doze meses, apenas um mostrou proporções semelhantes, enquanto que os demais diferiram significativamente pelo teste de Fisher. Neles, a frequência de núcleos com um sinal (correspondentes às células 45,X no cariótipo) é significativamente maior do que a observada nas metáfases. Essa diferença foi observada em todos os outros casos, muito embora intervalos maiores de tempo entre o cariótipo e a coleta para FISH não permitam que se afaste a possibilidade de que a modificação na proporção tenha ocorrido *in vivo*, ao longo dos anos.

Tabela 1 - Dados referentes à casuística do presente trabalho.

Paciente	Registro	cariótipo			Data de coleta FISH	Tempo entre cariótipo e coleta para FISH	Tempo de congelamento das lâminas
		freqüência de células 45,X	N*	Data			
1	6791	8,7%	46	10/92	12/92	2m	29m
2	6671	21,4%	14	8/92	6/93	10m	23m
3	6007	27,3%	11	2/92	6/93	1a 4m	23m
4	6212	16%	50	1/92	9/93	1a 8m	20m
5	5004	15,6%	32	1/90	4/94	4a 3m	13m
6	3243	6%	50	10/89	6/94	3a 8m	11m
7	5766	9,4%	32	4/91	7/94	3a 3m	10m
8	5290	8%	50	7/90	7/94	4a	10m
9	7965	82%	50	7/94	7/94	0	10m
10	7919	34%	50	11/94	11/94	0	6m

* número de metáfases analisadas; a = ano; m = meses

Tabela 2 - Resultados de análise ampla dos núcleos interfásicos nas preparações submetidas a hibridização *in situ* com sondas centroméricas de X.

lâmina	marcações esperadas			outras marcações encontradas			núcleos excluídos (exc/T)	Total
	1(1/ST1)	2	ST1	0 (0/ST2)	3 (3/ST2)	ST2		
1.6791/D	145 (0,662)	74	219	30 (0,120)	0	249	51 (0,170)	300
1.6791/48	108 (0,424)	147	255	17 (0,062)	3 (0,011)	275	25 (0,083)	300
1.6791/72	168 (0,691)	75	243	31 (0,112)	3 (0,011)	277	23 (0,077)	300
1.6791/Γ	421 (0,587)	296	717	78 (0,097)	6 (0,007)	801	99 (0,110)	900
2.6671/D	163 (0,682)	76	239	36 (0,130)	1 (0,004)	276	24 (0,080)	300
2.6671/48	146 (0,632)	85	231	33 (0,125)	0	264	36 (0,120)	300
2.6671/72	165 (0,671)	81	246	30 (0,108)	1 (0,004)	277	23 (0,077)	300
2.6671/Γ	474 (0,662)	242	716	99 (0,121)	2 (0,002)	817	83 (0,092)	900
3.6007/D	128 (0,707)	53	181	9 (0,047)	0	190	110 (0,367)	300
3.6007/48	132 (0,706)	55	187	16 (0,078)	1 (0,005)	204	96 (0,320)	300
3.6007/72	121 (0,747)	41	162	30 (0,155)	1 (0,005)	193	107 (0,357)	300
3.6007/Γ	381 (0,719)	149	530	55 (0,094)	2 (0,003)	587	313 (0,348)	900
4.6212/D	96 (0,449)	118	214	21 (0,089)	1 (0,004)	236	63 (0,211)	299
4.6212/48	71 (0,368)	122	193	8 (0,039)	3 (0,015)	204	96 (0,320)	300
4.6212/72	75 (0,377)	124	199	16 (0,074)	1 (0,005)	216	84 (0,280)	300
4.6212 - T	242 (0,399)	364	606	45 (0,069)	5 (0,008)	656	243 (0,270)	899
5.5004/D	84 (0,385)	134	218	10 (0,043)	6 (0,026)	234	66 (0,220)	300
5.5004/48	141 (0,585)	100	241	29 (0,107)	1 (0,004)	271	29 (0,097)	300
5.5004/72	100 (0,467)	114	214	21 (0,085)	4 (0,017)	239	60 (0,201)	299
5.5004/Γ	325 (0,483)	348	673	60 (0,081)	11 (0,015)	744	155 (0,172)	899
6.3243/D	96 (0,539)	82	178	21 (0,104)	3 (0,015)	202	97 (0,324)	299
6.3243/48	74 (0,477)	81	155	11 (0,065)	4 (0,024)	170	130 (0,433)	300
6.3243/72	99 (0,516)	93	192	6 (0,029)	8 (0,039)	206	94 (0,313)	300
6.3243/Γ	269 (0,512)	256	525	38 (0,066)	15 (0,026)	578	321 (0,357)	899
7.5766/D	26 (0,118)	194	220	0	2 (0,009)	222	78 (0,260)	300
7.5766/48	60 (0,249)	181	241	4 (0,016)	2 (0,008)	247	53 (0,177)	300
7.5766/72	69 (0,268)	188	257	10 (0,037)	3 (0,011)	270	30 (0,100)	300
7.5766/Γ	155 (0,216)	563	718	14 (0,019)	7 (0,009)	739	161 (0,179)	900
8.5290/D	93 (0,427)	125	218	13 (0,056)	3 (0,013)	234	66 (0,220)	300
8.5290/48	64 (0,246)	196	260	3 (0,011)	0	263	28 (0,096)	291
8.5290/72	34 (0,224)	118	152	13 (0,076)	5 (0,029)	170	130 (0,433)	300
8.5290/Γ	191 (0,303)	439	630	29 (0,043)	8 (0,012)	667	224 (0,251)	891
9.7965/D	121 (0,504)	119	240	14 (0,053)	12 (0,045)	266	32 (0,107)	298
9.7965/48	45 (0,193)	188	233	5 (0,018)	39 (0,141)	277	23 (0,077)	300
9.7965/72	182 (0,708)	75	257	20 (0,069)	13 (0,045)	290	10 (0,033)	300
9.7965/Γ	348 (0,477)	382	730	39 (0,047)	64 (0,077)	833	65 (0,072)	898
10.7919/D	123 (0,569)	93	216	35 (0,136)	6 (0,023)	257	43 (0,143)	300
10.7919/48	117 (0,588)	82	199	19 (0,084)	9 (0,040)	227	73 (0,243)	300
10.7919/72	117 (0,539)	100	217	25 (0,096)	18 (0,069)	260	40 (0,133)	300
10.7919/Γ	357 (0,565)	275	632	79 (0,106)	33 (0,044)	744	156 (0,173)	900

D= preparação direta; 48= cultura de 48h; 72= cultura de 72h; ST= subtotal; T= total

ST1= subtotal (número de núcleos analisados com 1 e 2 sinais)

ST2= subtotal 1 + núcleos sem ou com 3 sinais

Tabela 3 - Dados a respeito da frequência, por preparação, de núcleos com uma única marcação fluorescente em relação ao total de núcleos com uma ou duas marcações pela técnica de hibridização *in situ*, e análise estatística feita com base nesses dados.

