

BC/35038

IB/80354



UNICAMP

**ESTUDO DE SEQÜÊNCIAS DO CROMOSSOMO Y EM
PACIENTES COM DISTÚRBIOS DE DIFERENCIAÇÃO
GONADAL**

JULIANA GODOY ASSUMPCÃO

1998

T/UNICAMP

As79_e



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
 INSTITUTO DE BIOLOGIA
 CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ESTUDO DE SEQÜÊNCIAS DO CROMOSSOMO Y EM
 PACIENTES COM DISTÚRBIOS DE DIFERENCIAÇÃO
 GONADAL**

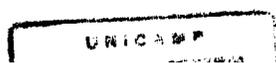
JULIANA GODOY ASSUMPÇÃO

Orientador: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
 da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
 para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
 Biológicas, área de concentração: Genética Humana.

Este exemplar corresponde à redação final
 da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Juliana Godoy Assumpção
 e aprovada pela Comissão Julgadora.
02/6/98 *Maricilda Palandi de Mello*

1998



UNIDADE	IO
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	As79e
V.	Ex.
TOMBO BC/	35 038
PROC.	395/98
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/09/98
N.º CPD	440215464-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

As79e

Assumpção, Juliana.

Estudo de sequências do cromossomo Y em pacientes com distúrbios de diferenciação gonadal / Juliana Assumpção. -- Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Maricilda Palandi de Mello.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

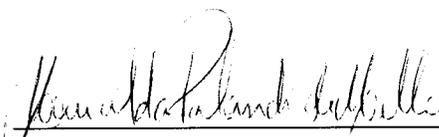
1. Cromossomo Y. 2. Síndrome de Turner. 3. Distúrbios de diferenciação sexual. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 02 de junho de 1998

BANCA EXAMINADORA:

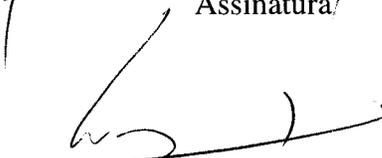
TITULARES:

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello



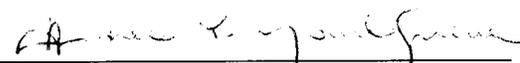
Assinatura

Profa. Dra. Christine Hackel



Assinatura

Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra



Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

APROVADA

a meus pais

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello que me orientou, depositou sua confiança em mim e esteve presente em todos os momentos da realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Cristine Hackel pela forma empolgante com a qual acompanha o trabalho dos alunos e pela minuciosa revisão dessa tese.

À Profa. Dra. Andrea Trevas Maciel Guerra que, além de participar da triagem dos pacientes, fez sugestões valiosas para o trabalho.

À Dra. Maria Janete Cerutti pela amizade, revisão criteriosa do trabalho, e comentários pertinentes.

À Profa. Dra. Antônia Paula de Faria Marques e ao Dr. Gil Guerra Júnior por colaborarem com o trabalho na triagem dos pacientes.

Aos professores e funcionários do CBMEG e, em especial, às secretárias Claudinha, Sandra, Tânia e Fabiana.

Aos amigos do laboratório de genética humana do CBMEG: Marcela, Ivy, Carlos, Daniela, Luzinha, Fernanda, Lúcio, Marcelo, Welbe, Manuela, Adelmo, Lucy, Eliana, Sílvia (adotiva) por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido, suportarem os meus ataques de estresse e pelo estímulo nas horas de desânimo.

Aos amigos do CBMEG e, em especial, à Sandrinha, à Mar e ao Ed por terem se tornado companheiros de todas as horas.

À Madá pelo inestimável auxílio nos experimentos e pela alegria e amizade com as quais irradia os nossos dias.

À Dra. Edi pelo apoio técnico e entusiasmo no trabalho.

À Isa por compartilhar comigo material, dúvidas e angústias.

À Tereza, secretária da pós-graduação da Genética, pelo sua eficiência e bom humor.

Aos amigos da república: Ed, Paulo, Carlos, Eneida, Lee, Lu e Stela, com os quais tenho aprendido muito.

Aos queridos amigos de BH: Cris, Mônica, Átila, Humberto, Evandro, Paulinha e tantos outros...

Aos amigos da Universidade Solidária que partilharam comigo de uma experiência fantástica e me ajudaram a ampliar meus horizontes.

Aos pacientes que se dispuseram a doar o material sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

À minha família que tanto amo e que sempre me apoiou em todos os meus empreendimentos profissionais e pessoais.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES e à FAEP pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	iii
Resumo.....	iv
Summary.....	v
I. Apresentação.....	1
II. Introdução.....	3
Parte I: 1. Diferenciação sexual.....	3
2. Determinação sexual.....	7
3. Disgenesia gonadal pura (mulheres 46,XY).....	14
Parte II: 1 Síndrome de Turner.....	19
2 Mosaicismo de X.....	23
III Objetivos.....	28
IV Casuística.....	29
V Metodologia.....	32
1 Coleta de amostras.....	32
2 Extração do DNA genômico a partir de sangue periférico.....	32
3 Seqüências Y-específicas utilizadas.....	33
3.1 Sondas utilizadas na método de “Southern-blotting”.....	33
3.2 Seqüências amplificadas por PCR.....	34
4 Transformação de bactérias.....	36
4.1 Transformação bacteriana.....	36
4.2 Mini-preparação de plasmídios.....	36
5 Extração de DNA de plasmídeo em larga escala.....	37
5.1 Purificação do DNA plasmidial.....	39
6 Preparo do fragmento de interesse.....	39
7 Análise do DNA genômico pelo método de “Southern-blot”.....	41
7.1 Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição.....	41
7.2 Preparo do gel de eletroforese.....	42
7.3 Transferência do DNA do gel para suporte sólido.....	43
8 Marcação de sonda.....	44
9 Hibridização.....	45
9.1 Pré-hibridização.....	45
9.2 Hibridização.....	46
10 Lavagem dos filtros.....	47
11 Autoradiografia.....	47
12 Reação de Polimerase em Cadeia.....	48
12.1 Amplificação do SRY.....	48
12.2 Amplificação de TSPY e DYZ3 por “nested-PCR”.....	49
12.3 Amplificação de STS Y-específicos.....	51
13 Seqüenciamento.....	53
14 Técnica HUMARA.....	53
VI Resultados.....	57
1 Disgenesia gonadal pura.....	57

1.1 Estudo do gene SRY.....	57
1.2 Amplificação de STS Y-específicos.....	58
1.3 Hibridização com sondas Y-específicas.....	60
2 Síndrome de Turner.....	63
2.1 Estudo do gene SRY.....	63
2.2 Amplificação de DYZ3 e TSPY.....	64
2.3 Amplificação de STS Y-específicos.....	64
2.4 Hibridização com sondas Y-específicas.....	66
2.5 Amplificação do gene do receptor de andrógenos humano (HUMARA)...	74
VII Discussão.....	77
Parte I: Disgenesia gonadal pura.....	77
Parte II: Síndrome de Turner.....	85
VIII Referências Bibliográficas.....	96

ABREVIATURAS

BSA- soro albumina bovina
°C - graus Celsius
cen - centrômero
DNA - ácido desoxirribonucleico
DMSO - dimetilsulfóxido
dNTP - desorribonucleotídeos
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
GBY - locus do gonadoblastoma no Y
HAM - hormônio anti-mülleriano
HMG - "high mobility group"
H-Y - antígeno de histocompatibilidade do Y
Kb - quilobase
L - litro
M - molar
Mb - megabase
Mc - proteína requerida para fissão em leveduras
mar - cromossomo marcador
ml - mililitro
µg - micrograma
µl - microlitro
ng - nanograma
ORF - quadro de leitura aberta
PAR - região pseudoautosômica do cromossomo Y
pb - pares de base
PCR - reação de polimerase em cadeia
q.s.p. - quantidade suficiente para
rpm - rotações por minuto
SDS - dodecil sulfato de sódio
SRY - região de determinação sexual do cromossomo Y
Sry - região de determinação sexual do cromossomo Y de camundongos
ssDNA - DNA de fita única
STS - "sequence tagged sites"
TAE - tris/acetato/EDTA
TBE - tris/ácido bórico/EDTA
TDF - fator de determinação testicular
Tdy - fator de determinação testicular em camundongos
TE - tris/EDTA
TEMED - N,N,N',N' - tetrametiletlenodiamina
Tris - tris (hidroximetil) - aminometano
UV - ultra - violeta
Xp - braço curto do cromossomo X
Xq - braço longo do cromossomo X
Yp - braço curto do cromossomo Y
Yq - braço longo do cromossomo Y
ZFY - gene do cromossomo Y que codifica uma proteína do tipo "zinc-finger"

RESUMO

A disgenesia gonadal em indivíduos com fenótipo feminino é resultado de um distúrbio da diferenciação sexual e pode ser observada tanto na disgenesia gonadal pura quanto na síndrome de Turner. Em geral, a presença de um cromossomo Y, ou parte deste, nessas pacientes aumenta a probabilidade de malignização dos resquícios gonadais. A formação do tumor pode ser evitada através de uma gonadectomia preventiva nos casos em que a presença do cromossomo Y é confirmada, o que pode ser feito usando-se vários marcadores moleculares específicos.

Entre os pacientes com disgenesia gonadal pura há aqueles que apresentam cariótipo 46,XY e, surpreendentemente, desenvolvem fenótipo feminino. Sabe-se que o cromossomo Y possui um gene responsável pela determinação testicular localizado em Yp. Desde o isolamento desse gene, chamado SRY (“sex-determining region on the Y chromosome”), em 1990, casos de mulheres XY têm sido analisados do ponto de vista molecular para buscar se entender a causa da reversão sexual. Neste trabalho, três pacientes foram avaliadas quanto à presença do gene SRY e à leitura da seqüência de sua porção conservada. Além disso, outros marcadores foram utilizados na busca de possíveis deleções no cromossomo Y dessas mulheres.

Pacientes com síndrome de Turner também podem ser portadoras de material derivado de cromossomo Y. Frequentemente exibem mosaïcismo que pode conter uma linhagem celular com Y ou fragmentos cromossômicos de origem não identificada pelo exame citogenético. Na tentativa de determinar-se a origem desses fragmentos cromossômicos não identificados e avaliar a possibilidade de ocorrência de mosaïcismo de Y em níveis baixos, foram estudadas vinte e três pacientes com síndrome de Turner através de “Southern-blotting”, PCR e “nested-PCR”.

Todas as pacientes com disgenesia gonadal pura apresentaram amplificação positiva para o gene SRY. Em uma delas foi encontrada uma mutação pontual (G→A) na posição 619 alterando um códon de triptofano e formando um códon de terminação precoce (W70X). Nas demais pacientes não foram observadas alterações; portanto, a causa da reversão sexual nesses casos deve-se, provavelmente, a modificações sofridas por outras seqüências, que não a estudada, e que tenham envolvimento com os processos de determinação e diferenciação sexuais.

O grupo de pacientes com síndrome de Turner incluiu treze mulheres com cariótipo 45,X (50 metáfases foram analisadas), uma com cariótipo 46,X,+mar e outras nove com mosaïcismo (sendo uma linhagem 45,X e a outra com constituição cromossômica heterogênea). Dentre todas as pacientes da amostra, apenas uma (4,3%), cujo mosaïcismo havia sido observado na análise citogenética, era portadora de uma linhagem com um cromossomo derivado de Y. Foi realizada amplificação do gene SRY, e o seqüenciamento deste não mostrou alteração alguma. O mapeamento do cromossomo Y dessa paciente revelou a presença de uma deleção da porção distal do braço longo (Yq).

Os resultados do presente trabalho indicam que o mosaïcismo de Y em pacientes com síndrome de Turner não é muito freqüente mas sua prevalência é maior naquelas pacientes portadoras de cromossomos marcadores. Dessa forma existe a necessidade de realizar-se a avaliação molecular para pesquisa de cromossomo Y nas pacientes com mosaïcismo detectado pela citogenética ou nos casos em que houver indícios da presença deste cromossomo, tais como situações onde ocorra virilização da genitália. Quanto aos casos de disgenesia gonadal pura, foi verificado que 1/3 das pacientes apresentou mutação no gene SRY, tal freqüência fica acima da média descrita na literatura (12%), o que se deve, provavelmente, ao pequeno número de casos estudados.

SUMMARY

Gonadal dysgenesis results from anomalies in sex differentiation, it can be observed in patients with Turner's and Swyer's syndromes (46,XY females). In these conditions patients who bear an entire Y chromosome, or a partially deleted Y, are at high risk of developing gonadoblastoma. The tumor can be avoided by a preventive gonadectomy.

The short arm of Y chromosome harbours the testis determining factor, called SRY ("sex determining region on the Y"). Although patients with pure gonadal dysgenesis carry an Y chromosome, they develop as females. Here the Y chromosome of three patients with such an anomaly were mapped to check for deletions, especial attention was given to the SRY gene. SRY gene's conserved motif was amplified and sequenced in order to look for mutations that might be the cause of sex reversal.

Turner's syndrome patients may also present Y chromosome markers. These females may carry cellular lineages with an Y chromosome or chromosomal fragments of unknown origin. To investigate the possible Y origin of chromosomal fragments and to evaluate the occurrence of low level Y mosaicism in females with Turner syndrome, 23 patients were studied through Southern-blotting, PCR and nested-PCR.

The SRY's HMGbox sequencing revealed a point mutation (G→A) at position 619 in one of the patients with pure gonadal dysgenesis, which alters a tryptophan to a stop codon (W70 X). The observed phenotype is probably due to this mutation. Two patients, however, did not present mutations in the SRY conserved domain and may have changes in other sequences of the SRY gene, in regulatory regions, or in other genes involved in the sex determination or differentiation pathways.

The group of Turner's patients included 13 patients with 45,X karyotype; 1 patient with 46,X+mar karyotype and 9 mosaics. The mosaics carried an 45,X lineage together with another lineage of variable chromosomal constitution. Only one (4,3%) Turner patient showed positive results for the presence of Y chromosome. This female was a mosaic and the presence of part of an Y chromosome had been previously detected by FISH assays. SRY sequencing showed no mutations and Y chromosome mapping revealed a deletion of long arm's distal portion.

The results presented hereby indicated that Y mosaicism is not very common among Turner's patients although it is more frequent among those who carry small chromosomes of unknown origin. It is imperative to test patients with marker chromosomes for the presence of Y material and also patients who present signs of virilization for the presence of hidden Y mosaicism. One out of three patients with pure gonadal dysgenesis showed mutations in the SRY gene. This frequency is higher than the literature's average (12%) probably because of the small number of cases studied.

APRESENTAÇÃO

Nos mamíferos o sexo do indivíduo é resultado de uma série ordenada de eventos iniciada por controle genético e propagada por mecanismos endócrinos. O evento pivô na determinação sexual é a especialização das gônadas. Uma vez formadas, as gônadas controlam todo o desenvolvimento sexual subsequente. Esse processo tem como resultado a produção de machos e fêmeas, os quais diferem em função reprodutiva, anatomia, fisiologia e comportamento.

De forma geral a designação do sexo no ser humano é realizada corretamente com base na verificação dos genitais externos. Para que tal procedimento seja correto, é necessário que a aparência dos genitais externos tenha correspondência com os genitais internos e com as gônadas. Via de regra, o cariótipo 46,XY corresponde à presença de testículos e genitais masculinos, do mesmo modo que o cariótipo 46,XX à presença de ovários e genitais femininos.

Existem casos, entretanto, em que o sexo não pode ser definido baseando-se apenas na aparência dos genitais. A maior parte dos distúrbios que afetam a determinação e a diferenciação sexuais se manifesta por ambigüidade genital e pode ser identificada no recém-nascido. Alguns desses distúrbios, contudo, são avaliados somente na puberdade por se apresentarem com atraso no aparecimento das características sexuais secundárias.

As anomalias relacionadas à diferenciação sexual podem ser classificadas em: distúrbios da diferenciação gonadal, pseudo-hermafroditismo masculino e pseudo-hermafroditismo feminino. Alguns dos distúrbios causados por diferenciação gonadal anômala são caracterizados pela presença de gônadas disgenéticas. O termo gônada disgenética é usado genericamente para descrever uma variedade de condições nas quais o desenvolvimento das gônadas fetais é anormal. Isso inclui a síndrome de Turner, disgenesia gonadal pura, disgenesia gonadal parcial e disgenesia gonadal mista.

No homem, a determinação do sexo é feita inicialmente por um gene (SRY), presente no cromossomo Y, que induz a formação testicular e, conseqüentemente, o desenvolvimento masculino. Na ausência desse gene tem-se o desenvolvimento feminino. Apesar do fator de determinação testicular ter sido finalmente isolado, após trinta anos de buscas, o processo da determinação sexual ainda não foi totalmente esclarecido. Sabe-se que o gene SRY faz parte de

uma série de genes que atuam de forma sucessiva regulando a determinação e a diferenciação sexuais.

No presente trabalho, pacientes com disgenesia gonadal pura 46,XY foram avaliados quanto às seqüências derivadas do cromossomo Y e, com especial atenção quanto à presença e integridade do gene SRY. A identificação e caracterização de mutações que levam a distúrbios da diferenciação sexual tem sido a abordagem mais utilizada para a compreensão das etapas do processo da determinação do sexo.

Além disso, foi estudada também uma amostra de pacientes com síndrome de Turner. Sabe-se que no mínimo 50% dessas mulheres possuem cariótipos que diferem de 45,X. Algumas delas apresentam 46 cromossomos, sendo um X anormal, e outras apresentam mosaïcismo. Os mosaicos são constituídos geralmente por uma linhagem 45,X e outra com 46 cromossomos com um segundo cromossomo sexual normal ou anormal. Este último, por sua vez, pode ser derivado de X ou mesmo de Y.

Nos casos em que ocorre a presença de segmentos de cromossomo Y faz-se necessária a realização de uma gonadectomia preventiva, visto que a existência do Y associada à presença das gônadas disgenéticas causa predisposição ao aparecimento de tumores. A avaliação de pacientes com síndrome de Turner e seqüências derivadas de cromossomo Y pode, ainda, fornecer novos dados a respeito do mecanismo de determinação sexual nesses casos e, talvez, ajudar no mapeamento de genes responsáveis pelo fenótipo.

O presente trabalho foi realizado em colaboração com os departamentos de Genética Médica, de Pediatria (Edocrinologia Pediátrica) e de Clínica Médica (Disciplina de Endocrinologia) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Dada a importância da análise molecular para a confirmação do diagnóstico, compreensão do distúrbio e escolha dos procedimentos a serem adotados, esta tese é resultado de um esforço conjunto de uma equipe interdisciplinar (Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo - GIEDDS), especializada no estudo de distúrbios da determinação sexual.

INTRODUÇÃO

Parte I:

1. Diferenciação sexual

O evento principal da determinação do sexo de um indivíduo é a formação das gônadas. Todas as demais diferenças entre os sexos são efeitos secundários devido a hormônios produzidos pelas gônadas (Jost *et al.*, 1973). Pode-se definir determinação sexual como sendo o processo que resulta na formação do testículo ou ovário. O processo que se segue à formação gonadal é chamado diferenciação sexual (Goodfellow & Darling, 1988).

Apesar do sexo cromossômico já estar determinado no zigoto, o dimorfismo sexual não é notado em embriões humanos com menos de sete semanas de desenvolvimento intra-uterino. Por isso, até a sétima semana de gestação o embrião é considerado sexualmente neutro. Nesta ocasião, as gônadas são apenas duas saliências (saliências gonadais) (Beiguelman, 1982).

As gônadas primitivas possuem células germinativas que migraram do alantóide para a superfície das pregas urogenitais. O epitélio germinativo prolifera produzindo cordões sexuais que penetram no mesênquima. Diferenciam-se, então, duas regiões: uma cortical e outra medular. Nesta fase não é possível distinguir embriões com predestinação masculina ou feminina. O que existe são as gônadas bissexuais, os primórdios dos condutos genitais internos masculinos e femininos (representados por dois sistemas de canais bilaterais, os dutos de Wolff e os dutos de Müller) e genitais externos rudimentares (Beiguelman, 1982; ¹Toublanc, 1988).

Na presença de um cromossomo Y, a gônada bissexual se diferencia em testículo. Um dos primeiros indícios morfológicos dessa diferenciação sexual masculina é o aparecimento das células de Sertoli em torno da sexta semana do desenvolvimento fetal. Essas células se alinham em cordões que posteriormente englobam as células sexuais primitivas (espermatogônias). Estes cordões formarão os túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testis. Em torno da oitava semana as células

¹ Toublanc, 1988 apud Guerra Jr. & Maciel-Guerra, 1997.

somáticas mesenquimais diferenciam-se em células de Leydig. (Beiguelman,1982; Moore, 1978; Voutilainem, 1992; ²Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

As células de Sertoli produzem o chamado hormônio anti-mülleriano (HAM), que induz a regressão dos dutos de Müller. As células de Leydig fetais produzem a testosterona, que estabiliza os dutos de Wolff e permite sua diferenciação em epidídimo, canal deferente, vesícula seminal e ducto ejaculatório. A testosterona é convertida em di-hidrotestosterona que viriliza os rudimentos genitais externos (Moore, 1978; ³Grumbach, 1960; Josso, 1992; Larsen, 1993).

Em embriões masculinos, para haver diferenciação sexual normal, é necessária a presença de um fator de determinação testicular (localizado no cromossomo Y), do hormônio anti-mülleriano, da testosterona e di-hidrotestosterona, e dos receptores desses hormônios. Na ausência dos hormônios testiculares desenvolve-se o fenótipo feminino. Em 1973, experimentos realizados por Jost e colaboradores demonstraram que a formação dos dutos de Müller, bem como a feminização dos rudimentos genitais externos, não são provocados pelos ovários, mas sim pela ausência de hormônios androgênicos produzidos pelos testículos. Os resultados de tais pesquisas mostraram que, independentemente da predestinação cariotípica sexual dos embriões de coelho, a destruição de suas gônadas provoca a diferenciação dos dutos de Müller e a feminização dos rudimentos genitais externos. Portanto, nem os ovários nem o cariótipo feminino normal são requeridos para a diferenciação dos condutos sexuais e dos genitais externos femininos (Beiguelman, 1982).

Uma vez que o estágio crítico da diferenciação sexual foi ultrapassado, o que ocorre em torno da nona semana de gestação, o primórdio genital fica irreversivelmente comprometido com o desenvolvimento feminino e não pode mais se diferenciar numa gônada masculina (Saenger, 1984). A transformação das gônadas indiferentes em ovários inicia-se uma semana mais tarde do que a diferenciação testicular. Há um desenvolvimento acentuado da região cortical dos cordões sexuais primitivos e degeneração da região medular. As células mesenquimatosas diferenciam-se em células

² Toublanc, 1988; Larsen, 1993 apud Guerra Jr & Maciel-Guerra, 1997

³ Grumbach, 1960; Josso, 1992; Larsen, 1993 apud Guerra Jr & Maciel-Guerra, 1997

foliculares, que envolvem as células germinativas primordiais (ovogônias) as quais, posteriormente, darão origens aos folículos primários (Moore, 1978; Beiguelman, 1982; ⁴Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

Para a manutenção ovariana é necessária a presença de dois cromossomos X íntegros, caso contrário os folículos ovarianos degeneram e a gônada torna-se disgenética, ou seja, constituída somente de tecido conjuntivo, sem elementos da linhagem germinativa ⁵(Tsafiriri *et al.*, 1976).

Na ausência do hormônio anti-mülleriano, os dutos de Müller se desenvolvem e formam o trato genital feminino (útero, trompas e porção superior da vagina). Na falta de testosterona os dutos de Wolff continuam indiferenciados e parte deles permanece como apêndices residuais. Na ausência da di-hidrotestosterona, forma-se a genitália externa feminina: clitóris, pequenos lábios, grandes lábios e porção inferior da vagina (Moore, 1978; Beiguelman, 1982; ⁶ Toublanc, 1988; Larsen, 1993).

⁴ Toublanc, 1988; Larsen, 1993 apud Guerra Jr. & Maciel-Guerra, 1997.

⁵ Tsafiriri et al., 1976 apud Beiguelman, 1982.

⁶ Toublanc, 1988; Larsen, 1993 apud Guerra Jr. & Maciel-Guerra, 1997.