a) Teste de Friedman

Paciente	preparação					
	direta		cultura 48h		cultura 72h	
	valor	ordem	valor	ordem	valor	ordem
1	0,662	2	0,424	1	0,691	3
2	0,682	3	0,632	1	0,671	2
3	0,707	2	0,706	1	0,747	3
4	0,449	3	0,368	1	0,377	2
5	0,385	1	0,585	3	0,467	2
6	0,539	3	0,477	1	0,516	2
7	0,118	1	0,249	2	0,268	3
8	0,427	3	0,246	2	0,224	1
9	0,504	2	0,193	1	0,708	3
10	0,569	2	0,588	3	0,539	1
T	22		16		22	

$$\chi^2 = 2,4; GL = 2; P = 0,30$$

Tabela 4 - Dados a respeito da frequência, por preparação, de núcleos excluídos da análise de hibridização *in situ*, e análise estatística feita com base nesses dados.

a) Teste de Friedman

Paciente	preparação					
	direta		cultura 48h		cultura 72h	
	valor	ordem	valor	ordem	valor	ordem
1	0,170	3	0,083	2	0,077	1
2	0,080	2	0,120	3	0,077	1
3	0,367	3	0,320	1	0,357	2
4	0,211	1	0,320	3	0,280	2
5	0,220	3	0,097	1	0,201	2
6	0,324	2	0,433	3	0,313	1
7	0,260	3	0,177	2	0,100	1
8	0,220	2	0,096	1	0,433	3
9	0,107	3	0,077	2	0,033	1
10	0,143	2	0,243	3	0,133	1
T		24		21		15

$$\chi^2 = 4,2; \text{ GL} = 2; 0,10 < P < 0,20$$

Tabela 5 - Dados a respeito da frequência, por preparação, de núcleos sem marcação fluorescente pela técnica de hibridização *in situ*, e análise estatística feita com base nesses dados.

a) Teste de Friedman

Paciente	preparação					
	direta		cultura 48h		cultura 72h	
	valor	ordem	valor	ordem	valor	ordem
1	0,120	3	0,062	1	0,112	2
2	0,130	3	0,125	2	0,108	1
3	0,047	1	0,078	2	0,155	3
4	0,089	3	0,039	1	0,074	2
5	0,043	1	0,107	3	0,085	2
6	0,104	3	0,065	2	0,029	1
7	0	1	0,016	2	0,037	3
8	0,056	2	0,011	1	0,076	3
9	0,053	2	0,018	1	0,069	3
10	0,136	3	0,084	1	0,096	2
T	22		16		22	

$$\chi^2 = 2,4; GL = 2; P = 0,30$$

Tabela 6 - Dados a respeito da frequência, por preparação, de núcleos com três marcações fluorescentes pela técnica de hibridização *in situ*, e análise estatística feita com base nesses dados.

a) Teste de Friedman

Paciente	preparação					
	direta		cultura 48h		cultura 72h	
	valor	ordem	valor	ordem	valor	ordem
1	0	1	0,011	2,5	0,011	2,5
2	0,004	2,5	0	1	0,004	2,5
3	0	1	0,005	2,5	0,005	2,5
4	0,004	1	0,015	3	0,005	2
5	0,026	3	0,004	1	0,017	2
6	0,015	1	0,024	2	0,039	3
7	0,009	2	0,008	1	0,011	3
8	0,013	2	0	1	0,029	3
9	0,045	1,5	0,141	3	0,045	1,5
10	0,023	1	0,040	2	0,069	3
T	16		19		25	

$$\chi^2 = 4,2; \text{GL} = 2; 0,10 < P < 0,20$$

Tabela 7 - Dados a respeito da freqüência, por paciente, de núcleos excluídos para análise hibridização *in situ* e do tempo de congelamento dessas lâminas, e teste *t* feito com base nesses dados.

A) Mais de 12 meses de congelamento

Paciente	freqüência de núcleos excluídos	tempo de congelamento
1	0,110	29m
2	0,092	23m
3	0,348	23m
4	0,270	20m
5	0,172	13m

$$n = 5 \quad \bar{x} = 0,198$$

$$\sum x = 0,992 \quad (\sum x)^2 / n = 0,197$$

$$\sum x^2 = 0,244 \quad SQ = 0,042$$

$$s^2(x) = 0,012$$

B) Menos de 12 meses de congelamento.

Paciente	freqüência de núcleos excluídos	tempo de congelamento
6	0,357	11m
7	0,179	10m
8	0,251	10m
9	0,072	10m
10	0,173	6m

$$n = 5 \quad \bar{y} = 0,206$$

$$\sum y = 1,032 \quad (\sum y)^2 / n = 0,213$$

$$\sum y^2 = 0,258 \quad SQ = 0,045$$

$$s^2(y) = 0,011$$

$$F = 0,012 / 0,011 = 1,09; \quad F_c(4;4) = 9,6$$

$$t = -0,12; \quad GL = 8;$$

$$t_c = 1,860$$

$$P > 0,45$$

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 < \mu_2$$

Tabela 8 - Dados a respeito da frequência, por paciente, de núcleos sem marcação fluorescente pela técnica de hibridização *in situ* e do tempo de congelamento dessas lâminas, e teste *t* feito com base nesses dados.

A) Mais de 12 meses de congelamento.

Paciente	frequência de núcleos sem marcação	tempo de congelamento
1	0,097	29m
2	0,121	23m
3	0,094	23m
4	0,069	20m
5	0,081	13m

$$n = 5 \quad \bar{x} = 0,092$$

$$\sum x = 0,462 \quad (\sum x)^2 / n = 0,043$$

$$\sum x^2 = 0,044 \quad SQ = 0,002$$

$$s^2(x) = 0,0005$$

B) Menos de 12 meses de congelamento.

Paciente	frequência de núcleos sem marcação	tempo de congelamento
6	0,066	11m
7	0,019	10m
8	0,043	10m
9	0,047	10m
10	0,106	6m

$$n = 5 \quad \bar{y} = 0,056$$

$$\sum y = 0,281 \quad (\sum y)^2 / n = 0,016$$

$$\sum y^2 = 0,020 \quad SQ = 0,004$$

$$s^2(y) = 0,001$$

$$F = 0,001 / 0,0005 = 2,0; F_c(4;4) = 9,6$$

$$t = 2,08; GL = 8;$$

$$t_c = 1,860 \quad P < 0,05$$

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 > \mu_2$$

Tabela 9 - Comparação entre a proporção de células 45,X no cariótipo e a de núcleos com um único sinal por hibridização *in situ* e teste de Fisher feito com base nesses dados nos casos em que o tempo entre a realização do cariótipo e a coleta de material para FISH era inferior a 12 meses.

Paciente	freqüência de células 45,X no cariótipo	freqüência de núcleos com 1 sinal após 72h de cultura*	Tempo entre cariótipo e coleta para FISH	
1	8,7% (4/46)	69,1% (168/243)	2m	P<<0,001
2	21,4% (3/14)	67,1% (165/246)	10m	P<0,001
3	27,3%	74,7%	1a 4m	
4	16%	37,7%	1a 8m	
5	15,6%	46,7%	4a 3m	
6	6%	51,6%	3a 8m	
7	9,4%	26,8%	3a 3m	
8	8%	22,4%	4a	
9	82% (41/50)	70,8% (182/257)	0	P=0,07
10	34% (17/50)	53,9% (117/217)	0	P<0,01

*em relação ao total de núcleos com 1 ou 2 sinais

Discussão

É comum, na prática diária dos profissionais envolvidos na investigação da síndrome de Turner, a relutância em aceitar um resultado de cariótipo 46,XX em pacientes que apresentam baixa estatura e cromatina X abaixo do normal. E é, também, freqüentemente questionada a determinação do número de metáfases a serem analisadas nessas pacientes, para diminuir a probabilidade de que um mosaicismo com linhagem 45,X deixe de ser diagnosticado. Por outro lado, é certo que por mais que se aumente o número de células analisadas sempre pode haver margem a dúvidas. A cultura sistemática de fibroblastos de pele poderia ser uma alternativa para esses casos, porém trata-se de um procedimento invasivo, de custo elevado, e que depende para sua realização de ótimas condições laboratoriais.