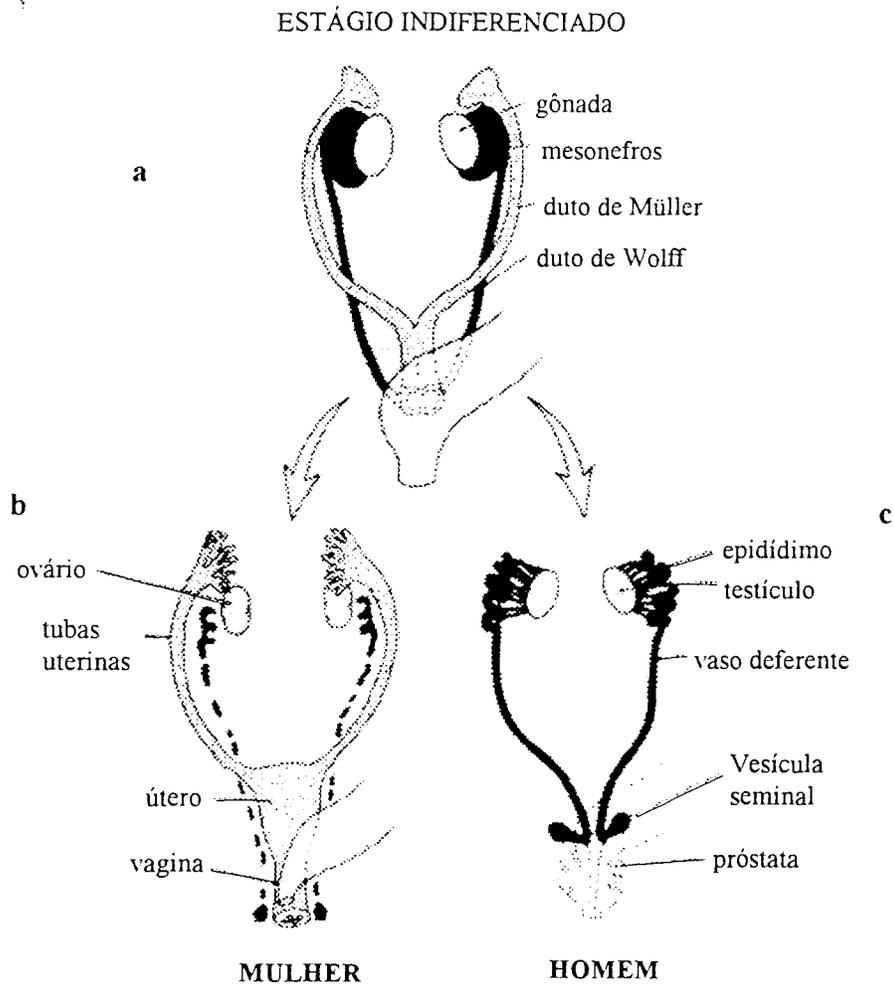


Figura 1: Representação do estágio indiferenciado dos sistemas de dutos de Wolff e de Müller quando ambos estão presentes no embrião jovem (a) e desenvolvimento de cada um dos sistemas de dutos após a determinação do sexo gonadal (b,c) (Hunter, 1995).

2. Determinação sexual

Existem na natureza diversos mecanismos capazes de determinar o sexo de um animal. O fator determinante pode ser: ambiental como, por exemplo, a temperatura no caso de alguns répteis; cromossômico como em *Drosophila* ou *Caenorhabditis elegans*, nos quais a atividade dos genes envolvidos no dimorfismo sexual depende da relação entre o número de cromossomos sexuais e autossômicos; e, alternativamente, a determinação do sexo pode ser primordialmente controlada por um fator genético, como acontece nos mamíferos, nos quais um gene localizado no cromossomo Y promove o desenvolvimento dos testículos (Gubbay *et al.*, 1990).

Com base no modelo fornecido pelas espécies de *Drosophila* pensou-se, de início, que o sexo em mamíferos dependeria da dosagem do cromossomo X. No final da década de 50, graças ao desenvolvimento das técnicas de cariotipagem e ao estudo de indivíduos com constituições anormais de cromossomos sexuais, essa hipótese foi refutada. Indivíduos com um único cromossomo X desenvolvem-se como fêmeas e indivíduos com um cromossomo Y normal desenvolvem-se como machos, independentemente da presença de cromossomos X supranumerários. Assim, concluiu-se que nos mamíferos o sexo é determinado pela presença do cromossomo Y (Jacobs, 1959; Ford, 1959).

O cromossomo Y é um dos menores cromossomos humanos; possui um tamanho estimado de 60Mb, compondo aproximadamente 1% do genoma de uma célula diplóide. Apresenta uma região heterocromática de tamanho variável, aparentemente sem atividade genética, que representa 50 a 70% do seu total de DNA. Esta região se localiza na parte distal do braço longo (Yq) do cromossomo (Caspersson *et al.*, 1970; Cooke *et al.* 1979; Schempp & Müller, 1982) (figura 2).

A parte remanescente do cromossomo Y, ou seja, o braço curto (Yp), centrômero e eucromatina proximal do braço longo, possui um tamanho mais constante nos indivíduos. Apresenta, também, uma região homóloga ao cromossomo X, famílias de seqüências Y-específicas repetidas, e todos os demais genes identificados nesse cromossomo.

Na parte distal do braço curto do cromossomo Y existe uma região que se emparelha com o cromossomo X e sofre recombinação na meiose. Os genes situados nessa região não são estritamente ligados ao sexo e determinam uma herança autossômica. Desta forma, essa região foi chamada de pseudoautossômica (PAR) (Koller & Darlington, 1934).

O cromossomo Y tem sido extensivamente estudado pela sua importância, tanto do ponto de vista evolutivo quanto em relação ao seu papel na diferenciação sexual. Atualmente ele é dividido em 7 intervalos. Estes intervalos foram definidos com base no mapeamento de seqüências Y-específicas em indivíduos portadores de alterações estruturais nesse cromossomo (Vergnaud *et al.*, 1986) (figura 2).

Desse modo, o braço curto (Yp) foi dividido em quatro intervalos, excluindo a região pseudoautossômica. A parte eucromática do braço longo (Yq) é representada pelos intervalos 5 e 6 e a parte heterocromática, pelo intervalo 7. Esta nomenclatura tem sido sistematicamente utilizada pela maioria dos autores no estudo desse cromossomo.

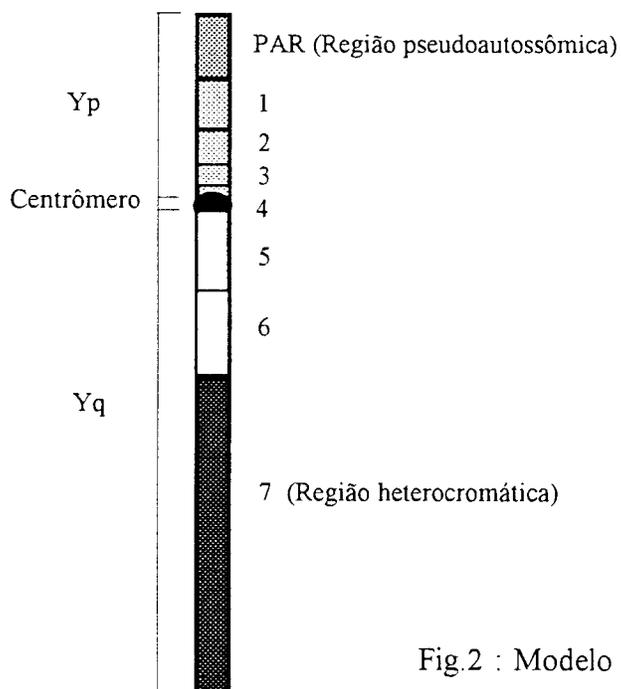


Fig.2 : Modelo do cromossomo Y humano indicando o braço curto (Yp), centrômero, braço longo (Yq) e os intervalos nos quais foi dividido.

As análises de anomalias estruturais do cromossomo Y em humanos sugeriram que o braço curto desse cromossomo (Yp) deveria conter um ou mais genes que direcionam a formação dos testículos. Na ausência do braço curto o fenótipo resultante é feminino, enquanto na ausência do braço longo (Yq) ou de parte deste há presença de tecido testicular (Gordon & Ruddle, 1981). Como o fenótipo masculino depende da presença de testículos, o suposto gene presente no cromossomo Y que determina o sexo em humanos foi denominado fator de determinação testicular (TDF).

Na busca de identificação e isolamento desse gene, Watchtel *et al.* (1975) propuseram a hipótese de que o antígeno de histocompatibilidade macho-específico (H-Y) seria o responsável pela indução primária da formação dos testículos. Esse antígeno foi descoberto em experimentos de enxertos de pele entre camundongos altamente endocruzados quando se notou que os transplantes de machos para fêmeas eram rejeitados mais rapidamente do que aqueles realizados entre fêmeas. A rejeição foi atribuída à presença do antígeno H-Y nos machos e à ausência do mesmo nas fêmeas. Ensaio sorológicos para detecção do antígeno foram desenvolvidos, o que levou à descoberta de que esse componente da superfície celular fora extremamente conservado durante a evolução.

As primeiras evidências contra a hipótese de que o antígeno H-Y seria o fator de determinação testicular (TDF) surgiram em 1981, quando Haseltine *et al.* encontraram dois indivíduos pseudohermafroditas, com cariótipo 46,XY e tecido testicular, sem evidência sorológica do antígeno H-Y.

No período de 1980 a 1985 foi lançado o programa de mapeamento do genoma humano. Vários grupos se dedicaram ao mapeamento do cromossomo Y com o intuito, dentre outros, de identificar o tão procurado fator de determinação testicular. Nessa época várias seqüências Y-específicas vieram a ser conhecidas. Isto possibilitou a definição da localização do TDF através da construção de mapas físicos detalhados do cromossomo Y humano. Um desses mapas foi construído com base em indivíduos do sexo masculino que apresentavam cariótipo 46,XX. O cariótipo da maior parte desses homens é normal no que diz respeito ao número e estrutura dos cromossomos; entretanto, foi demonstrado que cerca de 80% dos homens XX haviam herdado

seqüências derivadas de Y, provavelmente por eventos de translocação ocorridos durante o emparelhamento dos cromossomos X e Y na meiose (Guellaen *et al.*, 1984; Page, 1986; Pritchard, 1987; Goodfellow, 1987).

A construção de mapas de deleções a partir desses pacientes mostrou que o fator de determinação testicular (TDF) deveria estar localizado na porção distal do braço curto do cromossomo Y. A análise das deleções indicava que o TDF pertencia ao intervalo 1 desse cromossomo, adjacente à região pseudoautossômica.

Page *et al.* (1987a) estudaram um homem XX cuja única seqüência de Y não pseudoautossômica presente no genótipo compreendia os intervalos 1A1 e 1A2 e, também, uma paciente do sexo feminino com translocação entre o Y e um autossomo, que aparentemente não possuía os intervalos 1A1 e 1B. Assim, foi sugerido que o TDF deveria se localizar no intervalo 1A2, numa região de 140 Kb. Seqüências correspondentes a este intervalo foram isoladas, clonadas e sequenciadas. Foi encontrado um gene altamente conservado que codifica para uma proteína do tipo “Zinc-finger”. Esse gene foi chamado ZFY (“Zinc-Finger Y-encoded”) e parecia ser um excelente candidato a TDF, já que codificava uma proteína que pode funcionar como fator de transcrição, função esta esperada para o TDF (figura 3).

Alguns fatos, entretanto, levaram à exclusão do ZFY como fator de determinação testicular. O primeiro foi o encontro de uma seqüência homóloga ao ZFY no cromossomo X (ZFX) (Schneider-Gädecke *et al.*, 1989). O segundo foi a descrição de seqüências homólogas em autossomos de marsupiais (Sinclair *et al.*, 1988). Porém, o descarte definitivo da hipótese de que o ZFY seria o TDF aconteceu com a descoberta de três homens XX e um indivíduo intersexo XX que não apresentavam ZFY, mas eram positivos para marcadores do intervalo 1A1. Apesar destes homens mostrarem anormalidades no sistema reprodutivo, o que sugere a ausência de genes necessários para o desenvolvimento sexual normal completo, todos eram indubitavelmente do sexo masculino (Palmer *et al.*, 1989).

Com base nas informações fornecidas por Palmer *et al.* (1989), concluiu-se que o TDF deveria encontrar-se dentre 60 Kilobases no intervalo 1A1. Conforme novos marcadores do cromossomo Y tornaram-se disponíveis, essa região foi reduzida para 35 Kilobases. Com este indício os grupos empenhados na caracterização do TDF intensificaram o mapeamento dessa porção de DNA, a qual foi digerida com enzimas de restrição e os fragmentos resultantes foram subclonados e utilizados como sonda para hibridização com DNA de machos e fêmeas de diferentes espécies de mamíferos. Como resultado dessa busca minuciosa, foi identificado um fragmento de 2,1Kb, denominado pY53.3, que detectava seqüência de cópia única, Y-específica, não só em humanos mas também em outras espécies de mamíferos. Analisando-se esse segmento, encontrou-se um gene que foi denominado SRY (“Sex-determining region of Y”). Esse gene é Y-específico, conservado entre uma grande variedade de mamíferos, e codifica um transcrito testículo-específico (Sinclair *et al.*, 1990).

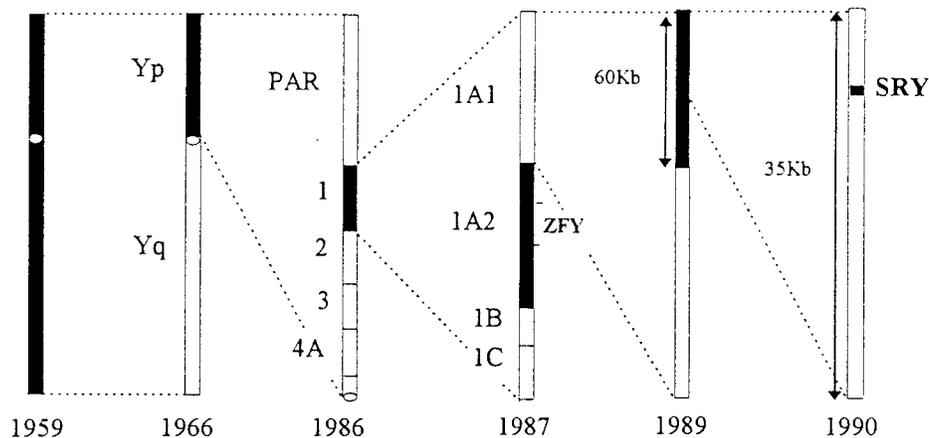


Fig.3 : Representação cronológica da busca pelo fator de determinação testicular entre 1959 e 1990 (McLaren, 1990).

A análise da seqüência de nucleotídeos do gene SRY revelou duas fases de leitura aberta (ORF - “Open Reading Frame”) correspondentes a 99 e 223 aminoácidos. No entanto, a proteína codificada pela menor fase de leitura não foi, até o momento, relacionada com nenhuma outra proteína conhecida, ao passo que a fase de leitura maior codifica uma proteína que exhibe alta homologia com a proteína Mc, necessária para a fissão de leveduras, e com proteínas nucleares não

histônicas HMG1 e HMG2 que, ligando-se ao DNA, atuam como fatores de regulação da transcrição (Sinclair *et al.*, 1990).

Ao contrário da maioria dos genes humanos até agora caracterizados o gene SRY humano consiste de um único exon, possuindo 850pb (Behlke *et al.*, 1993; Su & Lau, 1993). O estudo de suas seqüências flanqueadoras mostrou a presença de dois pequenos segmentos ricos em GC localizados na região 5' não transcrita do gene SRY. Porém, a busca de um elemento promotor não revelou nenhuma seqüência do tipo "TATA" ou "CCAAT box" na região rica em GC, próxima ao sítio de início da transcrição (Su & Lau, 1993)

Paralelamente, Gubbay *et al.* (1990) descreveram em camundongos o gene Sry, homólogo ao SRY humano, e demonstraram que o padrão de expressão do Sry é consistente com o esperado para um gene responsável pela determinação testicular, ou seja, sua expressão ocorre especificamente nas células somáticas da prega urogenital, por volta de 11,5 dias *post coitum*, justamente antes da formação do cordão testicular.

Embora todos os resultados indicassem que o SRY realmente equivalia ao TDF, a evidência direta de que o SRY exerce função importante na formação dos testículos foi obtida pela análise de mulheres que apresentavam cariótipo 46,XY e disgenesia gonadal. O estudo de mulheres XY que apresentavam mutações "de novo" no SRY indicou que este gene é realmente requerido para a formação testicular. Esses experimentos, porém, não demonstraram se apenas o SRY era necessário para a formação dos testículos. Essa dúvida foi esclarecida mais tarde por meio da obtenção de animais transgênicos: o gene Sry e o gene SRY foram inseridos, separadamente, em embriões de camundongo XX. Apesar do gene humano não ter se expressado nos camundongos transgênicos, observou-se que a introdução do Sry levou ao desenvolvimento de testículos normais nos camundongos. O exame interno da genitália revelou que o trato reprodutivo era normal, sem sinais de hermafroditismo nos camundongos XX (Koopman *et al.*, 1991).

A seqüência de nucleotídeos do SRY sugere que ele deva codificar uma proteína de ligação ao DNA, o que seria consistente com o papel de fator de transcrição. A proteína codificada pelo

SRY contém um segmento de 80 aminoácidos que tem grande homologia com seqüências encontradas em várias outras proteínas que se ligam ao DNA (Sinclair *et al.*, 1990). Esta seqüência de aminoácidos foi primeiramente reconhecida nas proteínas nucleares do grupo de alta mobilidade (HMG) e é chamada “HMGbox” (Harley *et al.*, 1992).

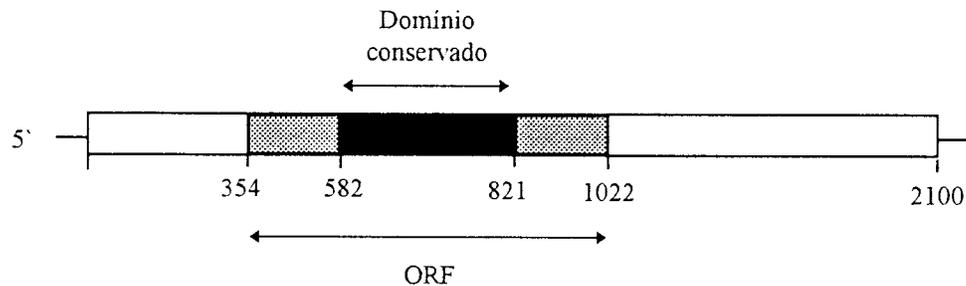


Figura 4: Esquema do subclone pY53.3 (2,1Kb): o quadrado negro representa o domínio conservado (“HMGbox”) e toda a região escura representa o quadro de leitura aberta (ORF) do gene SRY (Sinclair *et al.*, 1990).

Dentre as seqüências do tipo “HMGbox” conhecidas, o SRY está mais relacionado com duas proteínas de linfócito T, TCF-1 e TCF-1 α . Sabe-se que TCF-1liga-se especificamente à seqüência AACAAAG. Para testar essa característica Harley *et al.* (1992) demonstraram que a proteína SRY reconhece fragmentos sintéticos de seqüência AACAAAG. Além disso alguns alelos de SRY mutados, encontrados em mulheres XY, produzem proteínas que perdem a capacidade de se ligar ao DNA, ou se ligam em níveis baixos. Assim, concluiu-se que a atividade de ligação ao DNA da proteína SRY é essencial para sua função na determinação sexual.

Apesar do SRY se ligar ao DNA linear, essa proteína pode, também, ligar-se a estruturas cruciformes geradas por eventos de recombinação e pelo emparelhamento de seqüências repetidas e invertidas. Esse fato levou à conclusão de que a proteína SRY pode reconhecer estruturas secundárias no DNA e ligar-se a elas independentemente de sua seqüência (Ferrari et al, 1992).

Com a intensificação dos estudos da função do SRY, descobriu-se que o domínio HMG da proteína SRY não somente permite sua ligação ao DNA mas também induz nesse um dobramento

(Ferrari *et al.*, 1992; Giese *et al.*, 1992). Esse dobramento poderia permitir a regulação da expressão gênica através da justaposição de sítios distantes da hélice de DNA. Essa interação deve ser responsável pela ativação ou repressão da transcrição de outros genes envolvidos no processo da determinação sexual (McElreavey *et al.*, 1995).

3. Disgenesia Gonadal Pura

O termo disgenesia gonadal inclui as formas pura (completa) e parcial (incompleta). A disgenesia gonadal pura pode, ainda, ser dividida nas formas 46,XX e 46,XY. A disgenesia gonadal pura 46,XX apresenta herança autossômica recessiva. A disgenesia gonadal pura 46,XY caracteriza-se por um fenótipo feminino e ausência de tecido testicular. Os pacientes apresentam gônadas em forma de fita, constituídas de tecido fibroso, e quantidades variadas de estroma semelhante ao ovariano. Estão presentes o útero, as tubas uterinas e a vagina. A genitália externa é feminina. Em geral o diagnóstico é feito na época da puberdade devido à amenorréia primária e à falta de aparecimento dos caracteres sexuais secundários. Já a disgenesia gonadal incompleta é caracterizada por diferenciação gonadal parcial, gerando graus variados de ambiguidade genital e está normalmente associada ao cariótipo 45,X/46,XY (Damiani, 1989; Berkovitz *et al.*, 1991).

A incidência de tumores do tipo gonadoblastoma nas gônadas de mulheres 46,XY é bastante alta; a esses tumores podem se associar disgerminomas ou outros tumores malignos. Os gonadoblastomas são neoplasmas definidos histologicamente pela ocorrência tanto de células germinativas quanto de células semelhantes às células de Sertoli e células da granulosa (Scully, 1970). Ocorrem numa população restrita de indivíduos portadores de gônadas disgenéticas e porções do cromossomo Y. Tal população inclui mulheres com disgenesia gonadal pura (46,XY), pacientes com disgenesia gonadal parcial (45,X/46,XY), e mulheres com síndrome de Turner cujo cariótipo inclui seqüências de Y (Page, 1987b).

Nas mulheres com sexo reverso (46,XY) a frequência de aparecimento de gonadoblastoma foi estimada em 30% (Schellas *et al.*, 1974; Simpson & Photopoulos, 1976; Page 1987; Verp &

Simpson, 1987). Nesses casos, há indicação de gonadectomia bilateral uma vez confirmado o diagnóstico.

A maior parte das mulheres 46,XY não apresentam anomalias cromossômicas. Isto quer dizer que as deleções de partes do cromossomo Y são raras nestas pacientes e, quando ocorrem, estão associadas a características clínicas da síndrome de Turner. A frequência relativamente baixa de mulheres 46,XY com deleções em Yp quando comparada àquela de homens 46,XX Y+ é intrigante, visto que o mecanismo que gera as duas condições é o mesmo: troca acidental de seqüências durante o emparelhamento dos cromossomos X e Y na meiose. É possível que a alta mortalidade intra-uterina de fetos com estigmas turnerianos seja responsável por essa distorção (Levilliers *et al.*, 1989).

Alguns trabalhos descreveram a presença de elementos típicos de tecido ovariano nas gônadas disgenéticas de mulheres 46,XY (Cussen *et al.*, 1979; Bernstein *et al.*, 1980; Berkovitz *et al.*, 1991). De acordo com Berkovitz *et al.* (1991), na ausência de determinação testicular as gônadas de mulheres 46,XY se desenvolvem em ovários, mas sofrem degeneração devido à falta de um segundo cromossomo X, processo semelhante ao que ocorre nas pacientes com síndrome de Turner. De fato, as gônadas de pacientes com disgenesia gonadal pura são histologicamente indistinguíveis das pacientes com disgenesia gonadal 45,X (síndrome de Turner).

Do ponto de vista molecular, sabe-se que em alguns casos as mulheres com cariótipo 46,XY não desenvolvem testículos devido à ausência ou perda de função do gene SRY. Mutações no gene SRY podem causar falha no desenvolvimento testicular levando à reversão sexual completa ou parcial. Até o momento, foram descritas cerca de 28 mutações no gene SRY de pacientes com disgenesia gonadal, incluindo as formas pura e parcial (Berta *et al.*, 1990; Jagger *et al.*, 1990; Jagger *et al.*, 1991; McElreavey *et al.*, 1991; Pivnick *et al.*, 1991; Jagger *et al.*, 1992; McElreavey *et al.*, 1992; Hawkins *et al.*, 1992a; Hawkins *et al.*, 1992b; Müller *et al.*, 1992; Affara *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1993; Iida *et al.*, 1994; Poulat *et al.*, 1994; Schimitt-Ney *et al.*, 1995; Bilbao *et al.*, 1996; Cameron *et al.*, 1997).

A suposição de que mutações na região conservada “HMGbox” do gene SRY causariam um dano maior à função da proteína produzida, gerando o fenótipo feminino na disgenesia gonadal pura, fez com que as investigações se dirigissem para esse domínio do gene. De fato, a grande maioria das mutações descritas dentro do gene SRY está presente no seu domínio conservado. Há apenas dois relatos de mutações localizadas fora dessa região, sendo que ambas levam à formação de um códon de terminação (Tajima *et al.*, 1994; Veitia *et al.*, 1997).

Além das mutações descritas dentro do gene, foram publicados dois casos de alterações na região flanqueadora 5' do SRY. O primeiro caso de sexo reverso associado a uma alteração fora do domínio conservado, e mesmo fora da fase de leitura aberta do SRY, foi relatado por McElreavey *et al.* (1992b). Esses autores estudaram uma paciente com uma deleção de aproximadamente 8Kb na direção 5' do gene SRY. O segundo caso foi descrito por Poulat *et al.* (1997), que identificaram uma mutação num segmento de 360pb da região promotora de gene SRY em uma dentre vinte e duas mulheres XY estudadas.