Visto que alguns trabalhos sugerem que as células 45,X são desfavorecidas em culturas de longa duração (Simpson e Le Beau, 1981), podemos considerar a hipótese de que as 72h convencionais de cultura poderiam levar também a uma diminuição da proporção de células 45,X dificultando, assim, a detecção do mosaicismo. A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma nova técnica que pode ser aplicada para a identificação dos cromossomos X em grande número de células interfásicas, e, desse modo, permite testar essa hipótese.

Nossos resultados demonstram, porém, que o tempo de cultura não influencia a proporção de células com um sinal fluorescente 45,X sobre o total de células com um e dois sinais (45,X e 46,XX), e que, portanto, se houver de fato seleção *in vitro* contra essas células ela não chega a se manifestar em culturas de curta duração. Assim sendo, o estudo citogenético em preparações diretas não ajudaria no diagnóstico de supostos criptomosaicismos com linhagem 45,X.

O diagnóstico, nesses casos, continua a depender de cultura de fibroblastos, e/ou do aumento de células analisadas, sendo que a técnica de FISH com sonda centromérica de X é de grande ajuda para o estudo de grande número de células, como demonstraram Fernandez *et al.* (1996).

O tempo de cultura também não influenciou a qualidade da preparação de modo estatisticamente significativo, porém observou-se uma tendência a se obter preparações melhores,

mais limpas, o que de fato foi verificado na prática (Fig. 5a e 5b). Não houve influência do tempo de cultura sobre a proporção de núcleos sem marcação fluorescente, o que faz com que a cultura de linfócitos por 72h possa ser indicada para melhorar a qualidade dos estudos por meio de FISH em células interfásicas.

A heterogeneidade observada na freqüência de núcleos com 3 marcações fluorescentes possivelmente se deve à alta freqüência desses núcleos nos casos 9 e 10. No caso 9 isso se explica pelo fato de haver um cromossomo X dicêntrico; no caso 10 pode haver alteração semelhante, ou ainda uma terceira linhagem (47,XXX) não diagnosticada previamente. De todo modo, visto que em mulheres normais observa-se uma pequena proporção de núcleos com três sinais (2,3%), bem como de núcleos sem marcação fluorescente (Ghabrial *et al.* 1995), é prudente que a hibridização *in situ* não seja utilizada no momento para diagnóstico de mosaicismo. No futuro, estudos populacionais amplos em mulheres normais podem vir a definir uma faixa de normalidade a partir da qual possa ser inferida a existência de mosaicismo.

Este trabalho demonstra, ainda, que é possível armazenar lâminas com preparações citológicas por vários anos, sem que isso prejudique a qualidade da preparação. Deve ser levado em conta, porém, que haverá aumento da proporção de núcleos sem sinal fluorescente. Em muitos casos, particularmente aqueles que não envolvem estudo de mosaicismo cromossômico, isso certamente não prejudicará o resultado final.

Finalmente, é bastante curioso o fato de haver diferenças significativas entre a freqüência de núcleos com um e dois sinais fluorescentes e a freqüência de células 45,X e 46,XX no cariótipo em 3 dos 4 casos em que esses exames foram realizados com menos de 12 meses de intervalo. Além disso, com exceção do caso 9, em todos os outros casos a proporção de células com um sinal era maior do que a de metáfases 45,X. Isso nos leva a sugerir que a técnica de FISH possa ser um exame mais sensível para definir a proporção das diferentes linhagens, e cogitar se de fato a análise cromossômica em metáfases é um procedimento aleatório. Pode-se presumir que, de modo semelhante ao sugerido por Barlow (1972), a colquicina não bloqueie de maneira homogênea toda a população de células mitóticas, e que, assim, as células 46,XX possam se mostrar mais adequadas para análise que as 45,X.

Por sua heterogeneidade citogenética peculiar e pelas dificuldades diagnósticas que freqüentemente se apresentam, a síndrome de Turner ainda é um campo aberto para citogeneticistas

e geneticistas clínicos. A metodologia de FISH, ao permitir a detecção de alvos específicos não somente sobre metáfases, mas também em núcleos interfásicos, proporciona uma poderosa ferramenta para detecção mais rápida e mais sensível das anormalidades cromossômicas, o que beneficiará enormemente os estudos sobre a síndrome de Turner.

Conclusões

1. Não há indicação de seleção *in vitro* de linhagens 45,X no decorrer das 72 h de cultura de linfócitos de sangue periférico obtidos de pacientes previamente diagnosticadas como mosaicos 45,X/46,XX, quando as preparações de núcleos interfásicos são submetidas a técnica de FISH, utilizando-se sonda centromérica de X.
2. O cultivo dos linfócitos por 72h tende a determinar uma melhoria na qualidade da lâmina a ser submetida a técnica de FISH.
3. O tempo de cultura não interfere significativamente na frequência de núcleos sem marcação fluorescente.
4. O tempo de congelamento das lâminas não prejudica a qualidade da preparação, porém aumenta a frequência de núcleos sem marcação fluorescente.
5. A proporção de células 45,X inferidas pela marcação fluorescente *in situ* em células interfásicas difere daquela observada na análise das metáfases e é superior a ela na grande maioria dos casos, sugerindo que a hibridização *in situ* seja uma técnica mais sensível e que a análise cromossômica em metáfases talvez não seja um procedimento aleatório

Resumo

É constante a dificuldade em se aceitar um resultado de cariótipo 46,XX em pacientes que apresentam baixa estatura e cromatina X abaixo do normal, e é freqüente o questionamento da determinação do número de metáfases a serem analisadas nessas pacientes, para que um possível mosaicismo de síndrome de Turner com linhagem 45,X não deixe de ser diagnosticado. Uma vez que alguns trabalhos sugerem que as células 45,X são desfavorecidas em culturas de longa duração, foi considerada a hipótese de que as 72h convencionais de cultura levassem a uma diminuição da proporção de células 45,X, dificultando, portanto, a detecção do mosaicismo. A técnica de FISH, ao poder ser aplicada para a identificação dos cromossomos X em grande número de células interfásicas permitiu que essa hipótese fosse testada. Para isso, verificamos o número de sinais fluorescentes obtidos por hibridização *in situ* com sonda centromérica de X em células interfásicas de 10 pacientes previamente diagnosticadas como portadoras de mosaicismo 45,X/46,XX, em preparação direta e após 48 e 72 h de cultura. Conclui-se que não há indicação de seleção *in vitro* de linhagens 45,X no decorrer das 72h de cultura de linfócitos de sangue periférico obtidos dessas pacientes. Observou-se ainda que, em linfócitos cultivados por 72h, há uma melhora da qualidade da lâmina a ser submetida a técnica de FISH. Verificou-se que o tempo de cultura não interfere significativamente na freqüência de núcleos sem marcação fluorescente e que o tempo de congelamento das lâminas não prejudica a qualidade da preparação, mas aumenta a freqüência de núcleos sem marcação fluorescente. Finalmente, observou-se ainda que a proporção de células 45,X inferidas pela marcação fluorescente *in situ* em células interfásicas difere daquela observada na análise das metáfases, sendo até superior a ela na grande maioria dos casos.

Summary

It is often difficult to accept 46,XX as the result of the karyotype of girls with short stature and low frequency of Barr bodies on bucal smears. In such cases there are doubts about the number of metaphases which must be analysed in order to rule out the possibility of a mosaicism 45,X/46,XX. *In vitro* cell growth studies in long term cultures have suggested that proliferation of 45,X cells is impaired, which led us to consider the possibility that the same could occur in a 72 hour conventional culture, thus also impairing detection of mosaicism. In order to verify this possibility, the FISH technique was used to detect X chromosomes in a high number of interphase cells with an X-specific probe. The number of fluorescent signs was determined in interphase cells of 10 previously diagnosed 45,X/46,XX patients in direct preparation as well as after 48 and 72 hours cultures. As a result of this, it was concluded that in this group of patients there is no indication of *in vitro* selection against 45,X lineages in 72 hours lymphocyte cultures. It was also observed that there was an improvement in the quality of the slides for FISH after 72 hours culture. Duration of culture did not interfere significantly in the frequency of nuclei with no fluorescent signs and the quality of the slides was not influenced by the time they were kept frozen. On the other way freezing for long periods rises the frequency of nuclei without fluorescent signs. Finally, it was observed that in the majority of cases the FISH technique gave a higher estimate of the proportion of 45,X cells than the usual metaphase analyses.

Referências Bibliográficas

- BARLOW, P.W.: Differential cell division in human chromosome mosaics. **Humangenetik** **14**, 122-127, 1972.
- CONNOR, J.M. e LOUGHLIN, S.A.R. : Molecular genetics of Turner's syndrome. **Acta Paediatr. Scand.** **356**: 77-80, 1989.
- CREMER, T.; LANDEGENT, J.; BRIICKNER, A.; SCHOLL, H.P. ; SCHARDIN, M.; HAGER, H.D.; DEVILEE, P.; PEARSON, P. e van der PLOEG, M.: Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive *in situ* hibridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. **Hum. Genet.** **74**: 346-352, 1986.
- CURE, S.; BOUÉ, J. e BOUÉ, A.: Growth characteristics of human embryonic cell lines with chromosomal anomalies. **Biomedicine** **21**: 233-236, 1974.
- DISTECHE, C.M.; SAAL, H.; FRIEDMAN,C.; SYBERT, V. e THULINE, H.: Quantitative analysis of sex chromosome mosaicism with X-Y DNA probes. **Am. J. Hum. Gen.** **38**: 751-758, 1986.
- ELIAS, S.; MARTIN, A. O. e SIMPSON, J. L.: Stability of sex chromosome mosaicism. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **136**: 509-512, 1980.
- EPSTEIN, C. J.: **The consequences of chromosome imbalance**. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.
- FERNÁNDEZ, R.; MÉNDEZ, J. e PÁSARO, E.: Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. **Hum. Genet.** **98**: 29-35, 1996.
- FORD, C.E.; JONES, K.W.; POLANI, P.E.; ALMEIDA, J.C.C. e BRIGGS, J.H.:(Turner's syndrome) A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis. **Lancet** **1**: 711-713, 1959.
- GHABRIAL, D.J.; YU, C.Y. e WARBURTON, D.: FISH analysis of X-chromosome aneuploidy in women with multiple spontaneous abortions. **Applied Cytogenetics** **21**(3): 115, 1995.

- GALL, J.G. e PARDUE, M.: Nucleic acid hybridization in cytological preparations, In: **Methods of enzymology** (L. Grossman and K. Moldave, eds.) vol.21, D, 470-480, Academic Press, Nova Iorque, 1971.
- GROPP, A.: Value of an animal model for trisomy. **Virchows Arch. [A]** **395**, 117-131. 1982.
- GROUCHY, de J. e TURLEAU, C. : **Clinical Atlas of Chromosomes**. John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1984.
- GRUMBACH, M.M. e CONTE, F.H.: Disorders of sex differentiation. In: Wilson, J.D., Foster, D.W. (ed.) **Williams textbook of endocrinology**. W.B. Saunders Company, Hardcourt Brace Jovanovick, Nova Iorque, 853-951, 1992.
- HALL, J.G.; SYBERT, V.P.; WILLIAMSON, R.A.; FISHER, N.L. e REED, S.D.: Turner's syndrome. **West J. Med.** **137**: 32-44, 1982.
- HASSOLD, T. e SANDISON, A.: The effect of chromosome constitution on growth in culture of human spontaneous abortions. **Hum. Gen.** **63**: 166-170, 1983.
- HASSOLD, T.; KUMLIN, E.; TAKAESU, N. e LEPPERT, M.: Determination of the parental origin of sex-chromosome monosomy using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.** **37**: 965-972, 1985.
- HASSOLD, T.: Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. **Trends Genet.** **2**: 105-110, 1986.
- HASSOLD, T.; BENHAN, F. e LEPPERT, M.: Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. **Am. J. Hum. Genet.** **42**: 534-541, 1988.
- HASSOLD, T.; PETTAY, D.; ROBINSON, A. e UCHIDA, I.: Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. **Hum. Genet.** **89**: 647-652, 1992.
- HELD, K.R.; KERBER, S.; KAMINSKY, E.; SINGH, S.; GOETZ, P.; SEEMANOVA, E. e GOEDDE, H.W.: Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? **Hum. Genet.** **88**: 288-294, 1992.
- HEIDEMANN, A.; SCHMALENBERGER, B. e ZANKL, H.: Sister chromatid exchange and lymphocyte proliferation in Down syndrome mosaic. **Clin. Genet.** **23**: 139-142, 1983.