Schmitt-Ney *et al.* (1995) investigaram um segmento de 360pb na região promotora do SRY em um grupo de 45 pacientes nas quais não haviam sido detectadas mutações dentro do gene. Foi observado que nenhuma dessas pacientes apresentava alterações. Kwok *et al.* (1996) analisaram uma seqüência de 2Kb na direção 5' adjacente ao início do SRY de um grupo de 49 indivíduos constituído de mulheres XY e hermafroditas XY. Foram detectadas duas alterações: um polimorfismo comum e uma variação familiar. Esses estudos sugerem que, apesar de haver dois casos descritos de mutações na região promotora do SRY, esses eventos são raros quando comparados com a frequência de mutação na região codificadora, particularmente no domínio conservado.

Em alguns casos de pacientes com sexo reverso foram detectadas mutações herdadas no gene SRY (Berta *et al.*, 1990; Jagger *et al.*, 1992; McElreavey *et al.*, 1991; Hawkins *et al.*, 1992a; Schmitt-Ney *et al.*, 1995; Bilbao *et al.*, 1996). Berta *et al.* (1990) propuseram três hipóteses para explicar esse fenômeno. Em primeiro lugar, a mutação poderia causar predisposição à falha no desenvolvimento testicular, sendo que a reversão sexual dependeria da presença de outros fatores

genéticos e ambientais. É possível, também, que a mutação não tivesse relação direta com o fenótipo e este poderia estar se manifestando devido à uma alteração de outro gene autossômico ou ligado ao X. Uma terceira alternativa seria a presença de mosaïcismo (gene selvagem e gene mutante) nos pais das pacientes. Essa última encontra respaldo nos achados de Schimitt-Ney *et al.* (1995) e Bilbao *et al.* (1996), que descreveram casos de mulheres XY que herdaram alelos mutados de pais mosaicos, aparentemente normais.

A frequência de mutações no SRY de mulheres com disgenesia gonadal é relativamente baixa, ficando em torno de 10 a 15% (Berta *et al.*, 1990; Pivnick *et al.*, 1992; Hawkins *et al.*, 1993). O fato de que a maioria das pacientes não apresenta mutações no domínio conservado do SRY pode ser devido a vários fatores:

- (1) diagnóstico incorreto de disgenesia gonadal pura;
- (2) ocorrência de mosaïcismo;
- (3) mutações não detectadas na porção não conservada do gene;
- (4) mutações não investigadas nas seqüências que regulam a expressão do SRY;
- (5) mutações nas seqüências ainda não conhecidas às quais a proteína SRY se liga;
- (6) mutações em outros genes envolvidos nos processos de determinação e diferenciação sexuais.

De acordo com Hawkins *et al.* (1992a), a restrição dos casos a mulheres 46,XY cujo diagnóstico de disgenesia gonadal pura foi confirmado histologicamente gera um aumento na frequência de mutações encontradas no gene SRY. A baixa porcentagem de mutações citada em alguns trabalhos pode dever-se ao fato de terem sido incluídas pacientes com disgenesia gonadal parcial e com outros distúrbios de diferenciação sexual, nos quais mutações no SRY são mais raras.

Algumas vezes o fenômeno de reversão sexual pode ocorrer em pacientes com mosaïcismo, de forma que o cariótipo obtido no tecido estudado (normalmente sangue periférico) pode não refletir o cariótipo gonadal (Müller, 1987; Hadjithanasiou *et al.*, 1994).

Apesar do TDF ter sido isolado, o processo da determinação do sexo ainda não foi totalmente esclarecido. O gene SRY faz parte de um grupo de genes que agem de forma sucessiva, regulando a determinação sexual. Há evidências de que alguns dos genes envolvidos nessa cascata regulatória se localizam em cromossomos autossômicos e também no cromossomo X. O SRY, portanto, não é o único fator responsável pela formação testicular normal. Assim, pode-se inferir que mutações em outros genes dessa via também levariam à reversão sexual. O estudo desses outros genes pode vir a resolver importantes questões sobre o fenômeno da determinação sexual, além de fornecer um modelo para o controle do desenvolvimento embrionário nos mamíferos.

Parte II

1. Síndrome de Turner

Henry Turner relatou, em 1938, o caso de 7 mulheres que não haviam desenvolvido características sexuais secundárias. Além disso, essas mulheres apresentavam baixa estatura, pescoço alado e cubitus valgus. Apesar de não ter sido reconhecido na sua época, Otto Ullrich havia publicado anteriormente a descrição de uma menina com as mesmas características físicas. Assim, na literatura, casos de síndrome de Turner são freqüentemente referidos como síndrome de Ullrich-Turner ⁷(Turner, 1938; Ullrich, 1930).

Embora os sinais clínicos da síndrome de Turner tenham sido descritos na década de 30, esta síndrome só foi reconhecida como uma patologia genética em 1959, quando Charles Ford e colaboradores descreveram uma paciente com o cariótipo 45,X (Rosenfeld, 1992).

Com uma incidência estimada em uma a cada 2.000 mulheres nascidas vivas, a síndrome de Turner é um distúrbio surpreendentemente comum que, freqüentemente, não é diagnosticado até a adolescência. O reconhecimento precoce das principais características clínicas e o diagnóstico permitem o início da terapia para promover o crescimento e normalizar o desenvolvimento sexual secundário e, ainda, a orientação da criança e da família.

A ausência de características sexuais secundárias deve-se à falta da produção de hormônios esteróides sexuais. Embora os ovários de fetos 45,X abortados no primeiro trimestre de gravidez pareçam normais morfológicamente, daí por diante seu desenvolvimento é anômalo e as células germinativas (ovogônias) sofrem uma degeneração acelerada durante a meiose I da ovogênese. A formação de folículos e o desenvolvimento de células produtoras de esteróides não ocorrem na ausência de ovócitos, e por isso as gônadas dos indivíduos com síndrome de Turner atrofiam e tornam-se disgenéticas. Na infância restam, geralmente, apenas pequenas fitas de tecido fibroso.

⁷ Turner, 1938; Ullrich, 1930 apud Zinn *et al.*, 1993.

Isso determina amenorréia e infertilidade, com raras exceções (Zinn *et al.*, 1993; Ogata *et al.*, 1995; Barbaux *et al.*, 1995).

Muitas anormalidades somáticas, além daquelas descritas por Turner, são agora reconhecidamente associadas à monossomia do X. Deve-se enfatizar, no entanto, que o fenótipo é extremamente variável e que, freqüentemente, alguns dos sinais clássicos podem estar ausentes. A característica mais freqüente é a baixa estatura, que é encontrada em 100% dos casos de mulheres 45,X (Ogata *et al.*, 1995).

Segundo Ogata *et al.* (1995), pode-se dividir as características associadas a essa síndrome nos seguintes grupos:

(1) anomalias atribuídas à obstrução linfática, tais como pescoço alado, baixa implantação de cabelos na nuca, alteração da implantação auricular, edema de mãos e pés, excesso de pele no pescoço;

(2) anomalias esqueléticas, sendo as mais comuns o pescoço curto, micrognatia, palato alto, cubito valgo, metacarpos e metatarsos curtos e escoliose;

(3) anomalias cardiovasculares, tais como válvulas aórticas bicúspides e coartação da aorta e anomalias na anatomia dos rins e das vias urinárias;

(4) anomalias diversas, tais como múltiplos nevos pigmentados.

Ao contrário de outras aberrações cromossômicas humanas, o retardo mental não é comum nas pacientes com síndrome de Turner, mas ocorre com freqüência inabilidade para analisar relações espaciais e solucionar testes matemáticos (Rosenfeld, 1992; Zinn *et al.*, 1993).

Com o desenvolvimento de técnicas citogenéticas, tornou-se claro que muitas mulheres com síndrome de Turner não possuem cariótipo com uma única linhagem 45,X. Na realidade, menos de 50% das portadoras dessa síndrome nascidas vivas têm monossomia completa do X. As demais podem apresentar número normal de cromossomos, tendo um dos cromossomos X uma aberração estrutural, ou, ainda, mosaicismos.

Dentre aqueles que possuem 46 cromossomos sendo um X anormal, pode-se encontrar as seguintes aberrações: deleções de partes do braço curto ou do braço longo do X, cromossomo X em anel ou isocromossomos. Como resultado dessas anomalias, ocorre uma monossomia parcial do cromossomo X.

Apesar do cariótipo característico da síndrome de Turner ser reconhecido como 45,X, freqüentemente as pacientes apresentam mosaicismo com duas ou mais linhagens celulares. Em geral, pelo menos uma dessas linhagens é 45,X. É comum encontrar-se, além da linhagem 45,X, outra linhagem com número normal de cromossomos podendo ou não apresentar aberrações estruturais em um cromossomo X ou, até mesmo, em um cromossomo Y. O mosaicismo pode ser generalizado ou limitado a determinados órgãos.

A monossomia total do X é bem mais freqüente em abortos espontâneos que em nascidas vivas com síndrome de Turner, sendo responsável por cerca de 10% de todos os abortos (Hassold *et al.*, 1986). Estima-se que 99% dos fetos 45,X não sobrevivam a termo. Tal observação levou à hipótese de que a maior parte dos indivíduos 45,X nativos seriam provenientes de um erro mitótico no início da embriogênese e seriam, portanto, mosaicos (Held *et al.*, 1992). Possivelmente, a existência de uma linhagem com número normal de cromossomos está associada ao aumento da viabilidade do feto e a um fenótipo menos severo.

Kelly *et al.* (1992) relataram um caso de um embrião que mostrava 65% de células 45,X e 35% de células 46,X,r(X) com nove semanas de gestação. Ao término da gravidez, na décima quarta semana, dois tecidos fetais foram estudados e encontrou-se 95% de células 45,X. Assim, é possível que crianças com cariótipo 45,X possuam mosaicismo com um X ou um Y anormal durante a embriogênese mas essa linhagem celular desapareça até o nascimento.

Dentre os casos de indivíduos nativos e abortos espontâneos com monossomia do X, o cromossomo X presente é de origem materna em aproximadamente 75% dos casos (Cockwell *et al.*, 1991; Zinn *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1995; Ogata *et al.*, 1995). Como não existem diferenças

fenotípicas associadas com a origem do cromossomo X presente nas pacientes, o “imprinting” genético aparentemente não é responsável por esse desvio (Mathur *et al.*, 1991).

Em contraposição à alta mortalidade intra-uterina de fetos 45,X, a expectativa de vida de crianças 45,X não é muito reduzida. Na espécie humana a síndrome de Turner é a única monossomia compatível com a vida. A sobrevivência das pacientes deve-se, provavelmente, à expressão peculiar dos genes ligados ao X nos mamíferos. Nas fêmeas XX um cromossomo X sofre condensação e inativação transcricional no início da embriogênese, e esse processo compensa a diferença de dosagem de genes do cromossomo X em indivíduos XX e XY.

Nos casos de pacientes com síndrome de Turner que possuem um X com anormalidades estruturais, foi demonstrado que este é preferencialmente inativado (Muldal *et al.*, 1963). De acordo com Gartler e Sparkes (1963), o X normal e o anormal seriam originalmente inativados ao acaso e, então, as células menos viáveis seriam gradualmente perdidas, resultando em um padrão de inativação não casual.

A princípio, a síndrome de Turner representa um paradoxo. Se apenas um X é ativo nas fêmeas normais, a que se deve o fenótipo observado nas mulheres Turner? No caso do desenvolvimento ovariano, sabe-se que o cromossomo X inativo é reativado durante a ovôgenese; dessa forma, é possível que a formação dos ovócitos requiera dosagem diplóide de um ou mais genes ligados ao X (Zinn *et al.*, 1993). Além disso, se as aberrações cromossômicas nos ovócitos resultam em um desbalanço cromossômico grave, isto pode afetar a viabilidade do ovócito. Estudos de emparelhamento cromossômico em humanos e camundongos indicam uma estreita relação entre falha no emparelhamento e perda de ovócitos (Ogata *et al.*, 1995). Essas explicações, entretanto não se estendem às características somáticas da síndrome.

A descoberta de que a inativação do X é incompleta leva a crer que a haploinsuficiência dos genes que escapam à inativação pode ser responsável pelo fenótipo de indivíduos com síndrome de Turner. Portanto mulheres normais possuem duas cópias ativas desses genes e, como duas cópias são necessárias para o desenvolvimento normal, tais genes devem ter equivalentes funcionais no

cromossomo Y. Genes com estas características já foram descritos, como por exemplo os genes STS (esteróide- sulfatase humana), KAL1 (gene da síndrome de Kalman), ZFX e RPS4X (Disteche, 1995). Uma abordagem interessante para a compreensão da base genética da síndrome de Turner é o estudo de mulheres XY com deleções parciais do braço curto do cromossomo Y (Yp) que apresentam uma ou mais características da síndrome (Barboux *et al.*, 1995).

A caracterização molecular dessas deleções indicou que uma região de 90Kb em Yp (intervalo 1A1B) conteria um *locus* relacionado com a síndrome. Fisher *et al.* (1990) identificaram um gene nessa região, denominado RPS4Y, cujo homólogo (RPS4X) é ligado ao X e escapa à inativação. Ambos os genes são amplamente transcritos em tecidos humanos e codificam isoformas da proteína ribossomal S4. Foi sugerido que a deficiência de uma das cópias de RPS4 estaria diretamente relacionada com o fenótipo da síndrome de Turner (Fisher *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1993; Zinn *et al.*, 1993).

Alguns autores, porém, encontraram evidências que não corroboram essa hipótese. Müller *et al.* (1992) descreveram o caso de uma mulher 46,XY com deleção de Yp. Apesar da deleção incluir o gene RPS4Y, a paciente não apresentava sinais de Turner. Geerkens *et al.* (1996), por sua vez, estudaram uma paciente cujo cariótipo é 46,X,i(Xq), contendo três cópias ativas de RPS4X; observaram que, apesar da expressão aumentada desse gene, ela apresenta fenótipo semelhante ao de mulheres 45,X.

2. Mosaicismo de Y

Estudos citogenéticos demonstraram que 5 a 6% das pacientes com síndrome de Turner possuem, além da linhagem 45,X, outra linhagem celular com número normal de cromossomos contendo um cromossomo Y ou parte deste. Além disso, 3% das pacientes são portadoras de uma linhagem contendo marcadores não identificados que podem ser derivados de um cromossomo Y (Medlej *et al.*, 1992; Binder *et al.*, 1995)

A literatura indica que indivíduos com cariótipo 45,X/46,XY têm um amplo espectro de características fenotípicas. Este cariótipo pode ser encontrado em mulheres com ou sem sinais de virilização ou características de Turner em pacientes com genitália ambígua e em homens com ou sem anormalidades na genitália externa (Knudtzon & Aarskog, 1987; Chang *et al.*, 1990).

A análise citogenética convencional pode não identificar mosaicismos em baixo grau bem como marcadores raros ou pequenos podem permanecer não detectados. Estima-se que seria necessária a análise de mais de 100 células para se excluir 5% de mosaicismos com 99% de segurança (Chu *et al.*, 1995). O uso de técnicas moleculares proporciona maior sensibilidade na detecção dos mosaicismos e na identificação da origem dos cromossomos marcadores.

As principais técnicas moleculares utilizadas na detecção de mosaicismos de Y são: hibridização *in situ* fluorescente (FISH), hibridização com sondas Y-específicas, reação de polimerase em cadeia (PCR) e hibridização com DNA amplificado por PCR. Existe uma grande variação na porcentagem de pacientes com mosaicismos de Y relatada em diversos trabalhos, podendo esta ir de 0 a 33% (Held *et al.*, 1992; Medlej *et al.*, 1992; Nagafuchi *et al.*, 1992; Kokova *et al.*, 1993; Binder *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1996; Yorifugi *et al.*, 1997).

A detecção do mosaicismos depende de vários fatores, sendo os principais: sensibilidade e precisão da técnica empregada, o tipo e o número de tecidos analisados, o número de células estudadas e uma possível seleção *in vivo* ou *in vitro* que pode resultar no desaparecimento de linhagens celulares portadoras de aberrações cromossômicas (Held *et al.*, 1992).

A proporção de mosaicismos de Y é maior quando são estudados apenas os pacientes cujo exame citogenético indicou serem portadores de cromossomos marcadores. Em alguns trabalhos mostrou-se que a maior parte desses marcadores são derivados de Y (Held *et al.*, 1992; Nagafuchi *et al.*, 1992; Kuznetzova *et al.*, 1995; Patsalis *et al.*, 1997). Entretanto, Schwartz *et al.* (1997) fizeram uma revisão de todas as publicações sobre marcadores derivados de cromossomos sexuais

identificados por FISH e constataram que dos 50 marcadores encontrados em pacientes com síndrome de Turner, 43 (83%) eram derivados de X e 7 (14%) derivavam de Y.

Nos estudos em que somente a técnica de PCR foi utilizada, a porcentagem de mosaicismo encontrada variou de 0 a 4%, sendo que a maior parte das pacientes tinha cariótipo 45,X (Medlej *et al.*, 1992; Binder *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 1995; Yorifugi *et al.*, 1997).

Kocova *et al.* (1993) utilizaram a técnica de hibridização de DNA previamente amplificado por PCR e identificaram a presença do gene SRY em 33% de seus pacientes. Sequências centroméricas, contudo, não foram detectadas. Page (1994) e Held (1993) discutiram esses resultados e questionaram uma provável contaminação, que poderia estar gerando resultados falso-positivos levando a essa porcentagem surpreendente alta de mosaicismo de Y. Chu *et al.* (1995) utilizaram a mesma metodologia e verificaram que 20% dos pacientes estudados geraram sinais de hibridização positivos para o gene SRY, além de observarem que 30% dos controles femininos normais também tiveram hibridização positiva. De acordo com estes autores, é possível que os sinais detectados nas pacientes com síndrome de Turner e nos controles sejam gerados pela amplificação de outras seqüências parcialmente homólogas à porção conservada do gene SRY, que foi amplificada e usada como sonda. Dessa forma, essa metodologia mostrou-se inadequada para esse tipo de análise.

A identificação de material proveniente do cromossomo Y nas pacientes com síndrome de Turner é de extrema relevância clínica, devido ao alto risco de formação de tumor (gonadoblastoma).

Nas mulheres com sexo reverso (46,XY) a frequência de ocorrência de gonadoblastoma foi estimada em 30%. O risco de malignização nos pacientes 45,X/46,XY e mulheres com síndrome de Turner e mosaicismo de Y é de 15 a 20% (Schellas *et al.*, 1974; Simpson & Photopoulos, 1976; Page 1987b; Verp & Simpson, 1987). Por outro lado, embora mulheres portadoras de síndrome de Turner cujos cariótipos são 45,X ou 45,X/46,XX também possuam gônadas disgenéticas, nelas, ao contrário das pacientes com sexo reverso, o risco de malignização é baixíssimo.

A alta frequência de gonadoblastoma em pacientes com sexo reverso, comparada à de mulheres com síndrome de Turner que não portam material derivado de Y, indica que somente a presença de gônadas disgenéticas não predispõe à formação do tumor. A presença de seqüências do cromossomo Y parece ser essencial para esse processo. Page (1987b) propôs a existência de um gene no cromossomo Y que estaria envolvido no desenvolvimento dos tumores; o *locus* desse suposto gene foi denominado *locus* do gonadoblastoma no Y (GBY).

De acordo com o modelo proposto por Page nesse trabalho, a presença do GBY não seria condição suficiente para o desenvolvimento do gonadoblastoma. A manifestação oncogênica do GBY requeriria a presença de gônadas anormais. Além disso, a combinação do GBY e gônadas disgenéticas constituiria uma predisposição forte, mas não absoluta, à malignização.

Uma vez que o gonadoblastoma pode ocorrer na presença de cromossomos Y parcialmente deletados, é possível definir uma pequena porção do Y no qual se encontra o *locus* GBY. A maior parte ou mesmo todos os indivíduos com gonadoblastoma devem portar, ao menos em algumas células, segmentos de Y contendo o GBY. Por outro lado a ausência desse *locus* deve evitar a formação de tumor. Análises de mapas de deleção de pacientes com gonadoblastoma portadores de seqüências provenientes do cromossomo Y levaram à localização do suposto *locus* GBY na região próxima ao centrômero no braço longo do cromossomo Y (Yq) (Page, 1987b).

Tsuchiya *et al.* (1995) estudaram pacientes com sexo reverso e gonadoblastoma. A base molecular da reversão sexual nessas pacientes incluía mosaicismo para o cromossomo Y em duas pacientes, deleção de SRY em cinco, e era desconhecida em outros três pacientes com cariótipo 46,XY e SRY normal. Assim, a presença do gene SRY aparentemente não tem relação direta com o desenvolvimento do gonadoblastoma, já que entre esses indivíduos alguns possuíam o gene deletado e outros não.

Usando STS Tsuchiya *et al.* (1995) estabeleceram mapas de deleção das pacientes com gonadoblastoma. O gene GBY foi sublocalizado em uma região crítica de 1 a 2 Megabases,

próxima ao centrômero do Y. O mesmo estudo indicou que cópias de duas famílias gênicas dispersas, ligadas ao Y, estavam presentes nas pacientes. Essas famílias eram TSPY (“testis-specific protein, Y-encoded”) e YRRM (“Y-chromosome RNA recognition motif”). Os genes TSPY e YRRM possuem expressão testículo-específica. Cópias de TSPY foram localizadas dentro da região crítica do GBY, o mesmo não ocorrendo com YRRM (Tsuchiya *et al.* 1995).

Existe a possibilidade de que a susceptibilidade ao gonadoblastoma seja causada por múltiplos *loci*. Alternativamente, é possível que o GBY seja um gene de cópia única ainda não identificado ao longo da região crítica. Apesar da posição exata desse ou desses genes não ter sido determinada, é possível investigar a presença de seqüências do cromossomo Y que pertençam à região crítica. Da caracterização da presença ou não de material derivado de Y depende a indicação de uma gonadectomia para prevenir o desenvolvimento de tumor.

OBJETIVOS

- ♦ Investigar, por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR) e de hibridização com sondas Y-específicas, a ausência de seqüências derivadas do cromossomo Y em mulheres com disgenesia gonadal pura 46,XY.

- ♦ Investigar a ocorrência de mutações no gene SRY, por meio de seqüenciamento do domínio conservado, nas pacientes com reversão sexual que sejam SRY-positivas.

- ♦ Detectar, por meio de hibridização com sondas Y-específicas, reação de PCR e “nested-PCR” com “primers” Y-específicos, a presença ou ausência de seqüências derivadas do cromossomo Y em uma amostra de pacientes com síndrome de Turner.

- ♦ Determinar o grupo de pacientes com síndrome de Turner em que deva ser indicada a pesquisa de cromossomo Y.

As pacientes foram diagnosticadas e indicadas para estudo molecular pelo grupo de médicos do GIEDDS (Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo) e tiveram o exame de cromatina X em núcleos de células de mucosa oral e o cariótipo a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico realizados no laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica da FCM-UNICAMP. A única exceção foi uma paciente com reversão sexual encaminhada pelo laboratório “GENETIKA” de Curitiba (paciente “c”).

Foram estudadas três mulheres com disgenesia gonadal pura 46,XY. As gônadas de duas delas (casos “a” e “b”) eram constituídas de estroma do tipo ovariano com focos de calcificação e ausência de células germinativas. Na paciente “a” haviam, também, focos de gonadoblastose. Não há dados a respeito da constituição das gônadas da paciente “c”.

As três possuíam genitália externa feminina normal e apresentaram amenorréia primária e ausência de caracteres sexuais secundários. A paciente “c” apresentava, ainda, baixa estatura. Não foram observadas outras anomalias somáticas relevantes.

Tabela 1: Características das pacientes com disgenesia gonadal pura

Casos	Idade	Cariótipo	Gonadectomia	Genitália externa
a	16 anos	46,XY	+	feminina normal
b	16 anos	46,XY	+	feminina normal
c	16 anos	46,XY	?	feminina normal

Nota: ? - não foi fornecida informação a respeito da realização de gonadectomia nessa paciente.

Foram estudadas, também, vinte e três pacientes com síndrome de Turner. O estudo citogenético dessas pacientes havia demonstrado, em treze casos, que elas possuíam cariótipo 45,X em 50 metáfases analisadas e cromatina X negativa. Uma paciente possuía cariótipo 46,X,+mar. As demais (nove pacientes) apresentavam mosaicismos constituídos por uma linhagem celular 45,X e mais uma ou duas linhagens com constituição cromossômica heterogênea.

Dentre as mulheres com síndrome de Turner com mosaicismos, pôde-se identificar quatro grupos classificados de acordo com a constituição das outras linhagens que não a 45,X. Um grupo de quatro pacientes era portador de cromossomos em anel, sendo que em dois desses casos suspeitava-se que os anéis eram derivados de cromossomo X. Outro grupo era composto por três pacientes com cromossomos marcadores de origem não identificada. Havia, ainda, uma paciente com cariótipo 45,X/46,XX e outra com cariótipo 45,X/46,X, idic(Y).

A paciente com cariótipo 45,X/46,XX foi inicialmente classificada como 45,X com base no cariótipo obtido a partir de linfócitos. Verificou-se, entretanto, a presença de mosaicismos de X quando foi realizado o estudo de fibroblastos.

No caso da paciente com cariótipo 45,X/46,X, idic(Y), o marcador era inicialmente de origem desconhecida e foi identificado por hibridização *in situ* (FISH) como sendo um cromossomo dicêntrico derivado de Y (Hackel, C. comunicação pessoal).

Tabela 2: Constituição cromossômica das pacientes com síndrome de Turner

Caso	Cariótipo	nº céls. analisadas	% céls. 45,X	% outras linhagens
1	45,X/46,X,r(?)	50	48	52
2	45,X,15p+/46,X,r(?),15p+	150	82,7	17,3
3	45,X/46,X,r(?)	32	37,5	62,5
4	45,X/46X,r(?)	50	84	16
5	45,X/46,X, idic(X)/47,X, idic(X),+mar	100	80,5	46,X, idic(X) 17,7 47,X, idic(X),+mar 1,8
6	45,X/46,X,+mar	100	97	3
7	45,X/46,X,+mar	32	21,9	78,1
8	45,X/46,XX*	150	10	90
9	45,X/46,X, idic(Y)	11	36,4	63,3
10	46,X,+mar	16	0	100
11 a 23	45,X	50	100	0

Notas: * Este cariótipo foi obtido a partir de cultura de fibroblastos.

r = cromossomo em anel

mar = marcador

idic = cromossomo dicêntrico

As principais características clínicas apresentadas pelas pacientes com síndrome de Turner da presente amostra encontram-se sistematizadas na tabela 3.

Tabela 3: Resumo das características clínicas das pacientes com síndrome de Turner:

Casos	Idade (anos)	Estatura (cm)	Zscore	Anomalias causadas por linfedema	Anomalias esqueléticas
1	16,4	139,4	-3,55	+	+
2	1,3	58,5	-6,73	+	+
3				+	+
4	6,69	108,3	-1,98	+	+
5	14	133,8	-4,12	+	+
6	0,11	49,2	-2,36	+	+
7	0,58	58,3	-3,56	+	+
8	0,92	68	-1,81	+	+
9	22,5	156	-1,29	+	+
10	3,33	85,6	-2,88	+	+
11	13,32	129,5	-4,34	+	+
12	5,74	108,5	-0,95	+	+
13	13,34	133	-3,83	+	+
14	10,8	125,1	-2,64	+	+
15	28,74	134,5	-4,90	+	+
16	6,55	109,5	-1,62	+	+
17	8	100	-4,37	+	+
18	8,75	118	-2,01	+	+
19	16,28	131	-4,79	+	+
20	1,42	79	-0,35	+	+
21	0,036	44	-3,73	+	+
22	0,75	68	-1,24	+	+
23	0,46	66	+0,28	+	+

Nota: o desvio da estatura em relação à média está expresso em “zscore”

METODOLOGIA

1. Coleta de amostras:

A coleta de amostras de sangue das pacientes foi realizada pelo grupo do GIEDDS (Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo) no ambulatório de pediatria do HC-UNICAMP. Foram colhidos de 5 a 20 ml de sangue periférico, em tubo de centrífuga estéril EDTA 10% como agente anti-coagulante.

2. Extração do DNA genômico a partir de sangue periférico:

A extração de DNA genômico de sangue total com proteínase K (Boehringer Mannheim, Germany) foi feita segundo protocolo descrito por Araújo *et al.* (1996).

O DNA de cada indivíduo foi extraído a partir de 15 a 20ml (adulto) ou 5 a 10 ml (criança) de sangue periférico. Ao sangue total, adicionou-se 35 ml de solução A. Após homogenização colocou-se a mistura no gelo por 30 minutos, para que as hemácias fossem lisadas. Centrifugou-se a 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C, em centrífuga Beckman GPR, rotor horizontal GH-3.7. Retirou-se o sobrenadante. O “pellet” foi novamente ressuspensão em 20 ml da solução ⁸A, agitando-se por inversão, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2.500 rpm e o sobrenadante foi desprezado. As etapas de lise e centrifugação foram repetidas várias vezes até o “pellet” passar de rosa para incolor.

Continuando o procedimento, ressuspendeu-se o “pellet” em 1 ml de solução B e adicionou-se 250 µl de solução C preparada na hora. Incubou-se em banho-maria a 37°C durante a noite. Após a incubação, tratou-se a solução com 1,25 ml de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, agitou-se por inversão por 5 minutos e centrifugou-se a 2.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, retirou-se a camada aquosa e a extração com fenol foi repetida. Retirou-se a fase superior que, após a segunda extração com fenol, foi tratada com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

⁸ As soluções utilizadas para extração de DNA encontram-se descritas na página seguinte.

O DNA foi precipitado adicionando-se 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado de DNA foi retirado da solução com auxílio de um bastão e lavado com etanol 70% para eliminar o excesso de sal. O DNA foi, então, dissolvido em quantidade apropriada (200-500 µl) de TE e a concentração foi determinada por leitura de absorção óptica a 260 nm em espectrofotômetro.

Solução A

Triton-X	1%
MgCl ₂	5 mM
Sacarose	0,32 M (109,5g sacarose ultra pura/litro)
Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)

Solução B (2x concentrada)

Na ₂ EDTA	20 mM
NaCl	20 mM
Tris-HCl	20 mM (pH 8,0)

Solução C

Para 1 ml = 0,5 ml de solução B, 1 mg de Proteinase K e 0,5 ml de SDS 10% (preparada na hora do uso).

Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

3. Seqüências Y-específicas utilizadas

3.1 Sondas utilizadas no método de “Southern-blotting”

Os plasmídios contendo as seqüências de DNA utilizadas como sondas foram gentilmente doados pelos pesquisadores, Drs. Albert de la Chapelle (Department of Medical Genetics, University of Helsinki, Finland) e Peter Vogt (Department of Human Genetics, University of

Heidelberg, Germany). Os plasmídios contendo as sondas de interesse foram inseridos em bactérias por transformação para manutenção e posterior amplificação. As sondas estão descritas a seguir.

Tabela 4: Sondas utilizadas para detecção de seqüências do cromossomo Y:

SONDA	FRAGMENTO(S) DETECTADO(S)	VETOR	INSERTO
Y50f2	A (10Kb) e B (7,5Kb) - intervalo 3 C (6,0Kb) e E (1,7Kb) - intervalo 6 D (4,5Kb) - intervalo 4	pBluescript (2,9 Kb)	fragmento de 1,7kb inserido nos sítios <i>EcoR1</i>
Y6BS65	A (17Kb), B (14,5Kb), C (8,5Kb), D (14Kb) e E (11Kb) - intervalo 6	pBluescript (2,9 Kb)	fragmento de 0,7Kb inserido nos sítios <i>EcoR1</i> e <i>Hind III</i>
Y6BaH34	fragmento de 6,0Kb - intervalo 6		fragmento de 1,3Kb inserido nos sítios de <i>HindIII</i>
pDp1007	A (3,0Kb) - intervalo 1A1 (ZFY) B (1,8Kb) - Xp21.3-p22.1	pUC13 (2,7Kb)	fragmento de 1,3Kb inserido nos sítios de <i>HindIII</i>
pY49f	fragmento de 2,8 Kb - intervalo 6	pBR322 (4,3 Kb)	fragmento de 2,8 Kb inserido nos sítios <i>EcoR1</i>

Estas sondas foram posteriormente utilizadas para hibridização com DNA genômico digerido e imobilizado em membranas pela técnica de “Southern-blotting”, na tentativa de se localizar seqüências derivadas de Y nas pacientes com Síndrome de Turner e para análise de deleções de Y em pacientes com sexo-reverso.

3.2 Seqüências amplificadas por reação de polimerase em cadeia (PCR)

Para detecção de mosaicismos de Y, por meio de PCR, em pacientes com síndrome de Turner, foram estudados, preferencialmente, *loci* situados próximo ao centrômero e na porção proximal do braço longo do cromossomo Y, uma vez que essa região supostamente contém o *locus* GBY. Para o mapeamento do cromossomo Y das pacientes com disgenesia gonadal, foram estudados, além do gene SRY e de *loci* centroméricos, *loci* situados ao longo de toda a porção eucromática do braço longo do Y. Os *loci* estudados encontram-se discriminados na Tabela 5.

Tabela 5: *Loci* Y-específicos estudados e dos respectivos “primers” utilizados.

<i>Locus</i>	Intervalo no Y	Primers	tamanho seqüência amplificada
SRY	1A1	SRY1:5'-CATTGTCGACCAGTGTGAAACGGGAGAAAACA-3' SRY4:5'-CATTGTCGACGTACAACCCTGTTGTCCAGTTGC-3'	380pb
¹ TSPY	3	JA56: 5'-CATGACATAATGGCGGAG-3' JA52: 5'-CGATAGGCCTCCACTTCATA-3' JA35: 5'-CCCCACCTAGACCGCAGAGG-3' JA30: 5'-GGGAAGAAGGCCTAAGAGCACC-3'	1300pb 608pb
¹ DYZ3	cen	A: 5'-TGAAAACCTACACAG-AAGCTG-3' B: 5'-ACACATCACAAGAAGACTATG-3' G: 5'-AGCCTTTTGTGGCCTACG-3' H: 5'-ATCCTCCTGGAGATAC-CA-3'	1100pb 330pb
² sY78	cen	5'-TCCTTTTCCACAATAGACGTCA-3' 3'-GGAAGTATCTTCCCTTAAAAGCTATG-5'	170pb
sY81	5A	5'-AGGCACTGGTCAGAATGAAG-3' 3'-AATGGAAAATACAGCTCCCC-5'	209pb
sY86	5C	5'-GTGACACACAGACTATGCTTC-3' 3'-ACACACAGAGGGACAACCCT-5'	320pb
sY151	5F	5'-AAATCTGTAGTCTCATATCAATCTG-3' 3'-TTACTTGATTTAGCAATAAAAAGG-5'	183pb
sY117	5M	5'-GTTGGTTCCATGCTCCATAC-3' 3'-CAGGGAGAGAGCCTTTTACC-5'	262pb
sY143	6A	5'-GCAGGATGAGAAGCAGGTAG-3' 3'-CCGTGTGCTGGAGACTAATC-5'	311pb
sY254	³ 6D	5'-GGGTGTTACCAGAAGGCAAA-3' 3'-GAACCGTATCTACCAAAGCAGC-5'	330pb
sY255	³ 6D	5'-GTTACAGGATTCGGCGTGAT-3' 3'-CTCGTCATGTGCAGCCAC-5'	126pb

Notas: ¹ nos loci TSPY e DYZ3 utilizou-se “primers” internos para um segundo PCR (“nested-PCR”).

²a designação “sY” refere-se aos STS (“sequence-tagged sites”) localizados no cromossomo Y. A localização desses STS, com exceção de sY254 e sY255, foi baseada na descrição fornecida por Vollrath *et al.* (1992), mas sua posição exata pode variar em diferentes trabalhos.

³a localização desses STS foi baseada na descrição fornecida por Reijo *et al.* (1996).

4. Transformação de bactérias :

4.1. Transformação bacteriana:

Para manutenção do plasmídeo contendo o inserto de interesse foi realizada a transformação em células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α para posterior amplificação através do seguinte procedimento, segundo protocolo de Sambrook e col. (1990), modificado:

Aliquotas de 100 μ l de células competentes da bactéria DH5 α (preparadas anteriormente e estocadas no laboratório) foram retiradas do freezer -70°C e colocadas em gelo para descongelar lentamente. A cada tubo adicionou-se aproximadamente 40 ng de DNA plasmidial. Esta mistura foi mantida em gelo por 30 minutos. Ao término deste período de incubação, cada preparação foi submetida ao choque térmico com o seguinte procedimento: 42°C por 90 segundos (tempo crítico) e imediatamente colocados no gelo por 1 minuto. Adicionou-se a estes tubos 700 μ l de meio LB líquido (sem ampicilina), e foram mantidos a 37°C por 30 minutos.

Uma alíquota de 150 μ l foi rapidamente vertida sobre placas de Petri individuais com meio LB sólido contendo ampicilina para seleção. As placas foram transferidas para estufa e mantidas a 37°C por 16 h para que as colônias transformantes pudessem desenvolver.

Solução antimicrobiana (ampicilina)

Concentração estoque 25 mg/ml

Concentração final no meio deve ser de 100 μ g/ml

A solução foi esterilizada por filtração (filtro 0,45 μ m), dividida em alíquotas e mantida a -20°C.

4.2. Mini-preparação de plasmídeo:

A mini-preparação foi realizada com a finalidade de certificar se o fragmento de interesse estava presente no plasmídeo, antes de se proceder a extração em larga escala. As colônias

transformantes foram selecionadas e crescidas em tubo de ensaio contendo 5 ml de meio LB líquido e 100 µg/ml de ampicilina (ver item 5.2) a 37°C, durante a noite com agitação de 250 rpm.

Transferiu-se 1,5 ml da cultura para tubo eppendorf, o qual foi centrifugado em microcentrifuga por 2 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspenso em 100 µl de “tampão de lise”. Em seguida, fez-se uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitou-se em “vortex” por 15 segundos e se repetiu a centrifugação anterior. Retirou-se a fase aquosa e o DNA foi precipitado com 200 µl de etanol absoluto gelado. Imediatamente centrifugou-se por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, lavou-se o “pellet” com etanol gelado 70% e o DNA foi dissolvido em 50 µl de TE. Foi feito um teste em gel de agarose 0,8% para confirmar a presença do plasmídeo.

Solução de tampão de lise

LiCl	2,5 M
Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
Triton 100x	4%
EDTA	62,5 mM

5. Extração de DNA de plasmídeo em larga escala:

Foi seguido basicamente o protocolo descrito por Sambrook e col. (1989), com algumas adaptações. Um inóculo de bactérias contendo o plasmídeo de interesse foi feito em 5 ml de meio LB líquido com 100 µg/ml ampicilina e mantidas durante a noite a 37°C sob agitação de 250 rpm. No dia seguinte, os 5 ml de cultura foram adicionados a 500 ml de meio LB líquido com 100 µg/ml de ampicilina e incubados a 37°C sob agitação vigorosa por aproximadamente 18h.

A cultura foi dividida em 2 frascos de centrífuga de 250 ml e submetida à centrifugação em 5.000 rpm por 20 minutos sob refrigeração a 4°C. Desprezou-se o meio (sobrenadante) e o “pellet” foi lavado com 100 ml de STE, agitando em “vortex” para misturar bem; em seguida, centrifugou-se a 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C e desprezou-se o sobrenadante.

As células foram ressuspensas em 18 ml de Solução I e acrescentou mais 2 ml de lisozima (10 mg/ml em Tris-HCl 10 mM pH 8,0), preparada na hora. Adicionou-se 40 ml de Solução II, o conteúdo foi misturado repetidas vezes lentamente por inversão e mantido à temperatura ambiente por 10 minutos.

O DNA bacteriano foi precipitado com adição de 20 ml da Solução III, o conteúdo foi misturado lentamente por inversão e mantido em gelo por 10 minutos. O precipitado floculoso formado foi separado por centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi passado por 4 camadas de gaze e o filtrado foi dividido em dois tubos de centrífuga. O DNA plasmidial foi precipitado por adição de 0,6 vezes o volume de isopropanol. Após misturar bem, manteve-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se então, a 5.000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi lavado uma vez com etanol 70% e depois de seco dissolvido em 3 ml de TE. A seguir, procedeu-se a purificação do DNA plasmidial.

Solução de STE

Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
NACl	100 mM
EDTA	1 mM (pH 8,0)

Solução I

Tris-HCl	25 mM
EDTA	10 mM
Glicose	50 mM

Conservar a 4°C.

Solução II

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Preparar na hora do uso.

Solução III

Acetato de potássio 5 M (pH 4,8)

Mistura de acetato de potássio e ácido acético glacial resultando numa concentração de 5 M com respeito aos íons acetato e 3 M com respeito aos íons potássio.

Conservar a 4°C.

5.1. Purificação do DNA plasmidial:

A purificação do DNA plasmidial iniciou-se com extração volume/volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), realizada por duas vezes e seguida de uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

O RNA contaminante foi eliminado adicionando-se o mesmo volume de acetato de amônio 7,5 M. Após a mistura por inversão, foi incubado no gelo por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 15.000 rpm por 10 minutos a 4°C (o “pellet” de RNA formado foi desprezado).

O sobrenadante com o DNA plasmidial foi transferido para outro tubo e precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, deixado durante uma noite em freezer -20°C. Após esse período centrifugou-se a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Lavou-se por três vezes com 5 ml de etanol 70% gelado. O sobrenadante foi descartado e, depois de seco, o “pellet” foi dissolvido em 200 a 500 µl de TE. A leitura da concentração foi realizada em espectrofotômetro.

6. Preparo do fragmento de interesse:

Após a extração em larga escala dos plamídios contendo os fragmentos de interesse, estes foram digeridos com enzimas de restrição. Para cada plasmídio, montou-se uma reação contendo de 10 a 30 µg de DNA de plasmídio, tampão adequado para cada enzima de restrição, e aproximadamente 10 a 30 unidades da enzima. Incubou-se na temperatura adequada para cada enzima durante no mínimo 3 horas.

O volume total da reação foi, então, aplicado em um gel de agarose de 0,8% e o fragmento foi separado do vetor por diferença de tamanho através de eletroforese. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador com luz ultravioleta. A banda correspondente ao fragmento foi extraída da agarose segundo protocolo de Sambrook e col. (1989), modificado.

A banda a ser eluída do gel de agarose 0,8%, já contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio e corrido em tampão TAE, foi localizada com luz UV. Com um bisturi fez-se uma incisão no gel, à frente da banda, e com ajuda de pinças inseriu-se o papel DEAE (DE81, Whatman) de tamanho adequado, até que o mesmo tocasse o fundo da cuba.

A eletroforese prosseguiu até que todo o DNA migrasse para o papel DEAE. O papel foi cuidadosamente removido com auxílio de uma pinça e transferido para um tubo eppendorf com 400 µl de tampão de eluição esterilizado por filtração, e mantido por 30 minutos a 68°C. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf após uma centrifugação de 15 minutos. O DNA foi precipitado com 4 µl de MgCl₂ 1 M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. Após incubação a -20°C por aproximadamente 18 h, centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 minutos e o DNA foi dissolvido em 20 µl de TE. A concentração foi estimada em gel de agarose.

Solução estoque de brometo de etídio 10 mg/ml

Brometo de etídio	1,0g
H ₂ O Milli-Q q.s.p	100 ml

Solução de brometo de etídio (0,5 ug/ml)

Solução estoque de brometo de etídio 10mg/ml	5 µl
H ₂ O Milli-Q q.s.p	100 ml

Armazenado em frasco escuro a 4⁰C.

Solução de tampão de eluição

Tris-HCl	1 M (pH 8,0)
EDTA	0,5 M (pH 8,0)
NaCl	5 M

A solução foi esterilizada por passagem em filtro de 0,45 microm e armazenada a 4°C.

7. Análise do DNA genômico pelo método de “Southern blot”:

O DNA genômico de cada indivíduo extraído pelo método descrito no item 3 foi utilizado em “Southern blots” preparados da seguinte maneira:

7.1. Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição:

O DNA genômico foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* (para hibridização com as sondas 50f2, pDp1007 e 49f), *XbaI* (para hibridização com a sonda Y6BS65) e *HindIII* (para hibridização com a sonda Y6BaH34). As reações foram preparadas em um volume final de 150 µl, contendo de 10 a 15 µg de DNA genômico, tampão de restrição recomendado pelo fabricante, espermidina, enzima de restrição apropriada numa proporção de 3 U de enzima para cada µg de DNA e água Milli-Q para completar o volume. As reações foram incubadas em banho-maria durante uma noite a 37°C.

O DNA foi precipitado com acetato de sódio pH 5,2 para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, por 18 h a -20 °C. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos em microcentrífuga e lavou-se com etanol 70%. As amostras de DNA foram ressuspensas com 15 µl de TE aos quais foram acrescentados 3 µl de azul de bromofenol; em seguida, foram aplicadas em um gel de agarose 0,8%.

Solução tampão de amostra 6x (azul de bromofenol)

Glicose	50%
Azul de Bromofenol	25%

TBE 10x pH 8,0 10,0 ml

Dividir em alíquotas em tubo eppendorf e estocar a 4°C.

7.2. Preparo do gel e eletroforese:

Preparou-se um gel de agarose 0,8%, com tampão TBE (1X) em cuba de acrílico. A eletroforese foi feita a uma voltagem média de 40 volts, em tampão TBE (1X). Como marcador de peso molecular utilizou-se o DNA “ladder” de 1 kb (Gibco-BRL). A eletroforese prosseguiu por tempo adequado para cada enzima dependendo do tamanho de fragmento a ser estudado. Em seguida o gel foi corado com brometo de etídio, por 30 minutos.

Foi tirada uma fotografia em câmera Polaroid sob iluminação de luz ultravioleta (transluminador), colocando uma régua fluorescente ao lado do gel para poder reconhecer o tamanho dos fragmentos detectados pela sonda.

Solução estoque de tampão Tris-Borato-EDTA (TBE 10x)

Para 1 litro:

Tris-Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	40 ml

Autoclavar.

Solução de uso do tampão Tris-Borato-EDTA (TBE 1x)

Tris-Base	0,089 M
Ácido Bórico	0,089 M
EDTA (pH 8,0)	0,002 M

Solução estoque do marcador de peso molecular - 1 kb “ladder” (Gibco-BRL)

Para 1.240 µl:

DNA LADDER	40 μ l
TBE 10x	100 μ l
Azul de Bromofenol	200 μ l
H ₂ O estéril	900 μ l
Armazenar 4 ^o C.	

7.3. Transferência do DNA do gel para suporte sólido:

Para a transferência dos fragmentos de DNA contidos no gel para a membrana de nylon (Hybond-N+ da Amersham) pelo método “Southern blotting” (Southern, 1975 - modificado), foi utilizado o método de transferência salina.

O gel foi tratado primeiramente com uma solução de despurinação por 15 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foi transferido para a solução de desnaturação por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois da desnaturação, procederam-se duas etapas de 15 minutos de lavagem do gel com solução de neutralização. A transferência foi realizada com solução de 20x SSC.

Solução de despurinação

HCl	0,25 N
Fazer na capela.	

Solução de desnaturação

NaOH	0,5 N
NaCl	1,5 M

Solução de neutralização

Tris-HCl	0,5M (pH 8,0)
NaCl	1,5 M

Solução de SSC 20x

NaCl	3 M
Citrato de sódio	0,3 M

Autoclavar.

Após o sistema de “Southern blotting” ter sido montado, a transferência prosseguiu por 48 h. A membrana foi retirada e incubada por 2 h em forno a 80°C e posteriormente estocada seca em saco plástico selado.

8. Marcação das sondas:

As sondas utilizadas foram obtidas por excisão de plasmídios, sendo, portanto, fragmentos de DNA de fita dupla para serem empregados nas hibridizações de “Southern blots”. A marcação das sondas foi feita pelo método de “Random-Priming” descrito por Feinberg e Volgstein (1983), que emprega a incorporação de um nucleotídeo marcado radioativamente ao fragmento de DNA. Os nucleotídeos radioativos foram adquiridos da Amersham Internacional.

A reação de “Random Priming” consiste em uma polimerização do DNA por ação do fragmento Klenow da DNA polimerase I a partir de “primers” (hexâmeros) aleatórios. A reação se processou num volume final de 50 µl da seguinte forma: desnaturou-se primeiramente por aquecimento a 100°C por 10 minutos 25 a 50 ng do DNA em volume variável de H₂O para completar 23 µl, deixando, em seguida, em gelo por 5 minutos. Centrifugou-se rapidamente em microcentrífuga, acrescentou-se 15 µl de tampão, 5 µl do α -³²P-dCTP (3.000 Ci/mmol) e 3 unidades da enzima. Incubou-se à temperatura ambiente por no mínimo 2 h.

Os reagentes utilizados estavam disponíveis em “Kits”- Gibco BRL ou Promega, com exceção do α -³²P-dCTP e do α -³²P-dATP que foram adquiridos mensalmente devido à curta vida média do isótopo ³²P (14,5 dias).

Solução tampão “Random Priming”

HEPES	0,67 M
Tris-HCl	0,17 M
MgCl ₂	17 mM
2-mercaptoetanol	33 mM
BSA	1,33 mg/ml
dNTPs	0,001 mM
18 OD260 Unidades/ml dos “primers” [hexâmeros, pH 6,8]	

Nos dois casos, após a reação completou-se o volume para 100 µl com TE , e os nucleotídeos não incorporados foram, então, eliminados através da passagem por uma coluna de Sephadex G-50. Em seguida, contou-se a radioatividade de 1 µl em um contador de cintilação líquida e, calculou-se a eficiência da incorporação. Todo o trabalho com radioisótopos foi realizado acompanhando com um monitor de radiação do tipo Geiger.