- HOEHN, H.; SIMPSON, M.; BRYANT, E.M.; RABINOVITCH, P.S.; SALK, D. e MARTIN, G. M.: Effects of chromosome constitution on growth and longevity of human skin fibroblast cultures. **Am. J. Med. Genet.** 7: 141-154, 1980.
- HONGELL, K.: Proliferation of trisomic and euploid mouse cells *in vitro*. **Clin. Genet.** 19: 510, 1981.
- HONGELL, K. e GROPP, A.: Trisomy 13 in the mouse. **Teratology** 26: 95-104, 1982.
- HONORÉ, L.H.; DILL, F.H. e POLAND, B.J.: Placental morphology in spontaneous human abortuses with normal and abnormal karyotypes. **Teratology** 14: 151-166, 1976.
- HOOK, G.B.: Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. **Am. J. Hum. Genet.** 29: 94-97, 1977.
- HOOK, G.B. e WARBURTON, D.: The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence of diminished fetal mortality and severity in genotypes with structural X abnormalities or mosaicism. **Hum. Genet.** 64: 24-27, 1983.
- HOPMAN, A.H.N.; RAMAEKERS, F.C.S.; RAAP, A.K.; BECK, J.L.M.; DEVILEE, P.; van der PLOEG, M. e VOOYS, G.P.: In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. **Histochemistry** 89: 307-316, 1988.
- HOPMAN, A.H.N.; DUCREN, E. van; KAA, van de; VOOYS, G.P. e RAMAECKERS, F.C.S.: Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routine processed bladder cancer. **Mod. Pathol.** 4: 503-513, 1991.
- IQBAL, M.A.; MARTIN, A.O. e SIMPSON, J.L.: Increased sister chromatid exchanges in human cell lines characterized by monosomy X or structural abnormalities of the X chromosome. **Hum. Genet.** 68: 205-208, 1984.
- JONES, K.W.: The chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. **Nature** 225: 312-315, 1970.
- KABACK, M.M. e BERNSTEIN, L.H.: Biologic studies of trisomic cells growing in vitro. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 171: 526-536, 1970.
- KAJII, T.; FERRIER, A.; NIIKAWA, N.; TAKAHARA, H.; OHAMA, K. e AVIRACHAN, S.: Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. **Hum. Genet.** 55: 87-98, 1980.

- KUKHARENKO, V.I.; GRINBERG, K.N. e KULIEV, A.M.: Mitotic cycles in human cell strains with sex chromosomes aneuploidy. **Hum. Genet.** **42**: 157-162, 1978.
- KUKHARENKO, V.I.; KULIEV, A.M.; GRINBERG, K.N. e TERSKIKH, V.V.: Cell cycles in human diploid and aneuploid strains. **Hum. Genet.** **24**: 285-296, 1974.
- KELLY, T.E.; FERGUSON, J.E. e GOLDEN, W.: Survival of fetuses with 45,X : An instructive case and an hypothesis. **Am. J. Med. Genet.** **42**: 825-826, 1992.
- KLECZKOWSKA, E.; DMOCH, E.; KUBIEN, E.; FRYNS, J.P. e VAN DEN BERGHE, H.: Cytogenetic findings in a consecutive series of 478 patients with Turner syndrome. **Genet. Couns.** **1**: 227-233, 1992.
- KALOUSEK, D.; SCHIFFRIN, A.; BERGUER, A.; SPIER, P.; GUYDA, H. e COLLE, E.: Partial short arm deletions of the X chromosome and spontaneous pubertal development in girls with short stature. **J. Pediatr.** **94**: 891-894, 1979.
- KALOUSEK, D.; DILL, F.J.; PAUTZAR, T. e MCGILLIVRAY, B.C.: Confined chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis. **Hum. Genet.** **77**: 163-167, 1987.
- LICHTER, P. e WARD, D.C.: Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? **Nature** **345**: 93-94, 1990.
- LIPPE, B.: Turner syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America** **vol.20, No 1**, march, 1991.
- LITVAK, A.S.; ROUSSEAU, T.G. e WREDE, L. D.: The association of significant renal anomalies with Turner's syndrome. **J. Urol.** **120**: 671, 1978.
- LONGER-SAFER, P.R.; LEVINE, M. e WARD, D.: Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**: 4381-4385, 1982.
- LADEGENT, J.E.; JANSEN-in-de-wal, N.; van-OMMEN, G.J.; BASS, F.; DEVIJLDER, J.J.; VAN-DUIJN, P. e van der PLOEG, M.: Chromosomal localization of a unique gene by non- autoradiographic in situ hybridization. **Nature** **317**: 175-177, 1985.
- MANUELIDIS, L.: Complex and simple sequences in human repeated DNAs. **Chromosoma** **66**: 23-32, 1978.
- MITTWOCH, U.: Mongolism and sex: a common problem of cell proliferation? **J. Med. Genet.** **9**: 92-95, 1971.

- MOREHEAD, P.S.; NOWEL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M. e HUNGER FORD, A.: chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.** **20**: 613-616, 1960.
- NIELSEN, J.: Cell selection in vivo in normal/aneuploid chromosome abnormalities. **Hum. Genet.** **32**: 203-206, 1976.
- NIELSEN, J. e KRAG-OLSEN, B.: Cell selection in vivo: Follow-up of nine unselected mixoploid children. **Hum. Genet.** **55**: 357-361, 1980.
- NIELSEN, J.; MARCUS, M. e GROPP, A.: In vitro growth kinetics of mouse trisomics 12 and 19. **Hereditas** **102**: 77-84, 1985.
- NYBORG, H. E NIELSEN, J.: Sex chromosome abnormalities and cognitive performance: III. Field dependence, frame dependence, and failing development of perceptual stability in girls with Turner's syndrome. **J. Psychol.** **96**: 205, 1977.
- PAI, G.S.; LEACH, D.C. e WEISS, L.: Thyroid abnormalities in 20 children with Turner syndrome. **J. Pediatr.** **91**: 267- 269, 1977.
- PATON, G.R.; SILVER, M.F. e ALLISON, A.C.: Comparison of cell cycle times in normal and trisomic cells. **Hum. Genet.** **23**:173-182,1974.
- PINKEL, D.; STRAUME, T. e GRAY, J.W. : Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**: 2934-2938, 1986.
- POLANI, P.E.; HUNTER, W.F. e LENOX, B.: Chromosomal sex in Turner's syndrome. **Lancet** **2**: 120, 1954.
- PORTER, J.H.; KHONG, T.Y.; EVANS, M.F.; CHEN, V.T.W. e FLEMING, K.A.: Parvovirus as a cause of hydrops fetalis: Detection by in situ DNA hybridization. **J. Clin. Pathol.** **41**: 381-383, 1988.
- PROCTER, S.E; WATT, J.L.; LLOYD, D.J.; DUFFTY, P.: Problems of detecting mosaicism in skin. A case of trisomy 8 mosaicism illustrating the advantages of in situ tissue culture. **Clin. Genet.** **25**: 273-277, 1984.
- QUASTLER, H. e SHERMAN, F.G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. **Exp. Cell Res.** **174**: 420-438, 1959.
- REYES, F.I.; KOH, K.S. e FAIMAN, C.: Fertility in women with gonadal dysgenesis. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **126**: 668-761, 1976.