9. Hibridização

Após a transferência pelo método de “Southern”, os filtros obtidos contendo o DNA genômico de cada indivíduo digerido com a enzima de restrição de interesse foram hibridizados com a sonda desejada marcada. As condições de reação variaram conforme a sonda, porém de uma maneira geral esse processo se deu em duas etapas:

9.1. Pré-hibridização:

Os filtros foram incubados em solução de pré-hibridização por 18 h a 42°C em tubos apropriados e postos em incubadora.

Solução de pré-hibridização

Formamida	50%
SSC	5x

Tris-HCl	20 mM (pH 7,5)
Denhardt's	10x
SDS	1%
ssDNA	200 µg/ml

Desnaturar e adicionar o ssDNA na hora do uso.

Conservar a 4^oC em frasco com papel alumínio.

Solução 100x Denhart's

Ficoll 400	2,0g
Polyvinilpyrrolidone (PVP)	2,0g
Soro bovino fetal (BSA) sigma	2,0g
H ₂ O destilada	100 ml

Solução estoque des ssDNA

ssDNA	10 mg/ml
-------	----------

Dissolver, em um becker, o ssDNA com H₂O bidestilada, sobre um agitador magnético por 2 a 4 h, a temperatura ambiente. Em seguida a mistura é sonicada no aparelho ULTRASONIC Homogeneizer. Dividir em alíquotas e armazenar a -20^oC. Na hora do uso desnaturar o ssDNA por 10 minutos em água fervente.

9.2. Hibridização:

A solução acima foi trocada pela de hibridização contendo aproximadamente 2 x 10⁶ cpm/ml da sonda e incubou-se cerca de 18 h a 42^oC.

Solução de hibridização

Formamida	50%
SSC	5x
Tris-HCl	20 mM (pH 7,5)
Denhardt's	2x

SDS	1%
Sulfato de dextrana	25%
ssDNA	200 µg/ml

Desnaturar e adicionar o ssDNA na hora do uso.

Conservar a 4°C em frasco com papel alumínio.

Solução de sulfato de dextrana 50x

Sulfato de dextrana	10 g
H ₂ O bidestilada	13 ml

10. Lavagem dos filtros:

Após a hibridização os filtros foram lavados inicialmente por 15 minutos em uma condição de baixa estringência à temperatura ambiente para retirada do excesso de sonda. A seguir foram lavados duas vezes em condições de baixa estringência a 56°C, por 15 minutos e, finalmente, em condições de alta estringência, a 56°C, por 5 a 15 minutos.

Solução de lavagem de baixa estringência

SSC	2x
SDS	0,1%

Solução de lavagem de alta estringência

SSC	0,1x
SDS	0,1%

11. Autoradiografia:

Os filtros lavados foram expostos a filmes de raio-X (Kodak X-OMAT AR) em cassetes apropriados com intensificador de sinal ("Lightning Plus" da Dupont), a -70°C por um período adequado. Após a revelação os filtros foram lavados para a retirada da sonda, com uma solução de

Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5; EDTA 0,001 M, a 100°C, à qual foi acrescentada SDS 0,1% em volume final de 1000 ml.

12. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

As amplificações foram realizadas em Thermal-cycler (Perkin-Elmer). Foram utilizados controles positivos e negativos em todas as reações.

12.1 Amplificação do SRY

Foram utilizados “primers” adequados para a amplificação do gene SRY para determinar a presença ou ausência dessa seqüência nas pacientes que apresentam sexo-reverso e também nas pacientes portadoras da síndrome de Turner.

A amplificação do gene SRY foi realizada através da utilização dos “primers” SRY1 e SRY4, capazes de amplificar um fragmento de 380 pb que inclui o “HGMbox”. As seqüências dos “primers” se encontram na tabela 5.

Foram adotadas as seguintes condições de reação:

DNA genômico.....	0,3µg
dNTP.....	200µM
DMSO.....	10%
Tampão Taq DNA polimerase (Pharmacia).....	1X
Primer SRY-1.....	100pmol
Primer SRY-4.....	100pmol
Taq DNA polimerase	1,25U
Água MilliQ.....	q.s.p. 50µl

Foram utilizados os seguintes ciclos de amplificação:

Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	94	5 minutos
30	94	45 segundos
	60	30 segundos
	72	30 segundos
1	72	5 minutos

12.2 Amplificação de TSPY e DYZ3 por “nested-PCR”

Para detecção de mosaicismos de Y em pacientes com síndrome de Turner foram utilizados, além dos “primers” de SRY, “primers” para a amplificação de TSPY (proteína testículo-específica codificada pelo Y), localizado na porção proximal do braço longo do Y e a repetição DYZ3, localizada próxima ao centrômero do cromossomo Y.

No sentido de aumentar o nível de sensibilidade do método, estas seqüências foram amplificadas através de “nested-PCR”, ou seja, foram utilizados dois pares de “primers” para cada *locus* estudado, sendo um par mais interno que o outro. As duas reações de PCR foram feitas consecutivamente, sendo que a segunda utilizou como substrato o produto obtido na primeira. Os “primers” utilizados na primeira reação foram DYZ3-A e DYZ3-B; TSPY-JA56 e TSPY-JA52, que estão descritos na Tabela 5.

Os produtos obtidos foram diluídos (1:10) e 1µl foi, então, utilizado numa segunda etapa de amplificação contendo os seguintes “primers” internos: DYZ3-G E DYZ3-H; TSPY-JA35 e TSPY-JA30, que estão descritos na Tabela 5.

As condições utilizadas na reação foram as seguintes:

DNA genômico.....	0,3µg
Tris-Hcl (pH 8,3).....	10mmol/L
KCl.....	50mmol/L
MgCl ₂	1,5mmol/L
dNTP.....	200µM
Cada “primer”.....	100pmol
Triton X-100.....	0,1%
Taq DNA polimerase.....	3U
Água milliQ.....	q.s.p.50µl

Ciclos de amplificação da primeira etapa:

Primers	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)
DYZ-A/B	30	95	60
		57	60
		72	60
TSPY-JA56/52	30	95	60
		55	60
		72	60

Ciclos de amplificação da segunda etapa:

Primers	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)
DYZ-G/H	15	95	60
e		55	60
TSPY-JA 35/30		72	90

12.3 Amplificação de STS Y-específicos

Para detecção de mosaicismo de Y em pacientes com síndrome de Turner e para o mapeamento do cromossomo Y da paciente com cariótipo 45,X/46,X,dic(Y) foram amplificados por reação de polimerase em cadeia seqüências do tipo STS, localizadas no braço longo do cromossomo Y, descritas por Vollrath *et al.* (1992) e Reijo *et al.* (1995). Estes STS estão discriminados na tabela 5 (item 3.2).

Foram adotadas as seguintes condições de reação:

DNA genômico.....	0,3µg
dNTP.....	200µM
DMSO.....	10%
Tampão Taq DNA polimerase (Pharmacia).....	1X
Primer a.....	50pmol
Primer b.....	50pmol
Taq DNA polimerase.....	1,25U
Água milliQ.....	q.s.p.50µl

Foram utilizados os seguintes ciclos de amplificação:

Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	94	5 minutos
30	94	1 minuto
	62*	1 minuto
	72	1 minuto
1	72	5 minutos

* A temperatura de anelamento foi de 62 °C para os STS sY78, sY81 e sY86, e para os STS sY151, sY117, sY143, sY254 e sY255 foi utilizada a temperatura de 58°C.

Alternativamente, foram feitas algumas reações com base na técnica PCR “multiplex”, onde mais de um *loci* é amplificado por reação. Os STS 151, 117 e 143 foram amplificados conjuntamente nas pacientes portadoras de disgenesia gonadal pura segundo as seguintes condições:

DNA genômico.....	0,3µg
dNTP.....	200µM
DMSO.....	10%
Tampão Taq DNA polimerase (Pharmacia).....	1X
Mistura de Primers.....	2µl
Taq DNA polimerase.....	1,25U
Água milliQ.....	q.s.p.25µl

A mistura de “primers” foi feita adicionando-se:

sY117a.....	200pmol
sY117b.....	200pmol
sY151a.....	300pmol
sY151b.....	300pmol
sY143a.....	500pmol
sY143b.....	500pmol

13. Seqüenciamento

Após a amplificação do gene SRY foi feito o seqüenciamento do alelo das pacientes que apresentam sexo-reverso e da paciente com síndrome de Turner portadora de um cromossomo derivado de Y, para tentar localizar possíveis mutações responsáveis pelos fenótipos observados.

As reações de seqüenciamento foram realizadas segundo o método de terminação em cadeia descrito por Sanger *et al.* (1977), diretamente a partir do produto de amplificação de gene SRY. Foi realizado o seqüenciamento a partir da fita “sense” e da fita “nonsense” com a utilização dos “primers” SRY1 e SRY4, marcados radioativamente. A porção conservada do gene amplificada por estes “primers” foi seqüenciada pelo menos duas vezes em cada paciente, partindo de diferentes reações de PCR para garantir a fidelidade dos resultados obtidos.

Para o seqüenciamento do produto da reação de PCR foi utilizado o “Kit” de seqüenciamento *Sequenase PCR product*, versão 78500, fabricado pela Amersham. O “Kit” foi desenvolvido para preparar o produto de PCR simétrico para o seqüenciamento, e não requer nenhuma etapa de purificação. O protocolo utilizado foi realizado segundo descrição do fabricante.

Os produtos obtidos nas reações de seqüenciamento foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, desnaturante, contendo uréia. Foi utilizada uma cuba para seqüenciamento da Pharmacia com um tampão Tris-Taurina-EDTA. A duração da eletroforese foi de 4 horas, em média. Após a eletroforese, o gel foi fixado em ácido-acético e metanol por 15 minutos, lavado em água corrente e então secado em estufa, a 42°C, por 16 horas. A seguir, o gel foi exposto a filme de autoradiografia (Hyperfilm MP- Amersham) e posteriormente revelado. A seqüência obtida para cada paciente foi comparada com a do gene selvagem descrita na literatura.

14. Técnica HUMARA

Para avaliar a origem dos cromossomos em anel e marcadores encontrados nos cariótipos de pacientes com síndrome de Turner com mosaïcismo foi utilizada a técnica HUMARA, descrita

inicialmente por Allen *et al.* (1992) e modificada por Yorifuji *et al.* (1997). Essa técnica também é empregada para detecção de níveis baixos de mosaicismo de cromossomo X pacientes 45,X.

Em resumo, uma seqüência de repetições CAG altamente polimórfica presente no gene do receptor de andrógenos humano (HUMARA), localizado em Xq12, foi amplificada através de primers específicos. As repetições CAG foram amplificadas juntamente com suas seqüências flanqueadoras contendo dois sítios de restrição da enzima *HpaII* que são sensíveis a metilação. O DNA genômico foi previamente cortado com as enzimas *RsaI* e *RsaI+HpaII*. Quando um cromossomo X está ativo, os sítios de *HpaII* não estão metilados e se tornam susceptíveis à digestão com essa enzima. Quando isso ocorre não há amplificação por PCR. Por outro lado, na presença de um segundo cromossomo X, inativo, os sítios estão metilados e a digestão não ocorre. Neste caso ocorre amplificação.

Como a porcentagem de heterozigose no *locus* HUMARA é alta (87%) pode-se identificar pacientes em que mais de um alelo está presente. Além disso, pode-se detectar padrões de inativação não randômica comparando-se os produtos obtidos na amplificação antes e após a digestão com *HpaII*.

O DNA genômico foi inicialmente clivado com a enzima de restrição *RsaI*. As reações foram preparadas em volume final de 10µl contendo 3 a 5 µg de DNA genômico, 20mM TRIS-HCL (pH7,4), 5mM MgCl₂ e 4U da enzima *RsaI*. Incubou-se em banho-maria durante uma noite, a 37°C.

A seguir o DNA foi digerido com a enzima *HpaII*. As reações foram preparadas em volume final de 5µl contendo 4µl da digestão com *RsaI*, 20mM TRIS-HCL (pH7,4), 10mM MgCl₂, 4U da enzima *HpaII*. As reações foram incubadas em banho-maria durante uma noite, a 37°C.

Alíquotas de 4µl do DNA digerido com *RsaI* e com *RsaI + HpaII* foram submetidas a uma primeira etapa de amplificação. A reação foi submetida a “hot start” tendo a Taq polimerase sido adicionada a 72°C. Foram utilizados os seguintes “primers”:

REP1 : 5' TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC 3'

AR2 : 5' TCTGGGAGCCAACCTCTCTC 3'

O produto obtido na primeira etapa de amplificação tem, em média, 331pb, podendo variar de tamanho devido ao polimorfismo do número de repetições CAG (11 a 31) encontrado dentro da porção amplificada. Esse produto foi diluído 1:10 e 1µl foi utilizado na segunda etapa de amplificação com os seguintes “primers” internos:

AR1: 5' GTGCGCGAAGTGATCCAGAA 3'

CAG2 : 5' GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT 3'

Os seguintes ciclos de amplificação foram utilizados em ambas as etapas:

Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	94	5 minutos
	94	30 segundos
10	55	1 minuto
	72	1 minuto
20	94	30 segundos
	60	1 minuto
	72	1 minuto
1	72	5 minutos

Uma alíquota de 5µl do produto obtido na segunda etapa de amplificação, o qual tem em média 261pb, foi, então, submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 20%. Após corrida de 4h a 200 volts o gel foi fixado com etanol e ácido acético, corado com AgNO₃, revelado com NaOH e formaldeído e fotografado.

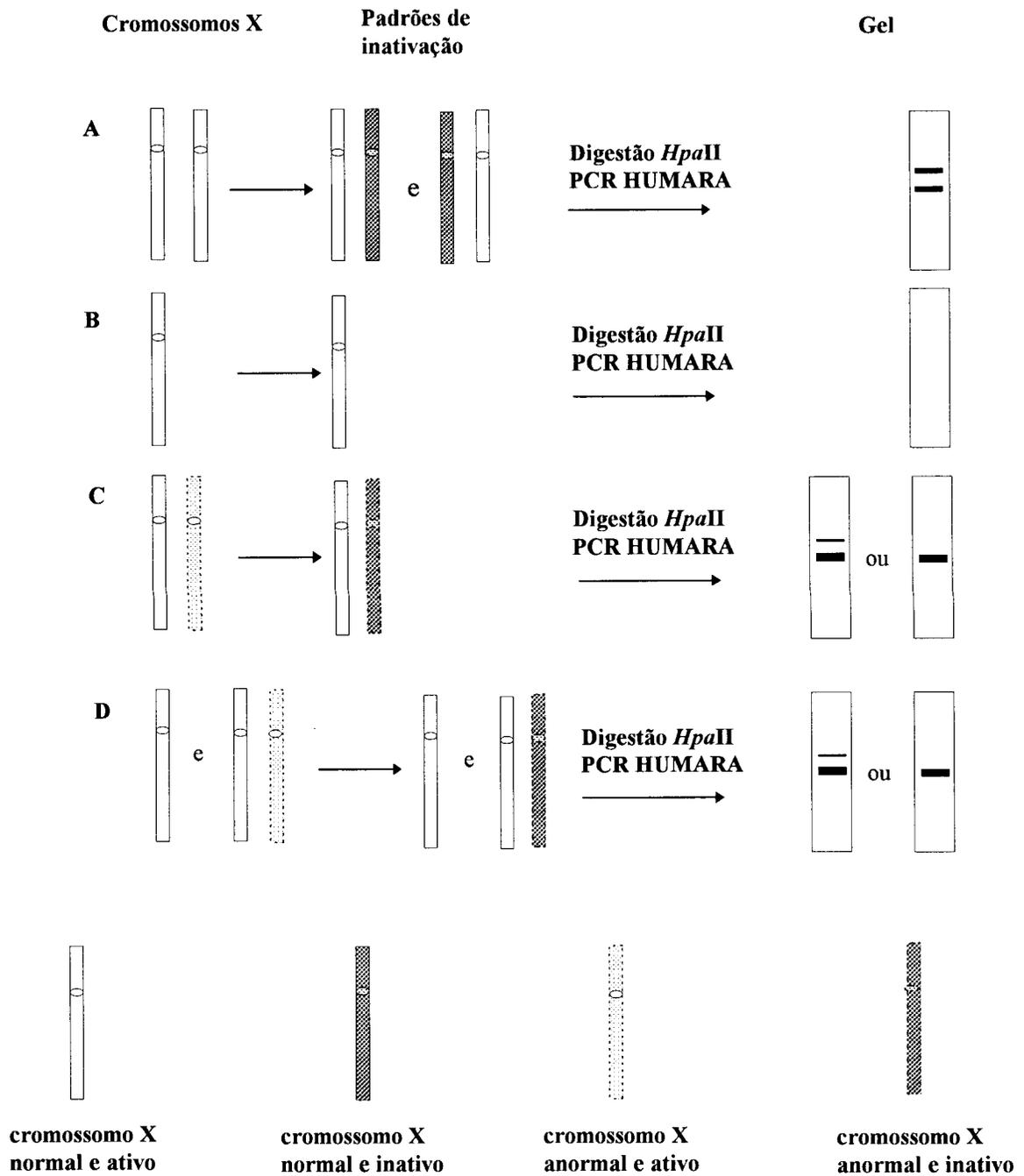


Figura 5: Esquema da amplificação do gene HUMARA após a digestão com a enzima *Hpa*II em: (A) mulher normal 46,XX; (B) mulher com síndrome de Turner 45,X ou homem 46,XY; (C) mulher com síndrome de Turner com 46 cromossomos, sendo um X anormal (marcador ou em anel); (D) mulher com síndrome de Turner e mosaicismo com uma linhagem 45,X e outra com 46 cromossomos, sendo um X anormal.

RESULTADOS

1. Disgenesia Gonadal Pura

1.1 Estudo do gene SRY

O gene SRY foi avaliado nas três mulheres com cariótipo 46,XY e diagnóstico de disgenesia gonadal pura. Para verificar-se a presença do gene o DNA das pacientes foi submetido a reação de polimerase em cadeia (PCR) com “primers” específicos para amplificação deste *loci* e todas tiveram resultado positivo (figura 6). Foi, então, realizado o seqüenciamento de parte deste gene, que permitiu a leitura da posição 564 até 840. Essa região inclui o domínio conservado “HMGbox”, que vai da posição 582 até 821.

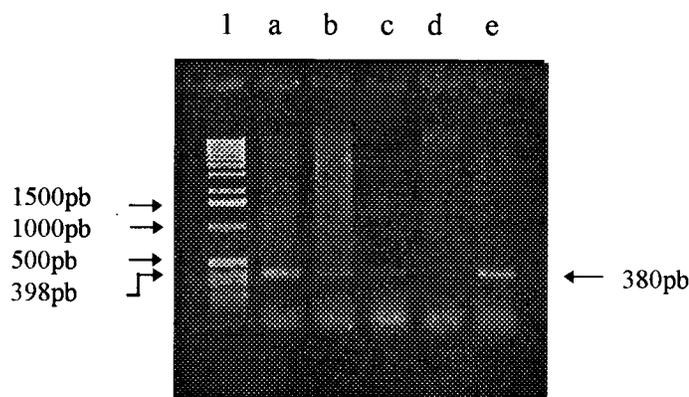


Figura 6: Produto da amplificação do domínio conservado do gene SRY observado em gel de agarose 2%. Nas canaletas: (1) marcador de peso molecular (1Kb ladder); (a),(b),(c) pacientes com disgenesia gonadal pura; (d) controle feminino normal; (e) controle masculino normal.

Duas pacientes (“a” e “c”) possuíam seqüência normal, idêntica à descrita na literatura (Sinclair *et al.*, 1990). Na outra paciente (“b”) foi detectada uma mutação de ponto (G→A) na posição 619, causando a alteração de um códon de triptofano para um códon de terminação, como pode ser visto na figura 7.

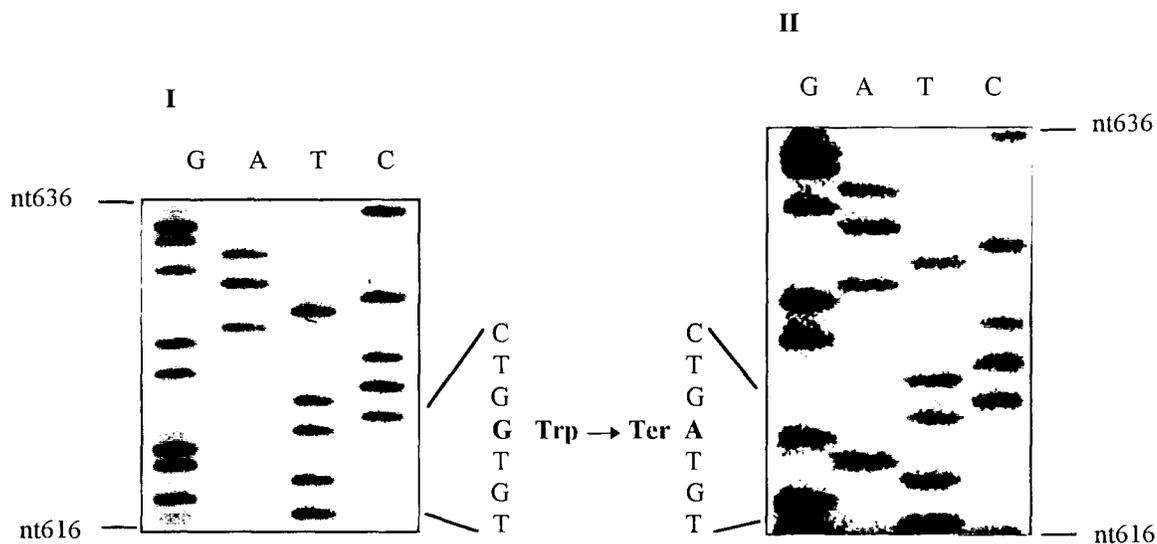


Figura 7: Análise por seqüenciamento direto do produto de PCR do gene SRY. **I** Parte do gene SRY do controle normal mostrando a região compreendida entre o nucleotídeo 616 (parte inferior) ao 636 (parte superior). **II** Mulher XY (paciente “b”). A seta inidica a alteração de um códon de triptofano para um códon de terminação causada pela transição de G para A na posição 619.

1.2 Amplificação de STS Y-específicos

Para avaliar a ocorrência de possíveis deleções no cromossomo Y das três pacientes XY foram estudados, por meio de PCR, oito *loci* situados no cromossomo Y, um na região centromérica (sY78), quatro no intervalo 5 do braço longo (Yq) (sY81, sY86, sY151, sY117) e, ainda, três no intervalo 6 (sY143, sY254, sY255). As pacientes tiveram amplificação positiva para todos os *loci* testados, como pode ser visto nas figuras 8, 9a e 9b e na Tabela 6.

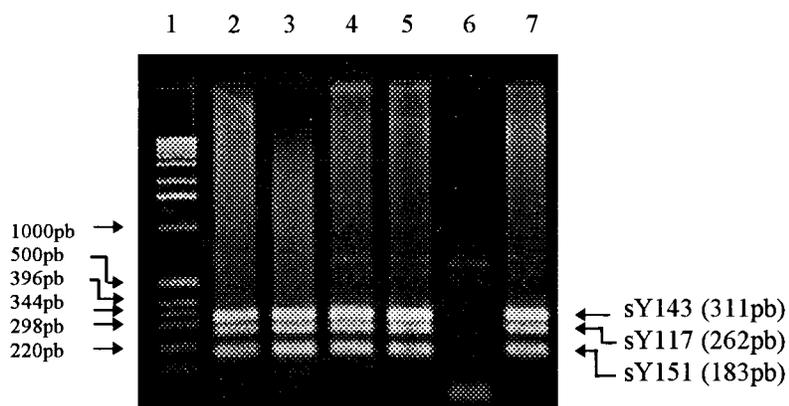


Figura 8: Produtos da amplificação por meio de PCR “multiplex” dos STS 151, 117 e 143 observados em gel de agarose 2%. Nas canaletas: (1) 1Kb ladder; (2) mulher XY; (3) paciente “a”; (4) paciente “b”; (5) paciente “c”; (6) controle feminino normal; (7) controle masculino normal.

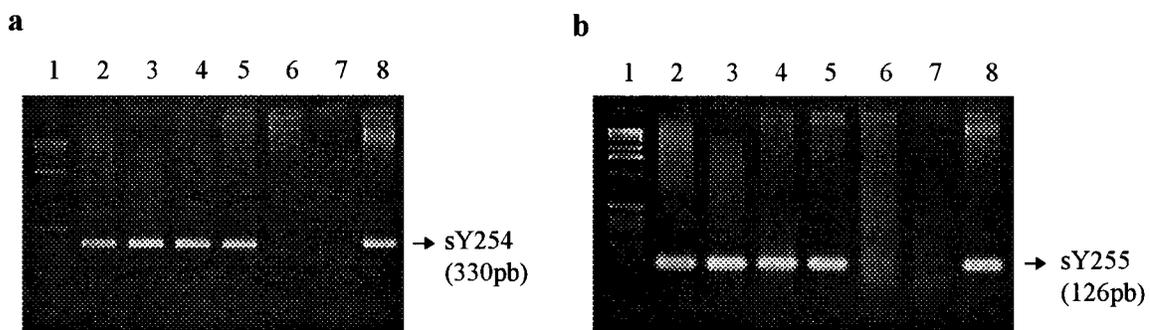


Figura 9: **a** - Produto de amplificação do STS 254 observado em gel de agarose 2%. **b** - Produto de amplificação do STS 255 observado em gel de agarose 2%. Nas canaletas: (1) 1Kb ladder; (2) mulher XY; (3) paciente “a”; (4) paciente “b”; (5) paciente “c”; (6) paciente com síndrome de Turner (número 9); (7) controle feminino normal; (8) controle masculino normal.