- ROSENFELD, R.G.; FRANE, J. e ATTIE, K. M.: Six-year results of a randomized, prospective trial of human growth hormone and oxandrolone in Turner syndrome. **J. Pediatr.** **121**: 49-55, 1992.
- RUDKIN, G.T. e STOLLAR, B.D.: High resolution detection of DNA: RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. **Nature** **265**: 472-474, 1977.
- SASAVAGE, N.: Painting by the chromosome numbers. **J. NIH Res. USA** **4**: 44-46, 1992.
- SCHNEIDER, E.L. e EPSTEIN, C.J.: Replication rate and lifespan of cultured fibroblasts in Down's syndrome. **Proc. Soc. Exp. Biol.** **141**: 1092-1094, 1972.
- SEGAL, D.J. e McCOY, E.E.: Studies on Down's syndrome in tissue culture. **J. Cell Physiol.** **83**: 85-90, 1973.
- SILBERT, A.; WOLFF, P.H. e LILIENTHAL, J.: Spatial and temporal processing in patients with Turner's syndrome. **Behav. Genet.** **7**: 11, 1977.
- SIMPSON, J.L. e LE BEAU, M.M.: Gonadal and statural determinants on the X chromosome and their relationship to *in vitro* studies showing prolonged cell cycles in 45,X; 46,X, del (X) (p11); 46,X, del (X) (q13); and 46,X, del (X) (q22) fibroblasts. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **141**: 930-940, 1981.
- SINGER, M.F.: Highly repeated sequences in mamalian genomes. **Int. Rev. Cytol.** **76**: 67-112, 1982.
- THERMAN, E. e SUSMAN, M.: **Human chromosomes-structure, behavior, and effects.** cap.5, pag. 53-54, Third edition, Springer-Verlag, 1994.
- TIAINEN, M.; HOPMAN, A.; MOESKER, O.; RAMAEKERS, F.; WESSMAN, M.; LAASONEN, A.; PYRHONEN, S.; TAMMILEBTO, L.; MATTSON, K. e KNUUTILA, S.: Intherphase cytogenetics of paraffin sections of malignant pleural mesothelioma. **Cancer Genet. Cytogenet.** **62**: 171-179, 1992.
- TRASK, B.J.: Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. **Trende genet.** **7**: 149-154, 1991.
- VAUGHAN, V.C.; MACKAY, R.J. e BEHRMAN, R.E.: Distúrbios pré-natais. Trad. : Lima, E.S.; Cosendey, E.B. e Silva Jr., E.F., Nelson: **Tratado de pediatria vol.1**, pp. 323-361, 11 edição, Ed. Interamericana, Rio de Janeiro, 1983.

- VERP, M.S.; ROSINSKY, B.; LE BEAU, M.M.; MARTIN, A.O.; KAPLAN, R.; WALLEMARK, C.; OTANO, L. e SIMPSON, J.L.: Growth disadvantage of 45,X and 46,X,del(X) (p11) fibroblasts. **Clin. Genet.** **33**: 277-285, 1988.
- VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; DUTRILLAUX, B.; MAGDELENAT, H. e COPPEY-MOISAN, M.: Mapping of single-copy DNA sequences on human chromosome by in situ hybridization with biotinylated probes: Enhancement of detection sensitivity by intensified-fluorescence digital imaging microscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. usa** **85**: 582-586, 1989.
- VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.: In : **In situ hybridization: a practical approach**, cap. 10, IRL Press Oxford Press, 1992.
- VIGUETTI, N.L.: Estudo citogenético de indivíduos do sexo feminino com baixa estatura proporcionada e bom desenvolvimento neuropsicomotor. **Tese apresentada ao Instituto de Biologia - UNICAMP**, 1991.
- WABER, D.P.: Neuropsychological aspects of Turner's syndrome. **Dev. Med. Child. Neurol.** **21**: 58, 1979.
- WAYE, J.S. e WILLARD, H.F.: Chromosome specific alpha satellite DNA nucleotide sequence analysis of the 2.0 kilobasepair repeat from the human X chromosome. **Nucl. Acid. Res.** **13**: 2731-2743, 1985.
- WILLARD, H.F.; SMITH, D.R. e SUTHERLAND, J.: Isolation and characterization of a major tandem repeated family from the human X chromosome. **Nucl. Acids Res.** **11**: 2017-2033, 1983.
- WU, J.C. e MANUELIDIS, L.: Sequence definition and organization of a human repeated DNA. **J. Mol. Biol.** **142**: 363-386, 1980.
- YANG, T.P.; HAUSEN, S.K.; OISHI, K.K.; RYDER, O.A. e HANKALO, B.A.: Characterization of a cloned repetitive DNA sequence concentrated on the human X chromosome (alpoide DNA/centromere). **Proc. Nat. Acad. Sci.** **79**: 6593-6597, 1982.

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIMENTO

“ESTUDO DE SELEÇÃO PREFERENCIAL IN VITRO DE MOSAICOS DE SÍNDROME DE TURNER POR INTERMÉDIO DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU POR FLUORESCÊNCIA”

Nome: _____

R.G.: _____ H.C.: _____ R. Hosp. Orig. _____

Nome do Responsável: _____ R.G.: _____

Idade: _____ Parentesco: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____

Campinas, ____ de _____ de _____

Realizaremos um projeto de pesquisa em pacientes portadoras de síndrome de Turner que tem por objetivo verificar se existe seleção *in vitro* de linhagens 45,X em linfócitos de sangue periférico obtidos de pacientes comprovadamente portadoras de mosaicismos 45,X/46,XX, a fim de aplicar esse conhecimento à investigação citogenética de supostos criptomosaicismos de linhagens 45,X.

Será necessário uma nova coleta de 3 a 5 ml de sangue do paciente, por profissionais treinados e com materiais descartáveis, para que possam ser realizadas as culturas.

Tal estudo não trará riscos a paciente, e a médio prazo, poderemos estimar com maior precisão a proporção de células 46,XX (normais) na paciente com todas as implicações prognósticas.

O procedimento será esclarecido a paciente e a sua família, caso seja menor de idade, dando-lhes livre arbítrio para participar ou não do projeto.

Todas as informações adquiridas de cada paciente serão confidenciais, e na conclusão do trabalho para publicação em revista médica especializada não haverá identificação das pessoas participantes.

As pacientes serão examinadas pela médica responsável pelo projeto, Dr.(a) _____, que poderá esclarecer quaisquer dúvidas pessoalmente ou pelo telefone do Departamento de Genética Médica, 239-8210. A comissão de ética do hospital poderá ser solicitada pelo telefone 239-7232.

Autorizando a participação na pesquisa o paciente ou responsável assinará o presente termo de consentimento pós-esclarecimento, ficando com uma cópia.

Paciente ou responsável

Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra

Apêndice B

As figuras 1 a 5 foram obtidas por hibridização das células interfásicas de pacientes mosaicos de síndrome de Turner (45,X/46,XX) com sonda centromérica do cromossomo X(DXZ1), marcada com biotina e detectada por FITC (sinal amarelo-esverdeado). Os núcleos foram contra-corados com DAPI, mas uma pseudocor foi utilizada para impressão.