Tabela 6: Resultado da amplificação de STS Y-específicos em pacientes com disgenesia gonadal pura.

Paciente	cen	Yq intervalo 5				Yq intervalo 6		
	sY78	sY81	sY86	sY151	sY117	sY143	sY254	sY255
a	+	+	+	+	+	+	+	+
b	+	+	+	+	+	+	+	+
c	+	+	+	+	+	+	+	+

1.3 Hibridização com sondas Y-específicas

A sonda 50f2 reconhece diferentes fragmentos distribuídos ao longo do cromossomo Y, tornando-se uma ferramenta útil na investigação de possíveis deleções. Assim, procedeu-se a hibridização com esta sonda que detecta fragmentos localizados nos intervalos nos intervalos 3, 4B e 6 (sub-intervalo XII) do cromossomo Y. As pacientes apresentaram sinal positivo para todos os fragmentos, com exceção da paciente “a” na qual não houve hibridização com o fragmento 50f2C, como pode ser visto na Tabela 7 e na figura 10.

Tabela 7: Resultado das hibridizações com a sonda 50f2 em pacientes com disgenesia gonadal pura.

Paciente	50f2A	50f2B	50f2D	50f2E	50f2C
a	+	+	+	+	-
b	+	+	+	+	+
c	+	+	+	+	+

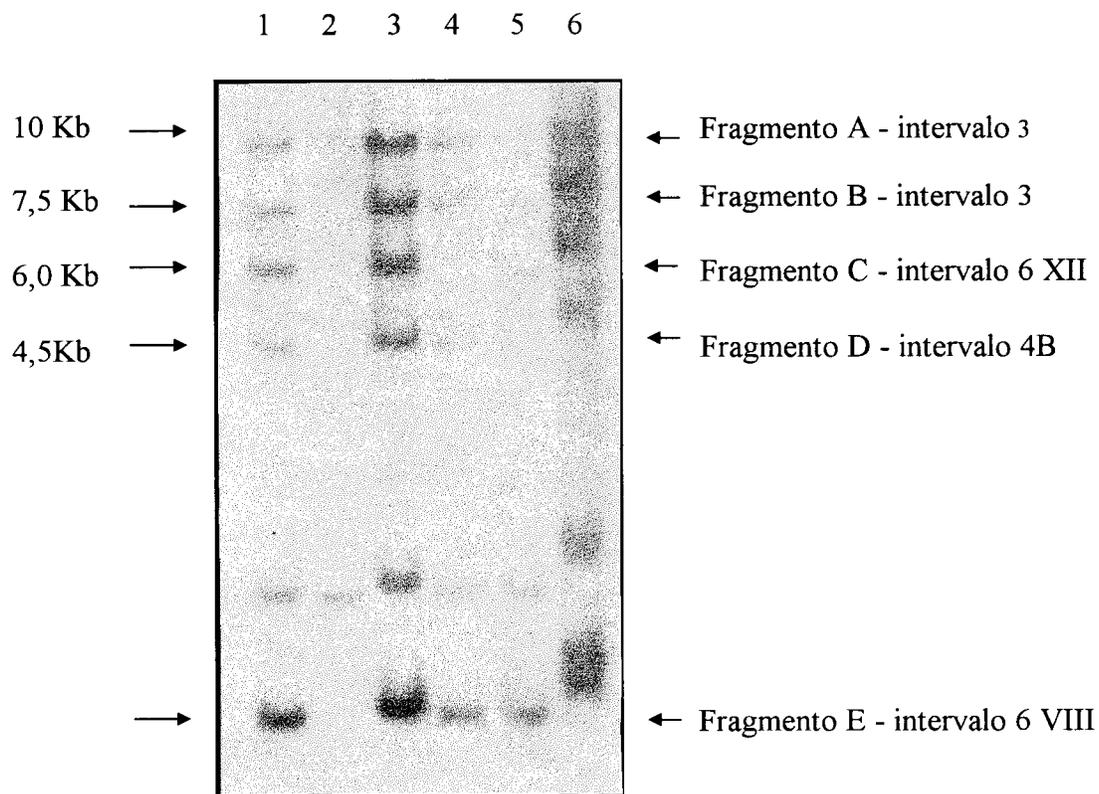


Figura 10: Autoradiografia do "blot" de DNA digerido com *EcoRI* e hibridizado com a sonda 50f2. Nas canaletas: (1) controle masculino normal; (2) controle feminino normal; (3) mulher 46,XY (paciente "b"); (4) mulher 46,XY (paciente "a"); (5) mulher 46,XY (não pertence à amostra do presente trabalho); (6) mulher 46,XY (paciente "c").

Para investigar a possibilidade de ocorrência de deleções nos cromossomos Y das pacientes 46,XY foram reunidos os resultados das ampliações com “primers” Y-específicos e das hibridizações com a sonda 50f2, sendo que as seqüências detectadas por ambos os métodos encontram-se alinhadas, de acordo com o intervalo e sub-intervalo detectado no cromossomo Y, na Tabela 8.

Tabela 8: resultado das ampliações e hibridizações com seqüências do cromossomo Y em pacientes com disgenesia gonadal pura

PAR	Y	“Primer”/Sonda	Intervalo do Y	Paciente			
				a	b	c	
1	SRY	SRY	1A1	+	+	+	
3	50f2A/B	50f2A/B	3	+	+	+	
4A	sY78	sY78	4A	+	+	+	
4B	50f2D	50f2D	4B	+	+	+	
5	sY81	sY81	5A	+	+	+	
	sY86	sY86	5C	+	+	+	
	STS151	sY151	5F	+	+	+	
6	SY117	sY117	5M*	+	+	+	
		50f2E	6VIII	+	+	+	
		sY143	6A	+	+	+	
		50f2E	50f2C	6XII	-	+	+
		sY143	sY254	6D	+	+	+
		50f2 C	sY255	6D	+	+	+
7	sY254 sY255	sY254 sY255	6D	+	+	+	

Nota:* a localização do sY 117 no intervalo 5 foi definida por Vollrath *et al.* (1992); outro trabalho, entretando, posiciona-o na porção proximal do intervalo 6 (Vogt *et al.*, 1996). A posição deste e de outros STS é relativa e ainda não pode ser determinada com exatidão.

2. Síndrome de Turner

2.1 Estudo do gene SRY

A presença do gene SRY foi avaliada em vinte e três pacientes com síndrome de Turner. Como já foi explicitado anteriormente (Tabela 2 da casuística), destas pacientes treze possuíam cariótipo 45,X, uma possuía apenas uma linhagem com 46 cromossomos (46,X,+mar) e nove eram mosaicos. Dentre aquelas que não apresentavam evidências de mosaicismo, nenhuma mostrou resultado positivo na amplificação do gene SRY. Das nove pacientes cujo cariótipo revelou mosaicismo, oito tiveram resultado negativo na amplificação deste gene.

A paciente com cariótipo 45,X/46,X,idic(Y) (número 9) mostrou amplificação positiva (figura 11). Uma vez comprovada a presença do SRY neste caso foi realizado o seqüenciamento de parte deste gene que inclui o domínio conservado “HMGbox”. A seqüência encontrada não continha mutações, sendo idêntica à descrita na literatura (Sinclair *et al.*, 1990).

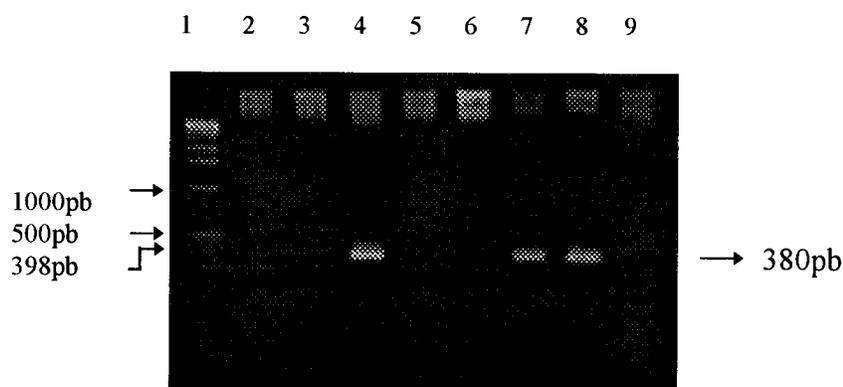


Figura 11: Produto de amplificação do gene SRY observado em gel de agarose 2%. Nas canaletas (1) 1Kb ladder; (2) e (3) pacientes com síndrome de Turner e cariótipo 45,X; (4) paciente Turner com cariótipo 45,X/46,X,idic(Y) (número 9); (5) paciente Turner com cariótipo 45,X/46,X,+mar; (6) homem 46,XX; (7) mulher 46,XY; (8) controle masculino normal; (9) controle feminino normal.

2.2 Amplificação de DYZ3 E TSPY

DYZ3 é uma seqüência repetida, presente no centrômero do cromossomo Y, e TSPY (proteína testículo específica codificada pelo Y) situa-se na região proximal do braço curto do cromossomo Y (Yp), próximo ao centrômero. As seqüências DYZ3 e TSPY foram estudadas através de “nested-PCR”. Como foi explicado no item “Materiais e Métodos”, essa técnica foi escolhida por ter-se mostrado bastante sensível e capaz de detectar mosaicismos em baixo grau, que passam despercebidos pela análise citogenética. Por isso todas as pacientes, mesmo aquelas que não apresentaram evidências citogenéticas da presença de marcadores, foram avaliadas.

Dentre as vinte e três pacientes apenas a que possuía cariótipo 45,X/46,X, idic(Y) teve resultado positivo na amplificação desses *loci*, tanto no primeiro quanto no segundo ciclo de amplificação (figuras 12 e 13, página 65).

2.3 Amplificação de STS Y-específicos

Para essa análise foram selecionados quatro STS localizados nas regiões onde o suposto *locus* GBY pode estar localizado. As pacientes foram avaliadas quanto à presença dos STS: 78, 81, 86, 151. O STS 78 localiza-se na região centromérica e os demais STS estão distribuídos ao longo do intervalo 5 no braço longo do cromossomo Y (Yq). Somente uma paciente, a número 9 [cariótipo 45,X/46,X, idic(Y)], teve amplificação positiva para esses *loci*.

Para investigar o ponto de quebra do cromossomo Y na formação do Y idicêntrico, o DNA desta paciente foi submetido à amplificação de outros quatro sítios, sendo um da porção distal do intervalo 5 (sY117) e os demais localizados ao longo do intervalo 6: sY143, sY254 e sY255. O resultado foi positivo para os *loci* sY117 e sY143 (figura 14, página 66) e negativo para sY254 e sY255 (figuras 9a e 9b, página 59).

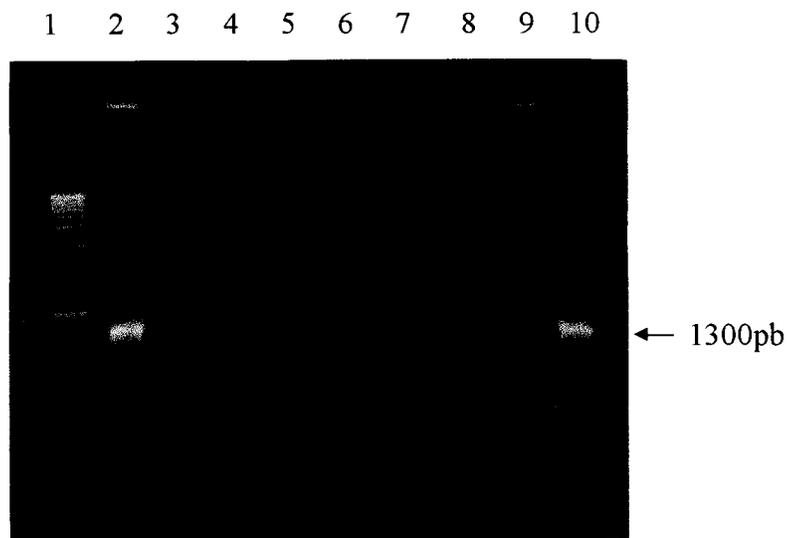


Figura 12: Produto da primeira etapa de amplificação da seqüência TSPY com os “primers” JA56 e JA52 observado em gel de agarose 1%. Nas canaletas: (1) 1Kb ladder; (2) paciente Turner com cariótipo 45,X/46,X, idic(Y); (3 a 5) pacientes Turner com cariótipo 45,X/46,X,+mar; (6 a 8) pacientes Turner com cariótipo 45,X; (9) controle feminino normal; (10) controle masculino normal.

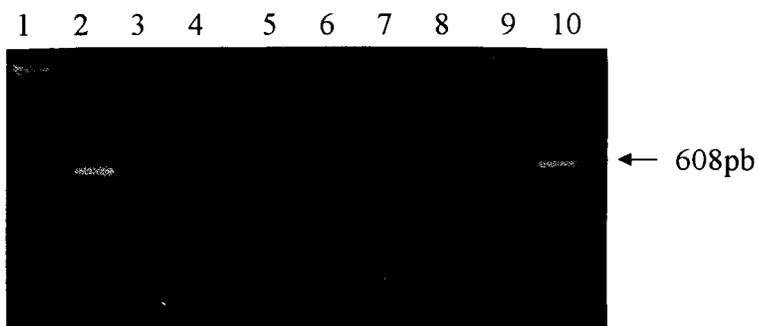


Figura 13: Produto da segunda etapa de amplificação da seqüência TSPY com os “primers” JA30 e JA35 observado em gel de agarose 2%. Nas canaletas: (1) 1Kb ladder; (2) paciente Turner com cariótipo 45,X/46,X, idic(Y); (3 a 5) pacientes Turner com cariótipo 45,X/46,X,+mar; (6 a 8) pacientes com Turner e cariótipo 45,X; (9) controle feminino normal; (10) controle masculino normal.

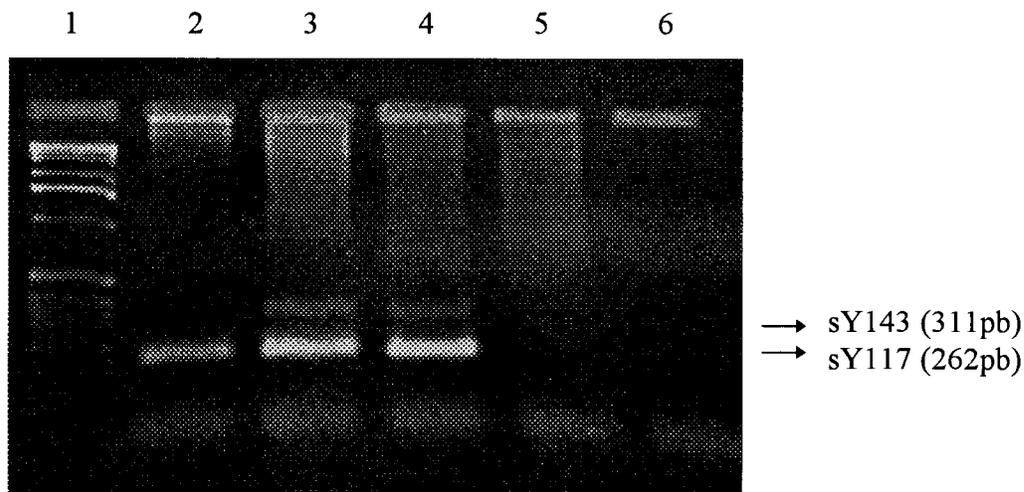


Figura 14: Produtos de amplificação dos STS 117 e 143 observado em gel de agarose 2%.

Nas canaletas: (1) 1Kb ladder; (2) hermafrodita verdadeiro 46,XY; (3) paciente com síndrome de Turner (número 9); controle masculino normal; (4) controle feminino normal; (5) reação sem DNA.

2.4 Hibridização com sondas Y-específicas

A hibridização com a sonda 50f2 que, como citado anteriormente, detecta fragmentos de diversos intervalos do braço longo de cromossomo Y (intervalos 3, 4B, 6-XII), foi utilizada nos casos de síndrome de Turner para se determinar a presença de partes do cromossomo Y nas pacientes. Os resultados obtidos condizem com aqueles encontrados na análise por PCR. Mais uma vez, dentre as pacientes estudadas somente a número 9 apresentou hibridização positiva, como pode ser observado na figura 15.

O resultado da hibridização, entretanto, mostrou a ausência de um dos fragmentos revelados por essa sonda - o fragmento de 6,0Kb do intervalo 6, sub-intervalo XII (figura 15).

Nos demais casos foram preparados “blots” com uma quantidade maior de DNA que a normalmente utilizada na tentativa de aumentar a sensibilidade do experimento no sentido de se detectar baixa porcentagem de Y. Os resultados obtidos foram idênticos aos dos “blots” preparados com menor quantidade de DNA, ou seja, com exceção da paciente número 9, em nenhum outro caso foi detectado mosaicismos de Y.

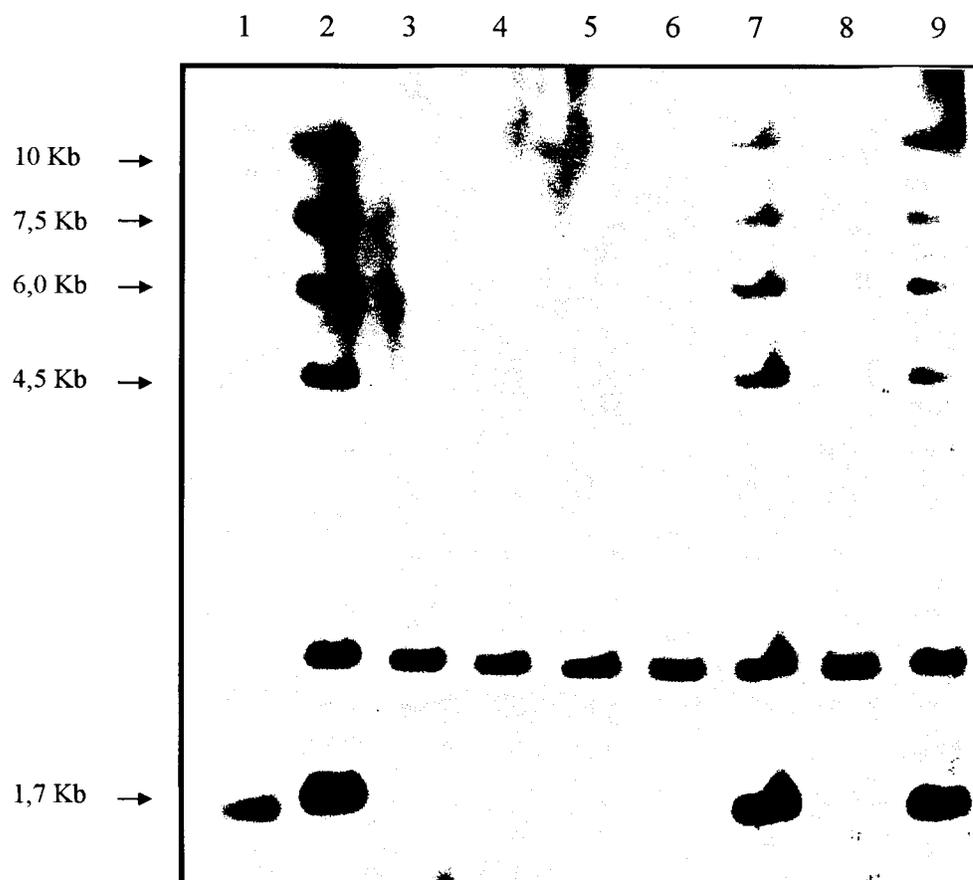


Figura 15: Autoradiografia de "blot" de DNA digerido com *EcoRI* e hibridizado com a sonda 50f2. Nas canaletas: (1) paciente 9 [cariótipo 45,X/46,X,idi(Y)]; (2) mulher 46,XY; (3,5) pacientes com síndrome de Turner e cariótipo 45,X/46,X,+mar; (4,6) pacientes com síndrome de Turner e cariótipo 45,X; (7,9) controles masculinos normais; (8) controle feminino normal.

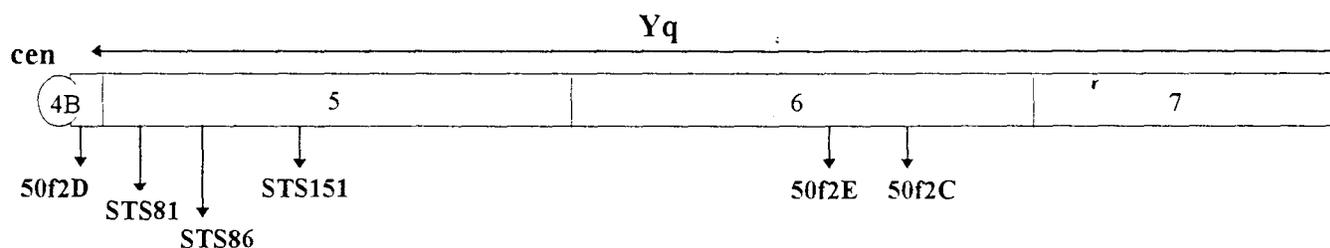
Todos os resultados obtidos através de ampliações com “primers” Y-específicos e hibridização com a sonda 50f2 nas pacientes com síndrome de Turner foram sistematizados e resumidos nas Tabelas 9 e 10. Pode-se observar que somente uma paciente (4,3% do total) possui uma linhagem que contém parte de um cromossomo Y.

Tabela 9: Resultado das hibridizações e ampliações de seqüências do braço curto do cromossomo Y em pacientes com síndrome de Turner.

Paciente	SRY	50f2A/B	TSPY		DYZ3		STS78
			52/56	30/35	A/B	G/H	
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	nt	nt	-

nt = teste não realizado

Tabela 10: Resultado das hibridizações e ampliações de seqüências do braço longo do cromossomo Y em pacientes com síndrome de Turner.



Paciente	50f2D	STS81	STS86	STS151	50f2E	50f2C
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	nt	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	nt	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	nt	-	-

nt = teste não realizado

A ausência de hibridização com o fragmento 50f2C de 6,0Kb na paciente 9 indicou uma possível deleção de parte do intervalo 6 de seu cromossomo derivado de Y.

Na tentativa de se determinar a porção deletada, foram utilizadas outras sondas que detectam fragmentos específicos do intervalo 6. Foram elas Y6BaH34, 49f e Y6BS65. A hibridização com a sonda Y6BaH34 foi positiva para o fragmento de 6,0Kb, mas negativa para o fragmento de 4,8Kb (figura 16). A hibridização com a sonda 49f foi negativa para o fragmento de 2,8 Kb (figura 18). A hibridização com a sonda Y6BS65 foi positiva apenas para o fragmento de 8,5 Kb (figura 17). Foi, ainda, realizada hibridização com a sonda específica para o gene ZFY (pDP1007). O resultado das hibridizações com sondas Y-específicas da paciente 9 se encontra resumido na Tabela 11.

Tabela 11: Análise por “Southern Blotting” da presença de seqüências de cromossomo Y na paciente 9 [cariótipo 45,X/46,X,idic(Y)].

Sonda	Fragmento detectado (Kb)	Intervalo e sub-intervalo	Hibridização
pdp1007	2,8	1A2	+
50f2	A 10.0	3	+
	B 7.5	3	+
	C 6.0	6 - XII	-
	D 4.5	4B	+
	E 1.7	6 - VIII	+
49f	2.8	6 - XIII	-
Y6BaH34	6,0	6 - VII	+
Y6BS65	A 17.0		- *
	B 14.5	6 - V	-
	C 8.5	6 - VII	+
	D 14.0	6 - XI	-
	E 11.0	6 - XIII	-

Nota: *O fragmento A de 17,0 Kb não pertence ao intervalo 6 e é polimórfico, não tendo sido observado nem mesmo no controle masculino normal (figura 17).

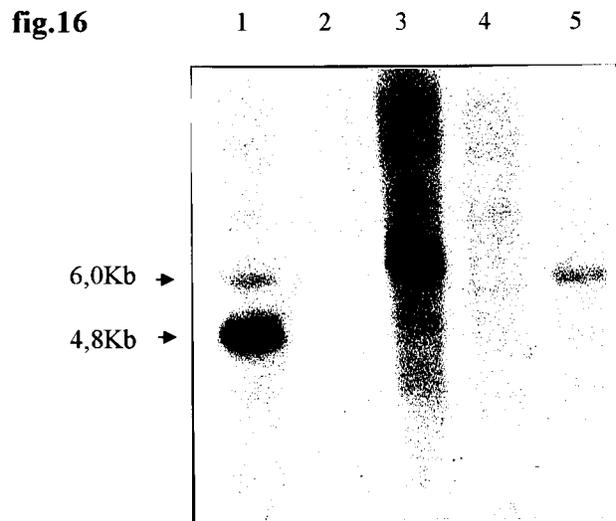


Figura 16: Autorradiografia de “blot” de DNA digerido com *Hind*III e hibridizado com a sonda Y6BaH34. Nas canaletas: (1) controle masculino normal; (2) controle feminino normal; (3) paciente 46,XY com atrofia testicular; (4) hermafrodita verdadeiro 46,XX; paciente 9 com síndrome de Turner e cariótipo 45,X/56,X,idic(Y).