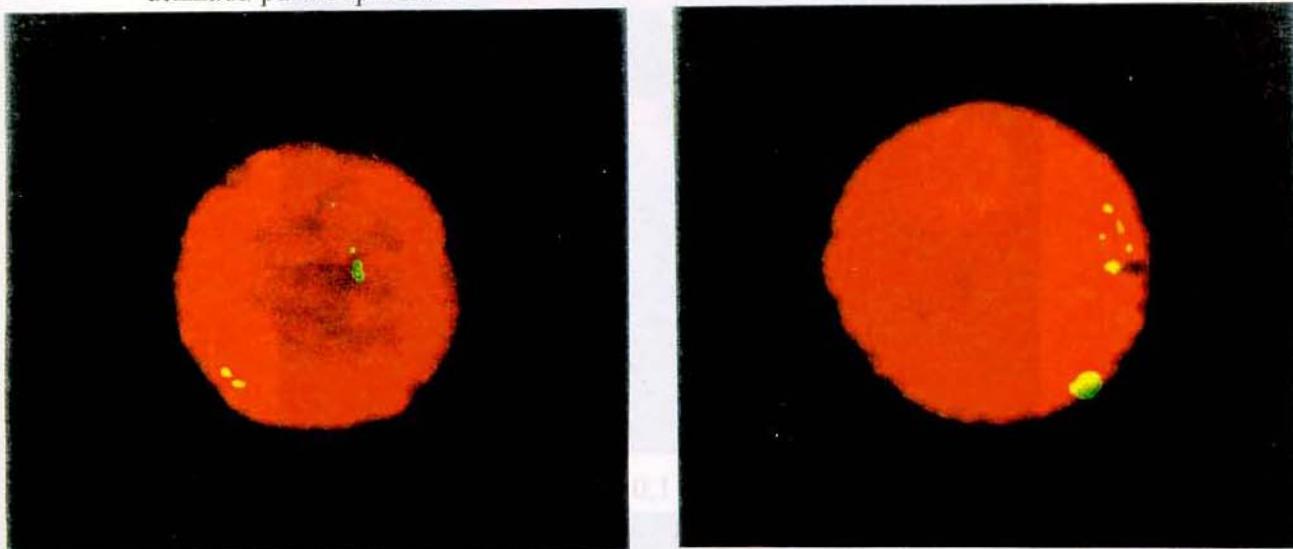


Fig.1a O núcleo da esquerda apresenta dois sinais do tipo *split* e o núcleo da direita apresenta dois sinais, um puntiforme e um esparramado *patchy*.

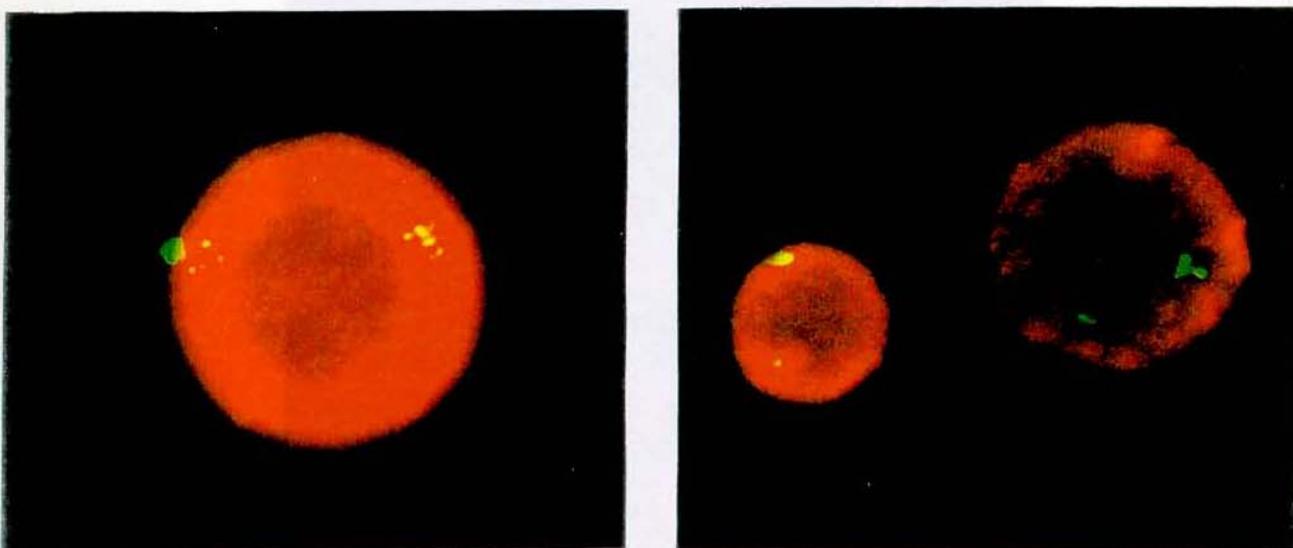


Fig.1b Núcleos interfásicos obtidos de cultura de 72h, onde o da esquerda apresenta dois sinais do tipo *patchy* e os dois núcleos da direita apresentam dois sinais do tipo *split*.

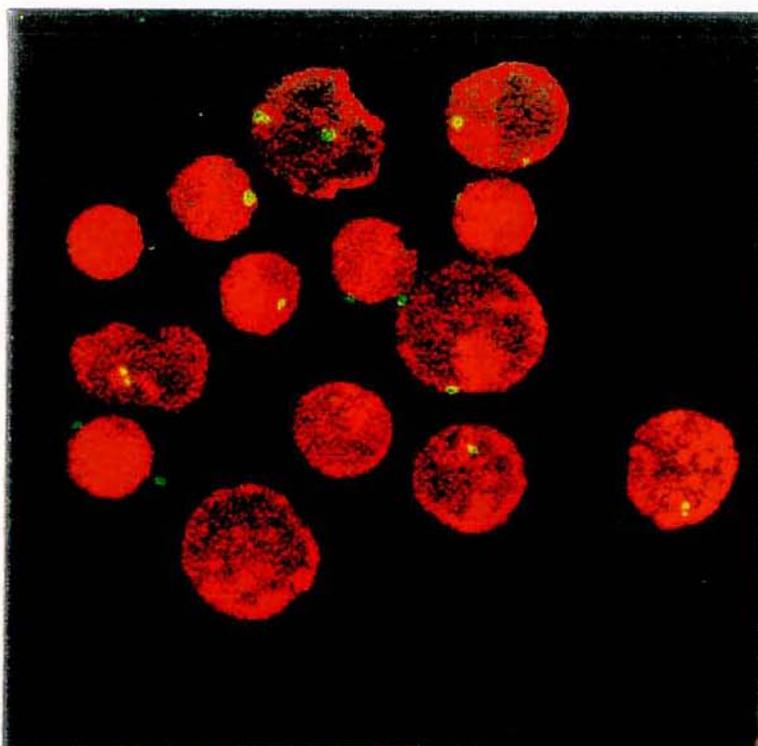


Fig. 2a Núcleos interfásicos apresentando 0,1 e 2 sinais em culturas de 72h com aumento de 40 vezes.

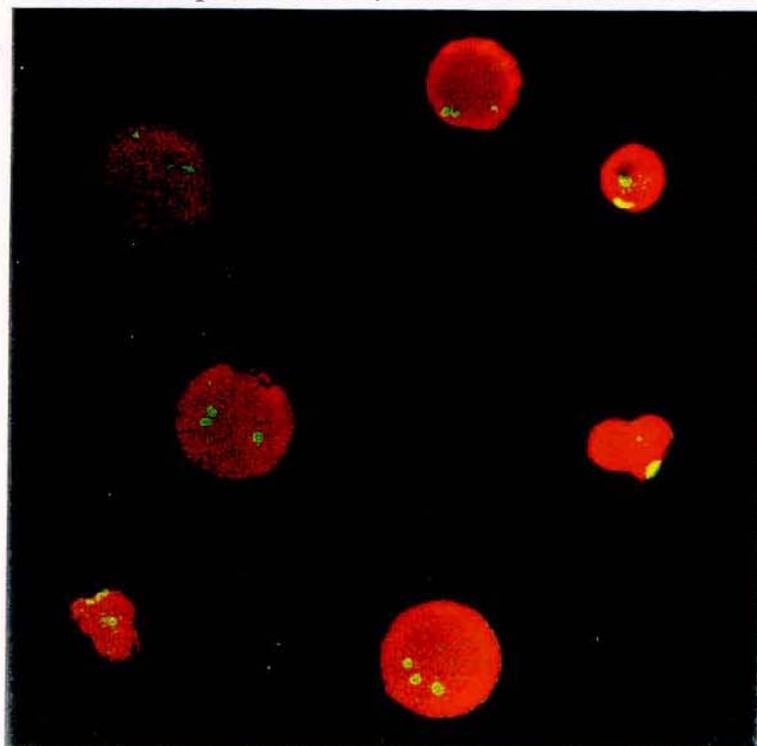


Fig. 2b Núcleos interfásicos apresentando 2 e 3 sinais em culturas de 72h com aumento de 40 vezes.