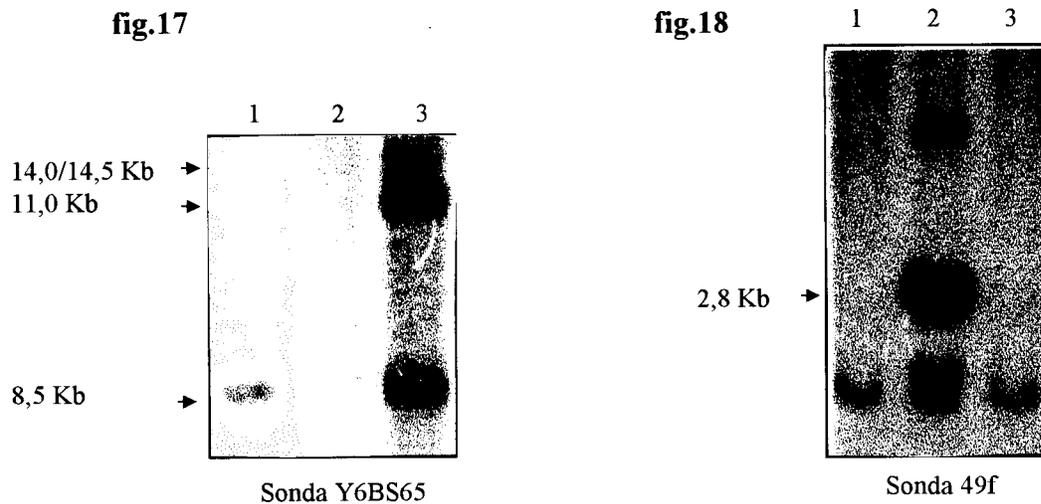


Figura 17: Autorradiografia de “blot” de DNA digerido com *Xba*I e hibridizado com a sonda Y6BS65. Nas canaletas: (1) paciente 9 [cariótipo 45,X/46,X,idic(Y)]; (2) controle feminino normal; (3) controle masculino normal.

Figura 18: Autorradiografia de “blot” de DNA digerido com *Eco*RI e hibridizado com a 49f. Nas canaletas: (1) paciente 9 [cariótipo 45,X/46,X,idic(Y)]; (2) controle masculino normal; (3) controle feminino normal.

Tabela 12: Resultado das hibridizações e amplificações da paciente com síndrome de Turner e cariótipo 45,X/46,X,idic(Y).

PAR	Y	Primer/Sonda	Intervalo do Y	Resultado
1	SRY	SRY	1A1	+
	ZFY	ZFY	1A2	+
2	50f2A/B	50f2A/B	3	+
	50f2A/B	TSPY	3	+
3	TSPY	DYZ3	4A	+
	DYZ3/STS 78	sY78	4A	+
4B	50f2D	50f2D	4B	+
	STS 81	sY81	5A	+
5	STS 86	sY86	5C	+
	STS151	sY151	5F	+
6	STS117	Y6BS65-B	6V	-
	Y6BS65-B	Y6BaH34	6VII	+
6	Y6BaH34	Y6BS65-C	6VII	+
	Y6BS65-C	50f2E	6VIII	+
6	50f2E	STY143	6A	+
	Y6BS65-D	sY143	6A	+
6	50f2 C	Y6BS65-D	6XI	-
	49f	50f2C	6XII	-
6	sY254 e sY255	49f	6XIII	-
	Y6BS65-E	sY254	6D	-
7		sY255	6D	-
		Y6BS65-E	6XIII	-

Nota: A posição relativa dos STS e fragmentos detectados pelas sondas utilizadas foi baseada no mapa fornecido por Vogt *et al.* (1996).

2.5 Amplificação do gene do receptor de andrógenos humano (HUMARA)

Ao todo, nove pacientes apresentavam evidências citogenéticas da presença de mosaïcismo. Uma delas possuía um marcador derivado de Y, uma possuía cariótipo 45,X/46,XX e as demais possuíam cromossomos em anel ou marcadores de origem não identificada. Dentre as portadoras de cromossomo em anel, suspeitava-se, em dois casos, que esses cromossomos seriam derivados de X. Havia, ainda, uma paciente com cariótipo 46,X,+mar cujo marcador não havia sido identificado.

Era bastante provável que a maior parte desses marcadores e anéis, se não todos eles, fossem derivados de um cromossomo X. Para investigar esta hipótese foi utilizada a técnica HUMARA em sete das oito pacientes em que o marcador não havia tido sua origem confirmada. Foi demonstrado que em dois casos de pacientes portadoras de cromossomos em anel (3 e 4) existia, de fato, mosaïcismo de X (Tabela 13).

Tabela 13: mosaïcismo de X em pacientes com síndrome de Turner portadoras cromossomos em anel ou marcadores

Paciente	Cariótipo	% de céls com mar ou r	Mosaïcismo de X
1	45,X/46,X,+r(?)	52	?
2	45,X,15p+/46,X,r(?),15p+	17,3	+
3	45,X/46,X,r(?)	62,5	+
4	45,X/46,X,r(?)	16	?
5	45,X/46,idic(X)/47,Xidic(X),+mar	1,8	?
6	45,X/46,X,+mar	3	nt
7	45,X/46,X,+mar	78,1	?
10	46,X,+mar	100	?

Notas: ? = nesses casos o resultado não permite afirmar que não há mosaïcismo de X.

nt = o teste não realizado pois havia DNA disponível desta paciente.

Na paciente 3 foram observadas duas bandas na amplificação do DNA digerido apenas com *RsaI*, mostrando claramente a presença de dois alelos distintos. Após a digestão com *HpaII* foi observada apenas uma banda, o que indica a inativação preferencial de um dos alelos. Interessantemente, a banda observada correspondia a um tamanho ligeiramente menor que aquela obtida na digestão com *RsaI* (figura 19).

Na paciente 4 observou-se a presença de uma só banda na amplificação do DNA digerido apenas com *RsaI*. Entretanto, quando foi realizada amplificação do DNA digerido com *HpaII*, obteve-se uma banda de tamanho diferente. Este resultado indica que a paciente tem dois alelos HUMARA, porém um deles é preferencialmente inativado e deve ocorrer em baixa frequência pois não apareceu na amplificação inicial, sem digestão com *HpaII* (figura 19).

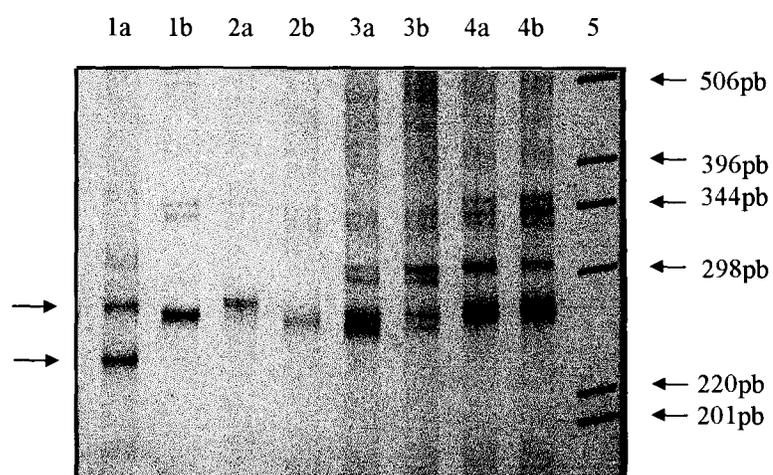


Figura 19: Produtos da segunda etapa de amplificação do gene HUMARA a partir de DNA digerido com *RsaI* (a) e *RsaI+HpaII* (b) em: (1) - paciente número 3, cariótipo 45,X/46,X,r(?); (2) - paciente número 4, cariótipo 45,X/46,X,r(?); (3) controle feminino normal; (4) - controle masculino normal. (5) - 1Kb ladder.

DISCUSSÃO

Parte I : Disgenesia Gonadal Pura 46XY

Este trabalho incluiu a análise da seqüência do gene SRY em três pacientes com disgenesia gonadal pura 46XY. Dada a raridade de mutações encontradas fora do domínio conservado do gene, apenas essa região foi avaliada. Das três, apenas uma apresentou mutação no domínio conservado do gene SRY. Embora mutações nesse gene em pacientes com disgenesia gonadal pura não sejam muito freqüentes, a mesma mutação já havia sido descrita por Hawkins *et al.* (1992b).

A mutação detectada (G→A, posição 619) altera um códon de triptofano (códon 70) gerando um códon de terminação. Provavelmente esse códon de terminação precoce faz com que se forme um polipeptídeo truncado, que não é capaz de exercer a função esperada, o que explica o fenótipo da paciente. Pelas características da mutação pode-se inferir que esta seja uma mutação *de novo*, entretanto isto não pôde ser verificado pois não foi possível coletar amostra do pai da paciente.

Com base nesses resultados, a freqüência de mutação no gene SRY encontrada no presente trabalho foi de 1/3. A freqüência descrita na literatura é variável, mas, em geral, encontra-se entre 5 e 20% (Jager *et al.*, 1990; Jager *et al.*, 1991, Pivnick *et al.*, 1991; Hawkins *et al.*, 1992; McElreavey *et al.*, 1992b; Affara *et al.*, 1993; Schimitt-Ney, 1995; Veitia *et al.*; 1997; Poulat *et al.*, 1997). A freqüência de 1/3 é relativamente alta quando comparada à média de vários trabalhos, que fica em torno de 12%. Essa discrepância deve-se, provavelmente, ao pequeno número de casos analisados. Além disso, no cálculo da freqüência neste trabalho, ao contrário de algumas das outras pesquisas citadas, não foram incluídas pacientes com disgenesia gonadal parcial. Segundo Hawkins *et al.* (1992a) existe uma prevalência maior de mutações no SRY em mulheres com disgenesia gonadal pura que em mulheres com disgenesia gonadal parcial, e em alguns trabalhos da literatura a distinção entre essas duas anomalias nem sempre é levada em conta.

Além do gene SRY, as demais seqüências estudadas por PCR tiveram amplificação positiva em todas as pacientes, o que indicou a ausência de deleções nas regiões do cromossomo Y detectadas pelos marcadores utilizados.

A hibridização com a sonda 50f2 (figura 10) que detecta fragmentos de diferentes intervalos do cromossomo Y foi positiva nas três pacientes. No caso da paciente “c” o tamanho das bandas obtidas não corresponde exatamente aos padrões, possivelmente devido à degradação do DNA da mesma; pôde-se observar, entretanto, que todos os fragmentos estavam presentes. Esse resultado terá de ser confirmado por outro “Southern-blot” assim que for possível coletar novamente material dessa paciente. Na paciente “a”, contudo, não foi observada a hibridização com o fragmento 50f2C de 6,0Kb, específico do intervalo 6, sub-intervalo XII de Yq. A princípio esse resultado seria indicativo de uma deleção. O fragmento 50f2C, no entanto, é polimórfico e às vezes encontra-se ausente mesmo em homens normais (Jobling *et al.*, 1996).

Embora a investigação da ocorrência de um polimorfismo não tenha sido possível pela não disponibilidade do material derivado do pai, pode-se inferir que no caso da paciente “a” a ausência de 50f2C realmente se deva ao polimorfismo e não a uma deleção no intervalo 6. Isso porque a amplificação positiva dos *loci* sY143, sY254 e sY255 confirmou a presença tanto da parte proximal quanto da parte distal do intervalo 6 no cromossomo Y em questão. É possível, ainda, que ocorra uma pequena deleção que inclui a região detectada por 50f2C, região essa situada entre os *loci* sY143 e sY254, os quais apresentam uma distância consideravelmente grande entre si. Assim, a presença de seqüências intermediárias terá de ser avaliada com o uso de outras sondas e também outros STS que ainda não estão disponíveis. Além disso, será necessário ainda tentar estudar o cromossomo Y do pai da paciente.

Quanto à ausência de mutação no domínio conservado do SRY das pacientes “a” e “c”, apesar de apresentarem reversão sexual, várias hipóteses devem ser consideradas.

Em primeiro lugar, não foi realizada a amplificação do gene SRY a partir de tecido obtido em biópsia gonadal. Dessa forma, não se pode excluir totalmente a possibilidade de ocorrência de mutação pós-zigótica levando à coexistência do alelo selvagem e do alelo mutante nas células gonadais.

Deve-se pensar, também, na possibilidade de existirem mutações na porção não conservada do SRY, que não foi avaliada no presente trabalho. Apesar de serem pouco frequentes (Shimitt-Ney *et al.*, 1995; Kwok *et al.*, 1996), mutações desse tipo já foram descritas em pacientes com disgenesia gonadal pura. Tajima *et al.* (1994) relataram uma mutação que gera um códon de terminação na direção 3' do "HMGbox" em duas irmãs com reversão sexual. Veitia *et al.* (1997) encontraram uma mutação de códon de terminação na direção 5' do "HMGbox" em uma mulher 46,XY.

Além disso, deve-se aventar a ocorrência de mutações em elementos regulatórios do gene SRY. McElreavey *et al.* (1992) descreveram uma mulher 46,XY na qual a seqüência do SRY estava intacta mas cujo cromossomo Y apresentava uma deleção que tinha início em 1,7Kb na direção 5' do primeiro códon do quadro de leitura aberta do SRY e se estendia por mais 25 a 50Kb nessa direção. A deleção remove uma ilha CpG de 700pb e é possível, apesar de especulativo, que a perda dessa ilha cause reversão sexual, uma vez que a presença de ilhas CpG tem sido relacionada com elementos regulatórios da transcrição gênica (Behlke *et al.*, 1993). Poulat *et al.* (1997) descreveram uma paciente cuja seqüência do SRY também era normal mas que apresentava uma transição de G para A localizada 75 bases antes do códon de início de transcrição. Assim, esses trabalhos abrem precedentes para se considerar que algumas mulheres XY cuja seqüência codificante do gene SRY seja normal tenham mutações pontuais ou microdeleções nos elementos que são essenciais para a expressão deste gene.

Há ainda outras alternativas para explicar a ocorrência de mulheres 46,XY sem mutações no gene SRY. Deve-se considerar a possibilidade de existirem mutações nas seqüências às quais a proteína codificada pelo gene SRY se liga; mutações em outros

genes participantes da via de determinação sexual, e mutações que atuam indiretamente prejudicando o desenvolvimento do embrião e, conseqüentemente, o tempo de expressão do gene SRY. Podem ocorrer, ainda, mutações pós-transcricionais que tornem a proteína inativa.

A ausência de grande especificidade na ligação do SRY tem dificultado a identificação dos genes que são regulados por esta proteína. Assim, outra abordagem tem sido empregada na identificação dos genes da cascata de determinação sexual: a busca de *loci* envolvidos com síndromes nas quais ocorre reversão sexual.

Alguns *loci* autossômicos envolvidos em reversão do sexo já foram identificados, tais como o gene WT1 (“Wilm’s Tumor”) e o gene SOX 9, o qual codifica uma proteína do grupo de alta mobilidade que tem homologia com SRY. Cada um dos produtos destes genes possui um domínio de ligação ao DNA e um suposto domínio de interação proteína-proteína, sugerindo que estas proteínas tenham função de regular a transcrição gênica. Mutações em WT1 e SOX9 dão origem a doenças que afetam outros sistemas além do genital, indicando um papel precoce dos mesmos na diferenciação embrionária (Werner *et al.*, 1996).

O gene WT1 localiza-se no cromossomo 11. Mutações neste gene levam à síndrome de Denys-Drash, caracterizada por câncer renal infantil (tumor de Wilms), nefropatia glomerular e graus variados de anormalidades do desenvolvimento gonadal (Werner *et al.*, 1996).

Nordenskjöld *et al.* (1995) estudaram 27 casos de mulheres XY com SRY normais e não encontraram mutações no gene WT1 destas pacientes. Concluiu-se, então, que o gene WT1, apesar de sua importância no início do desenvolvimento genital, não seria a causa frequente de disgenesia gonadal isolada.

O gene SOX9 foi localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q) e está relacionado com Displasia Campomélica (CMPD1), onde os pacientes com cariótipo XY são fenotipicamente femininos e apresentam graves anomalias esqueléticas (Wagner *et al.*, 1994).

Após o estudo do gene SOX9 em 18 mulheres com disgenesia gonadal pura e SRY intacto, Meyer *et al.* (1997) não observaram alterações, o que indica que mutações em SOX9 não são freqüentes em pacientes com reversão sexual que não apresentem mal formações esqueléticas. Assim, a reversão sexual devido a mutações em SOX9 parece estar sempre associada à Displasia Campomélica.

O gene SF-1 (fator estereoidogênico 1) também foi relacionado à determinação sexual. A ausência de expressão deste gene em camundongos leva à não formação das glândulas adrenais e das gônadas (Luo *et al.*, 1994). Isto leva a crer que SF-1 exerça uma função essencial para a formação das gônadas que provavelmente antecede a ação do gene SRY. Tanto os genes WT1, SOX9 e SF-1, quando mutados, causam alterações que geram, além de reversão sexual, outras anomalias somáticas. Dessa forma é pouco provável que as pacientes “a” e “c”, que não apresentam outras anormalidades que não a disgenesia gonadal e a reversão sexual, tenham mutações em tais genes. Mesmo assim, esta hipótese não pode ser descartada.

Além desses genes, existem regiões de cromossomos autossômicos envolvidas com a reversão sexual. Deleções em heterozigose nos segmentos distais de 9p e 10q podem causar reversão sexual completa ou parcial em mulheres 46,XY (Bennet *et al.*, 1993; Wilkie *et al.*; 1993). Recentemente foi identificado um gene (DMT1) localizado em 9p24.3 que tem homologia com genes de determinação sexual de *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (Raymond *et al.*, 1998). Mutações neste gene em mulheres XY ainda não foram publicadas, mas é possível que DMT1 tenha participação na via de determinação sexual em mamíferos.

Concomitantemente aos estudos que revelaram a existência de genes autossômicos relacionados com a diferenciação sexual, foi observado que um *locus* no braço curto do cromossomo X está associado à reversão sexual. Duplicações de Xp21.3 em alguns indivíduos resultam na inibição da determinação testicular (Bardoni *et al.*, 1993). Os indivíduos afetados possuem fenótipo feminino e disgenesia gonadal pura ou parcial. A porção crítica de Xp21.3 responsável pela reversão do sexo foi definida como uma região de 160 Kb imediatamente distal aos *loci* da glicerol quinase e de distrofia muscular de Duchenne (Bardoni *et al.*, 1993). Tal *locus* foi denominado “sexo reverso sensível à dosagem” (DSS) e seu papel na determinação sexual não foi, ainda, totalmente esclarecido.

Na tentativa de comprovar o efeito do aumento da dosagem desse *locus* na reversão sexual, Veitia *et al.* (1997) procuraram duplicações na região Xp21.3 em 20 pacientes com disgenesia gonadal pura ou parcial. Nenhuma paciente apresentou evidência de duplicação. Porém, pequenas duplicações poderiam não ter sido detectadas devido à metodologia utilizada.

Dando complexidade ainda maior ao processo de diferenciação sexual, foi encontrado um gene ligado ao X mapeado no intervalo crítico Xp21, denominado DAX-1, que parece estar envolvido neste processo. Mutações neste gene são responsáveis pela hipoplasia adrenal congênita (AHC) ligada ao X (Muscatelli *et al.*, 1994). Análises de mutações em DAX-1 em pacientes com AHC ligada ao X demonstraram que o distúrbio funcional deste gene resulta numa condição conhecida como hipogonadismo hipogonadotrófico (HHG), caracterizada pela ausência de maturação sexual na puberdade. Tal fato leva a crer que DAX-1 pode ser responsável pela reversão sexual sensível à dosagem associada ao *locus* DSS em Xp21. Deve-se considerar, porém, que existem outros genes a serem estudados nesse intervalo (Muscatelli *et al.*, 1994; Capel, 1995; Werner *et al.*, 1996).

A prova de que DAX-1 tem relação direta com a determinação sexual surgiu recentemente com o trabalho de Swain *et al.* (1998). Foi demonstrado que camundongos XY transgênicos portadores de cópias extras de gene Dax-1 têm o seu desenvolvimento testicular atrasado quando o gene se expressa em altos níveis mas não sofrem reversão sexual. Entretanto, quando o gene é testado contra cópias alelos “fracos” do gene SRY, estes camundongos sofrem reversão sexual completa. Tais resultados mostram que DAX-1 é em grande parte responsável, ou mesmo o único responsável, pelo sexo reverso sensível à dosagem.

DAX-1 codifica um receptor nuclear de hormônios semelhante ao fator 1 da estereoidogênese (SF1). A diferenciação sexual masculina requer a produção do hormônio anti Mülleriano (HAM) pelas células de Sertoli. Provavelmente, nas células de Sertoli primordiais o fator estereoidogênico SF1 regula o gene HAM, ligando-se a elementos regulatórios conservados desse gene. A expressão de SF-1 coincide com a de HAM e com a regressão dos ductos Müllerianos (Shen *et al.*, 1994; Werner *et al.* 1996).

Uma outra explicação para os casos de reversão sexual nos quais não se encontram mutações no SRY baseia-se na hipótese desenvolvida por McElreavey *et al.* (1993), que revisaram casos de indivíduos XX apresentando características masculinas, e observaram a recorrência familiar desses casos. Para explicar esse fenômeno, foi proposta a existência de um regulador negativo de diferenciação sexual masculina (que foi denominado “Z”). Este regulador seria funcional nas fêmeas normais. Nos homens o SRY produziria um repressor de “Z”, o que permitiria a determinação sexual masculina. Mutações em “Z” levariam à reversão sexual. O mesmo processo poderia explicar a ocorrência de mulheres XY com SRY intacto. Algumas destas mulheres poderiam ter mutações em “Z”, o que as tornaria insensíveis à ação do SRY. Entretanto, este modelo é apenas hipotético e não foi ainda comprovado.

Apesar de novos genes pertencentes às vias da determinação e diferenciação sexuais terem sido descobertos e estarem sendo exaustivamente estudados, deve-se

ressaltar que nem todas as mutações que causam sexo-reverso afetam genes envolvidos nestas vias. Segundo Burgoyne & Palmer (1991), algumas dessas mutações podem ter uma ação indireta que causa atraso no desenvolvimento embrionário e prejudica o tempo de expressão do SRY em relação à determinação ovariana. Isto seria aplicado especialmente aos casos em que a presença de outras malformações indicassem que houve uma perturbação severa no desenvolvimento da criança, o que não ocorre com as pacientes “a” e “c”.

Mediante a complexidade do processo, ao número de genes envolvidos na determinação sexual e ao pouco conhecimento a respeito da interação destes genes entre si, torna-se difícil determinar quais *loci* devem ser estudados em mulheres 46,XY nas quais não se encontrou mutações no gene SRY. Pode-se inferir que, já que estas pacientes apresentam reversão mas não possuem disfunções somáticas severas, a via de formação testicular deve ter sido bloqueada numa etapa bem próxima à ação do SRY ou diretamente ligada a este gene. A primeira providência a ser tomada deve ser o estudo das gônadas destas pacientes para se certificar de que não há mosaicismo com um alelo mutado de SRY neste tecido. Caso tais mutações não sejam encontradas, torna-se necessário o estudo de mutações em outros genes, como por exemplo o DAX-1, cuja função foi recentemente descoberta e está diretamente relacionada ao gene SRY. Além disso, seria interessante estudar a expressão dos alelos SRY dessas pacientes e verificar a função de ligação ao DNA das proteínas produzidas.

O avanço na pesquisa nessa área tem gerado novos conhecimentos a cada dia, em breve outros genes serão relacionados ao processo de determinação sexual. O estudo de DAX-1 e de outros genes pode vir a resolver questões importantes sobre o fenômeno da determinação sexual, além de fornecer um modelo para o controle do desenvolvimento em mamíferos.

Parte II : síndrome de Turner

Para avaliação de seqüências do cromossomo Y em pacientes com síndrome de Turner no presente trabalho foram utilizadas as técnicas de “Southern blotting”, PCR e “nested-PCR”. Foram investigados através das técnicas citadas todos os intervalos relevantes. Como citado anteriormente, as porções críticas - centrômero (DYZ3) e parte proximal do braço curto do cromossomo Y (TSPY) foram estudadas por um método extremamente sensível - o “nested-PCR”. A porção centromérica foi considerada crítica pois o mapeamento de cromossomos Y com deleções mostrou que são raros os casos em que o centrômero não está presente (Page, 1994). Em cromossomos marcadores derivados de Y, seqüências localizadas na parte distal de Yp ou Yq podem ser perdidas, mas a região centromérica é normalmente mantida (Held, 1993). O estudo de TSPY também é de extrema relevância, uma vez que sua localização coincide com a região crítica do *locus* do gonadoblastoma no Y (Tsuchiya *et al.*, 1995).