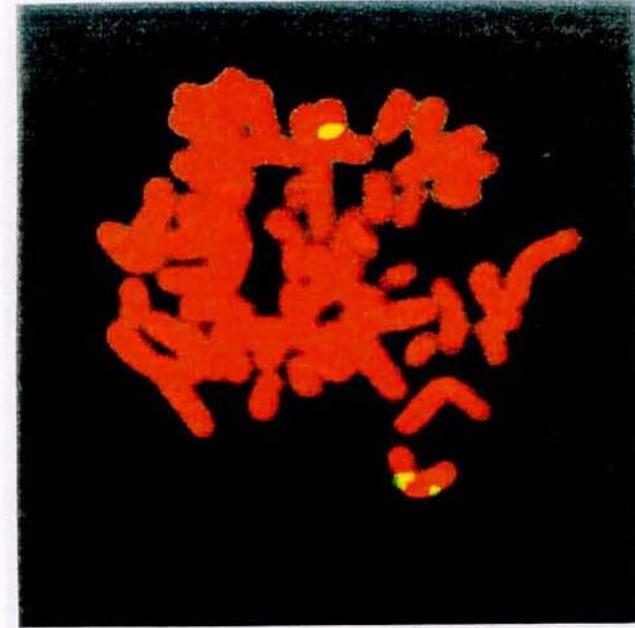


Fig. 3 Metáfase obtida de cultura de 72h, apresentando 3 sinais.

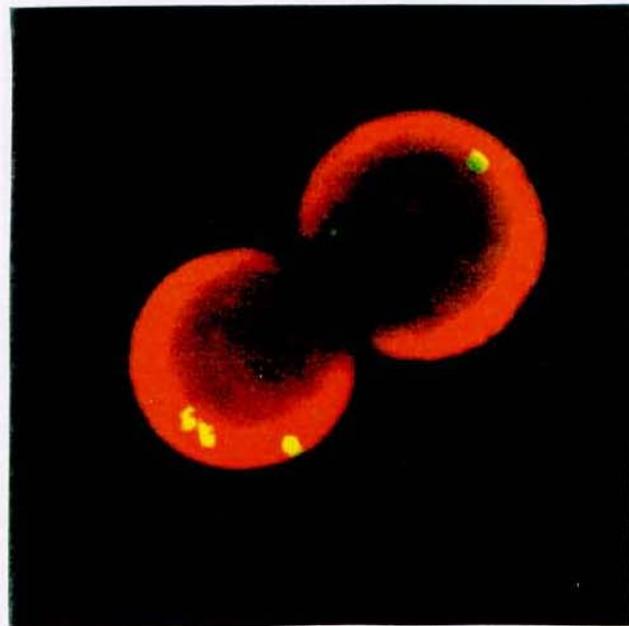


Fig. 4 Dois núcleos interfásicos com 3 sinais, obtido de cultura de 72h.

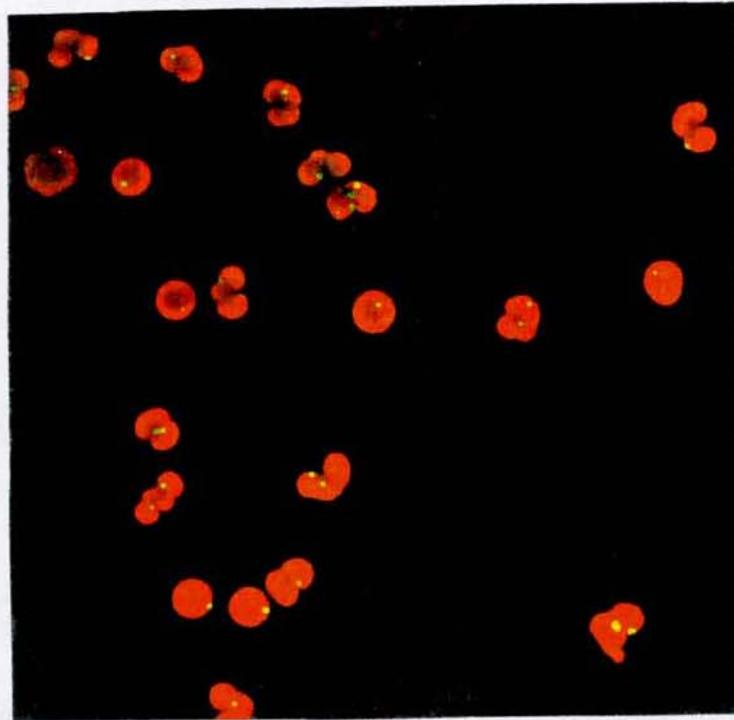


Fig. 5a FISH utilizando sonda centromérica de X em núcleos interfásicos em preparação direta com aumento de 40 vezes.

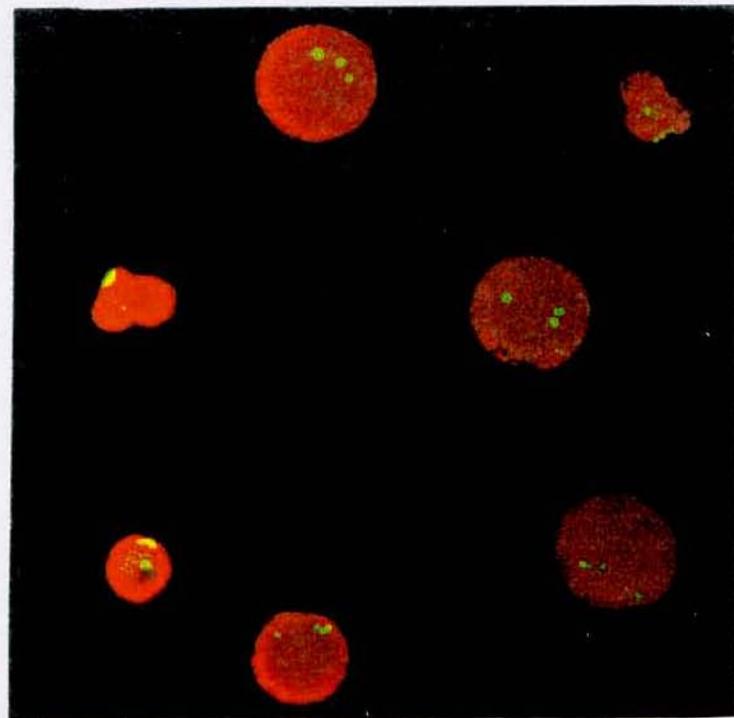


Fig. 5b FISH utilizando sonda centromérica de X em núcleos interfásicos provenientes de cultura de 72h com aumento de 40 vezes.