Para a amplificação por “nested-PCR” dos *locus* DYZ3 e TSPY foi utilizado o método descrito por Binder *et al.* (1995), que haviam demonstrado a alta sensibilidade do mesmo. Nesse trabalho as seqüências do cromossomo Y puderam ser detectadas numa mistura de DNA masculino com DNA feminino na diluição de 1:1.000.000. Esses autores observaram, também, que havia um limite de ciclos de amplificação do “nested-PCR” para essas seqüências. Quando mais de 18 ciclos de amplificação eram usados, apareciam bandas fracas do tamanho esperado nas mulheres normais.

Para evitar resultados falso-positivos foram tomadas todas as precauções possíveis: as reações (incluindo a extração de DNA) foram realizadas por mulheres; na segunda etapa do PCR foram utilizados apenas quinze ciclos de amplificação; o local de realização do PCR e o de manipulação dos produtos obtidos eram separados. Além disso, nas reações de “nested” foi utilizado não só o controle feminino normal mas também um tubo sem DNA para garantir a ausência de contaminação.

Este estudo envolveu vinte e três pacientes com síndrome de Turner e com características cariotípicas diferentes (Tabela 2). Observou-se que apenas a paciente com cariótipo 45,X/46,X,idi(Y) apresentou resultado positivo para a análise molecular de cromossomo Y. Assim, a frequência de mosaïcismo de Y encontrada, considerando-se o grupo como um todo, foi de 4,3%. Entretanto, considerando-se apenas as pacientes portadoras de cromossomos em anel ou marcadores a frequência sobe para 10%. Se forem avaliadas somente aquelas pacientes com evidências citogenéticas da presença de mais de uma linhagem celular, a frequência de mosaïcismo de Y passa para 12,5%.

Os dados da literatura indicam que a frequência de mosaïcismo de Y em mulheres com síndrome de Turner é extremamente variável e depende da amostragem e das técnicas utilizadas para a detecção deste (Held *et al.*, 1992; Medlej *et al.*, 1992; Nagafuchi *et al.*, 1992; Kocova *et al.*, 1993; Witt *et al.*, 1993; Kutnetzova *et al.*, 1995; Binder *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1996; Patsalis *et al.*, 1997; Yorifuji *et al.*, 1997).

Um ponto que deve ser discutido é que existe a possibilidade, ainda que remota, de ter-se obtido resultado falso-negativo nessa análise. Seria interessante utilizar um par de “primers” que amplificasse um gene autossômico ou ligado ao X como um controle interno para verificar a qualidade do DNA a ser amplificado e garantir o funcionamento da reação. Mesmo a utilização de controles internos não excluiria completamente a chance de ocorrer um resultado falso-negativo devido à diferença na cinética de reação dos diferentes “primers”. Contudo todas as pacientes tiveram amplificação positiva para o gene do receptor de andrógenos humano localizado no cromossomo X em reações à parte (resultado não apresentado). Assim, a boa qualidade do DNA foi comprovada.

Porém, ainda que se considere que alguma reação não tenha ocorrido adequadamente, a probabilidade de ocorrência de um resultado falso-negativo é mínima,

tendo em vista que sete *loci* foram estudados por PCR (sendo dois por “nested-PCR”), e que foram realizadas hibridizações com a sonda 50f2, que detecta fragmentos de vários intervalos de Y, além de um fragmento controle que não é Y-específico.

Dentre todas as mulheres avaliadas, apenas a paciente 9 teve resultado positivo para os *loci* estudados por PCR e por “Southern blotting”. O estudo citogenético desta paciente havia revelado inicialmente a presença de mosaicismo constituído por uma linhagem 45,X e outra 46,X,+mar. Análises de hibridização *in situ* (FISH) mostraram que este marcador era derivado de Y e apresentava dois centrômeros (Hackel, C., comunicação pessoal). Com a utilização da sonda 50f2 foi observada a ausência de hibridização com o fragmento 50f2C de 6,0Kb pertencente ao intervalo 6, sub-intervalo XII do cromossomo Y.

A ausência de hibridização com esse fragmento poderia levantar duas hipóteses: a deleção da porção distal do braço longo do cromossomo Y da paciente ou ocorrência de um polimorfismo, tendo em vista que o fragmento 50f2C é polimórfico e encontra-se ausente em cerca de 6% da população de homens normais (Jobling *et al.*, 1996).

A possibilidade de ser um polimorfismo não pôde ser comprovada já que o material proveniente do pai da paciente não se encontrava disponível. Para confirmar a hipótese de deleção foi realizada a amplificação por PCR de um STS localizado na porção distal do intervalo 5 (sY117) e três STS do intervalo 6 (sY143, sY254, sY255). As reações de PCR foram positivas para os *loci* sY117 e sY143 e negativas para os *loci* sY254 e sY255, indicando que realmente há uma deleção da porção distal do braço longo desse cromossomo.

Para mapear a deleção foram utilizadas sondas específicas para o intervalo 6. A hibridização foi positiva para o fragmento de 6,0Kb revelado pela sonda Y6BaH34. Contudo um fragmento de cerca de 4,8Kb também revelado por esta sonda, cuja posição no cromossomo Y não é conhecida, teve hibridização negativa. A julgar pela alta

intensidade deste fragmento, comparada à intensidade do outro fragmento observado, é possível que ele pertença à região heterocromática (intervalo 7) ou ainda à porção distal do intervalo 6, e que por isso o resultado tenha sido negativo (figura 16, página 72).

A hibridização foi positiva para o fragmento C da sonda Y6BS65. Não ocorreu hibridização com a sonda 49f e os fragmentos A, B, C e E da sonda Y6BS65. O fragmento A de 17,0Kb é polimórfico, não tendo sido observado nem mesmo no controle masculino normal (figura 17, página 72).

Reunindo-se esses resultados para análise (tabela 12, página 73), observa-se que o cromossomo em questão possui uma deleção da parte distal do braço longo cujo ponto de quebra está localizado entre os *loci* sY143 e a região definida pelo fragmento D da sonda Y6BS65-D. É inesperado o resultado negativo obtido com o fragmento B da sonda Y6BS65. É possível que a banda correspondente não tenha sido identificada no “Southern-blot” devido à qualidade da hibridização ou, ainda, devido à deleção dessa região durante o rearranjo sofrido por esse marcador.

Com a utilização de STS e sondas Y-específicas foi possível definir a extensão da deleção. Ficou demonstrado que seqüências do braço curto, centrômero e porção proximal do braço longo estavam presentes no marcador. A presença da região centromérica e pericentromérica do cromossomo Y implica no risco de desenvolvimento de gonadoblastoma, o que justificou a gonadectomia preventiva sofrida pela paciente.

O estudo citogenético convencional associado às técnicas de FISH e PCR mostrou que o marcador é um Y não fluorescente isodicêntrico [idic(Yp)]. Cromossomos Yp isodicêntricos são aqueles nos quais estão presentes dois centrômeros, dois braços curtos completos e duas partes simétricas e incompletas do braço longo. A maior parte dos casos relatados têm ponto de quebra em Yq11, próximos à região fluorescente heterocromática (Hsu, 1994). Tal descrição corresponde à encontrada no caso da paciente 9.

Nesses casos, geralmente um dos centrômeros é inativado, o que permite a segregação normal destes marcadores. Eles ocorrem na grande maioria dos casos em mosaicismo com uma linhagem 45,X. O mosaicismo freqüente se deve à natureza instável do cromossomo idicêntrico (Fernández *et al.*, 1996).

Em casos de mosaicismo de Y poder-se-ia prever a ocorrência de virilização, mas esta não é a regra para pacientes com síndrome de Turner. Cariótipos 45,X/46,XY podem estar associados a uma gama de diferentes fenótipos, desde homens normais a mulheres com síndrome de Turner. Existe a hipótese de que os vários fenótipos seriam causados por diferentes distribuições e quantidades de células Y-positivas na ocasião da diferenciação gonadal¹(Grumbach, 1969).

O fato é que, na presença de uma linhagem 45,X, independentemente da outra linhagem conter Yp, Yq ou ambos, há uma grande chance de o indivíduo ser uma mulher com características da síndrome de Turner ou com genitália externa ambígua (Hsu, 1994).

Vários relatos indicam que não existe correlação entre a porcentagem de células 45,X e 46,XY em linfócitos e o grau de masculinização encontrado (Knudtzon & Aarskog, 1987). A paciente 9 tem estigmas turnerianos, o que sugere uma expressão somática da linhagem 45,X. Esta linhagem teria, supostamente, determinado o desenvolvimento gonadal. Apesar da presença da linhagem 46,X,idic(Y) e do gene SRY estar normal e provavelmente duplicado, as gônadas da paciente são fibrosas e não há indícios de tecido testicular.

Dentre as dez pacientes portadoras de cromossomos marcadores, em apenas um caso esse marcador era derivado de Y. Nos demais casos os marcadores deveriam ser, supostamente, derivados de X. Conforme já mencionado, para confirmar esta suposição e, para tentar identificar mosaicismo de X oculto nas pacientes com cariótipo 45,X, foi utilizada a técnica HUMARA.

¹ Grumbach, 1969 apud Binder *et al.*, 1995

Essa técnica foi empregada por vários motivos. Em primeiro lugar foi demonstrado que em pacientes com síndrome de Turner o cromossomo X com aberração estrutural é preferencialmente inativado (Muldal *et al.*, 1963) e será, portanto, amplificado seletivamente. Além disso em pacientes com cariótipo 45,X/46,XX, o alelo do segundo X poderá ser amplificado de forma eficiente, já que os cromossomos das células 46,XX são inativados ao acaso e assim ambos os alelos serão igualmente amplificados, mesmo na presença de um grande excesso de células 45,X. Em segundo lugar, uma vez que o *locus* é altamente polimórfico, a chance de que o segundo X tenha um alelo de tamanho diferente é alta. Em terceiro, o gene HUMARA localiza-se em Xq12, entre o centrômero e o centro de inativação em Xq13; assim sendo é provável que mesmo um X anormal deve conter este *locus*.

Dentre as oito pacientes portadoras de marcadores que foram testadas, duas apresentam mosaïcismo de X. Ambas as pacientes possuíam cariótipo 45,X/46,X,r(?). Em um dos casos (pacientes 3) o mosaïcismo ficou evidente quando foi realizada amplificação do DNA digerido apenas com *RsaI* e verificou-se a presença de duas bandas no gel. Neste caso, interessantemente, após a digestão com *HpaII* somente uma banda foi observada, o que indica que ocorreu inativação preferencial, provavelmente do cromossomo em anel.

A paciente número 4 teve o mosaïcismo detectado somente após a digestão com *HpaII*. Inicialmente, a amplificação do DNA digerido com *RsaI* gerou apenas uma banda, e após a digestão com *HpaII* observou-se, também, uma banda única mas de tamanho diferente da obtida na primeira reação. Isso indica que a paciente possui dois alelos HUMARA e um deles, provavelmente o que está localizado no cromossomo em anel, é inativado preferencialmente.

A porcentagem de mosaïcismo de X comprovada dentre as portadoras de marcadores e cromossomos em anel foi de 20%. Entretanto, é bastante provável que os demais marcadores da amostra sejam derivados de X. Em primeiro lugar a

heterozigosidade do *locus* foi calculada em 87% (Yorifuji *et al.*, 1997). Assim existe a possibilidade de que 13% da amostragem tenha dois alelos idênticos. Em segundo lugar, o cromossomo X alterado não pode ser amplificado em indivíduos que não possuem o gene HUMARA, mas este fenômeno é raro. Em terceiro, se o segundo cromossomo X foi originado por dissomia uniparental ambos os X teriam o mesmo alelo. Deve-se considerar, ainda, a possibilidade de alelos de tamanhos muito próximos não serem distingüidos no gel utilizado, o que prejudicaria a detecção do mosaicismo.

É interessante notar que mesmo o DNA do controle masculino de pacientes 45,X geraram bandas após a digestão com *HpaII*. Era de se esperar que não fossem observadas tais bandas, uma vez que estes indivíduos só possuem um alelo HUMARA que é ativo e portanto passível de ser cortado por *HpaII*. Possivelmente essas bandas são geradas por digestão incompleta do DNA. O mesmo tipo de resultado foi obtido por Yorifuji *et al.* (1997).

A princípio, todas as pacientes seriam submetidas a essa técnica, inclusive aquelas com cariótipo 45,X, para que fosse possível identificar mosaicismo oculto de X. Entretanto a técnica se mostrou laboriosa e pouco informativa para justificar tal empreendimento. Além disso, os “primers” utilizados na amplificação do gene HUMARA possuíam temperaturas de fusão bastante diferentes, o que prejudicou a eficiência das reações de PCR. A detecção do mosaicismo de X através desta técnica é excessivamente trabalhosa para ser adotada na rotina, mas pode ser empregada em casos específicos onde se queira estudar o padrão de inativação do X, por exemplo.

No presente trabalho não foram detectados casos de mosaicismo de Y oculto ou de baixa freqüência. Aparentemente, a prevalência deste tipo de mosaicismo é baixa. O único caso de mosaicismo de Y encontrado foi revelado por todas as técnicas utilizadas já que a porcentagem de marcadores era relativamente alta. A presença desses marcadores já havia sido demonstrada no exame citogenético. Os dados obtidos sugerem que o mosaicismo de Y seja pouco freqüente em pacientes cujo cariótipo é 45,X.

Uma vez que no presente trabalho foram analisados exclusivamente linfócitos de sangue periférico, não se pode excluir a possibilidade de que as pacientes tenham mosaicismos em outros órgãos. A probabilidade de detecção do mosaicismos aumenta bastante quando mais de um tecido é estudado. Held *et al.* (1992) analisaram células obtidas de culturas de linfócitos e de fibroblastos em 87 pacientes com síndrome de Turner. O mosaicismos foi demonstrado em 58 (66,7%) destas mulheres. Dentre essas, 16 (18,4% do total) apresentavam uma segunda linhagem celular contendo pequenos cromossomos marcadores. Observou-se que em culturas de longa duração a porcentagem de células contendo cromossomos marcadores era reduzida continuamente, indicando uma seleção contra cromossomos sexuais com aberrações estruturais. No presente estudo, a paciente número 8 foi inicialmente diagnosticada como sendo 45,X com base no cariótipo obtido a partir de linfócitos. Quando foram estudadas células de fibroblastos, observou-se a presença de uma segunda linhagem 46,XX.

A detecção do mosaicismos depende de vários fatores, incluindo o número de células examinadas, o número e os tipos de tecidos estudados, as técnicas empregadas e a ocorrência ou não de seleção *in vitro* ou *in vivo* (Held *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1992). Assim a observação de indivíduos com síndrome de Turner e cariótipo 45,X pode não ser contraditória à hipótese de que a presença de uma linhagem celular com 46 cromossomos é necessária para a sobrevivência no início da gestação. Portanto, pode ser que as pacientes 45,X da amostra do presente trabalho tenham mosaicismos ocultos de X ou de Y que não foi diagnosticado por não terem sido estudados outros tecidos.

A comparação de dados da literatura indicou que nos trabalhos em que foi utilizada a técnica de PCR numa amostra heterogênea de pacientes (que inclui cariótipo 45,X, mosaicos, e 46 cromossomos portadores de aberrações estruturais) a frequência de mosaicismos de Y foi de 2,5 a 9,2% (Held *et al.*, 1992; Medlej *et al.*, 1992; Binder *et al.*, 1995), sendo que o limite superior foi definido por Held *et al.* (1992), que investigaram mais de um tecido.

Quando apenas pacientes portadoras de cromossomos de origem não identificada foram consideradas, a frequência de mosaicismo de Y encontrada é mais alta e vai de 13,8 a 56% (Held *et al.*, 1992; Nagafuchi *et al.*, 1997). Nas situações em que foram estudadas por PCR apenas as pacientes com cariótipo 45,X, não foi detectado mosaicismo de Y (Witt *et al.*, 1993, Larsen *et al.*, 1995; Yorifuji *et al.*, 1997).

Em dois casos da literatura em que foi detectada a presença do gene SRY em pacientes com mosaicismo de Y em baixa frequência notou-se que a presença desse gene estava associada a virilização e elevados níveis de testosterona (Witt *et al.*, 1993; Kocova *et al.*, 1993).

Baseando-se nos dados da literatura e também no presente trabalho pode-se sugerir que apenas as pacientes portadoras de cromossomos marcadores ou em anel e aquelas que apresentam sinais de virilização devam ser submetidas à avaliação molecular para estudo de mosaicismo de Y.

De acordo com Binder *et al.* (1995), o “nested-PCR” seria uma técnica excessivamente sensível, passível de resultados falso-positivos, e portanto não recomendada para ser usada na rotina laboratorial. No caso de pacientes portadoras de fragmentos cromossômicos observados pelo exame citogenético, a detecção de seqüências de Y poderia ser feita através de uma única etapa de amplificação por PCR em dois diferentes *loci* Y-específicos, localizados próximo ao centrômero. O “nested-PCR” poderia ser utilizado em casos onde ocorra virilização sem evidências citogenéticas de mosaicismo ou, ainda, no estudo de outros tecidos - como as gônadas.

O uso do “Southern Blotting” tem limites na detecção do mosaicismo. Dados de um trabalho em que tal técnica foi utilizada para detecção de mosaicismo de Y em pacientes com síndrome de Turner mostram que mesmo a sonda mais sensível empregada não detecta mosaicos com menos de 5% de cromossomos marcadores (Cerutti, 1991, tese

de mestrado). Assim, o uso do “Southern blotting” é eficaz para a investigação de mosaicismo nos casos em que a linhagem portadora do cromossomo derivado de Y é relativamente freqüente e para o mapeamento de marcadores de Y; porém, esta metodologia não é eficiente na busca de mosaicismo de baixo grau.

CONCLUSÕES

- O estudo do gene SRY nas três mulheres com disgenesia gonadal pura 46,XY mostrou que:
 - (1) nenhuma paciente apresenta deleção do gene;
 - (2) uma paciente apresenta uma mutação de ponto (G→A) na posição 619 do domínio conservado do SRY, a qual gera um códon de terminação precoce (W70X). Tal mutação é, provavelmente, responsável pela reversão sexual;
 - (3) duas pacientes não apresentam alteração alguma no domínio conservado do gene SRY e, nesses casos, o fenótipo feminino pode dever-se a diversos fatores tais como: mutações na porção não conservada do SRY, mutações em suas regiões regulatórias, mutações nas seqüências às quais a proteína codificada por esse gene se liga, existência de mosaicismos não detectado no tecido gonadal; mutações em outros genes que participam dos processos de determinação e diferenciação sexuais.
- A análise de seqüências localizadas ao longo do cromossomo Y das mulheres com disgenesia gonadal pura 46,XY mostrou que não ocorre deleção das regiões estudadas. A ausência de hibridização com um fragmento da sonda 50f2, específico do intervalo 6 (Yq), em uma paciente, deve-se, provavelmente, a ocorrência de um polimorfismo.
- Dentre as vinte e três pacientes com síndrome de Turner avaliadas, em apenas uma(4,3%) foi verificada a presença de um cromossomo derivado de Y. O exame citogenético dessa paciente havia indicado a presença de mosaicismos. Considerando-se somente as pacientes portadoras de cromossomos marcadores ou em anel, a freqüência de mosaicismos de Y encontrada no presente trabalho sobe para 10%. Isso indica que esse tipo de mosaicismos é pouco freqüente nas pacientes com síndrome de Turner mas sua prevalência é maior nas portadoras de fragmentos cromossômicos de origem não identificada.
- Mulheres com síndrome de Turner devem ser indicadas para pesquisa de cromossomo Y, sendo que uma atenção especial deve ser dada a portadoras de fragmentos cromossômicos de origem não identificada ou pacientes que apresentem algum sinal de virilização. Tais pacientes devem ter mais de um *locus* analisado por PCR, dando-se prioridade ao estudo dos intervalos onde pode estar localizado o suposto GBY (região centromérica e porção distal de Yq). Pacientes que possuem cariótipo 45,X podem ser avaliadas através da amplificação de apenas um *locus* situado na região centromérica.
- estudo de seqüências Y-específicas em uma paciente portadora de mosaicismos desse cromossomo indicou uma deleção da porção distal de Yq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFARA, N.A.; CHALMERS, I.J.; FERGUSON-SMITH, M.A. Analysis of the SRY gene in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Human Molecular Genetics* 2:785-9, 1993.
- ALLEN, R.C.; ZOGHBI, H.Y.; MOSELEY, A.B.; ROSENBLATT, H.M.; BELMONT, J.W. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivations. *American Journal of Human Genetics* 51:1229-1239, 1992.
- ARAUJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA JR.; G, FARAH, S.B.; DE MELLO, M.P. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29:1-13, 1996.
- ARN, P; CHEN, H.; TUCK-MULLER, C.M.; MANKINEN, C.; WATCHTEL, G.; LI, S.; SHEN, C.; WATCHTEL, S.S. SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11. *Human Genetics* 93:389-393, 1994.
- BARBAUX, S.; VIALAIN, E.; RAOUL, O; GILGENKRANTZ, S.; JEANDIDIER, E.; CHADENAS, D.; SOULEYREAU, N.; FELLOUS, M.; McELREAVEY, K. Proximal deletions of the long arm of the Y chromosome suggest a critical region associated with a specific subset of characteristic Turner stigmata. *Human Molecular Genetics* 4:1565-1568, 1995.
- BARDONI, B.; FLORIDIA, G.; GUIOLI, S; PEVERALI, G.; ANICHINI, C.; CISTERNINO, M.; CASALONE, R.; DANESINO, C.; FRACCARO, M.; ZUFFARDI, O.; CAMERINO, G. Functional disomy of Xp22-pter in three males carrying a portion of Xp translocated to Yq. *Human Genetics* 91:333-338, 1993.
- BEHLKE, M.A.; BOGAN, J.S.; BEER-ROMERO, P.; PAGE, D.C. Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics* 17:736-739, 1993.
- BEIGUELMAN, B. Citogenética Humana. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. 328p.
- BENNET, C.P.; DOCHERTY, Z.; ROBB, S.A.; RAMANI, P.; HAWKINS, J.R.; GRANT, D. Deletion 9p and sex reversal. *Journal of Medical Genetics* 30:518-520, 1993.
- BERKOVITZ, G.D.; FECHNER, M.D.; ZACUR, H.W.; ROCK, J.A.; SNYDER III, M.D.; MIGEON, C.J.; PERLMAN, E.J. Clinical and pathologic spectrum of

- 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine* 10:375-383, 1991.
- BERKOVITZ, G.D.; FECHNER, P.; MARCANTONIO, S.M. The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Human Genetics* 88:411-416, 1992.
- BERTA, P.; HAWKINS, J.R.; SINCLAIR, A.H; TAYLOR, A.; GRIFFITHS, B.L.; GOODFELLOW, P.N.; FELLOUS, M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450, 1990.
- BERNSTEIN R.; JENKINS, T.; DAWSON, B.; WAGNER J.; DEWALD, G.; KOO G.C.; WATCHTEL, S.S. Female phenotype and multiple abnormalities in sibs with a Y chromosome and partial X chromosome duplication: H-Y antigen and Xg blood group findings. *Journal of Medical Genetics* 17:291,300, 1980.
- BILBAO, J.R.; LORIDAN, L.; CASTAÑO, L. A novel postzygotic nonsense mutation in SRY in familial XY gonadal dysgenesis. *Human Genetics* 97:537-539, 1996.
- BINDER, G.; KICH, A.; WAJS, E.; RANKE, M.B. Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's Syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common?. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:3532-3535, 1995.
- BURGOYNE, P. & PALMER, S.J. The genetics of XY sex reversal in the mouse and other mammals. *Developmental Biology* 2:277-284, 1991.
- CAMERON, F.J.; SMITH, M.J.; WARNE, G.L.; SINCLAIR, A.H. Novel mutation in the SRY gene results in 46,XY gonadal dysgenesis. *Human Mutation* :1-2,1997.
- CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C.; MODEST, E.J. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30:215-227, 1970.
- CERUTTI, J.M. Detecção e caracterização de fragmentos cromossômicos com sondas de DNA Y-específicas em pacientes com estigmas turnerianos. Campinas, 1991 (Tese de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- CHANG, H.J.; CLARK, R.D.; BACHMAN, H. The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases. *American Journal of Human Genetics* 46:156-167, 1990.

- CHU, C.E.; CONNOR, J.M.; DONALDSON, M.D.C.; KELNAR, C.J.H.; SMAIL, P.J.; GREENE, S.A. Detection of Y mosaicism in patients with Turner's syndrome. *Journal of Medical Genetics* 32:578-580, 1995.
- COCKWELL, A.; MacKENZIE, M.; YOUINGS, S.; JACOBS, P. A cytogenetic and molecular study of a series of 45,X fetuses and their parents. *Journal of Medical Genetics* 28:151-155, 1991.
- COOKE, H.J. & HINDLEY, J. Cloning of human satellite III: different components are on different chromosomes. *Nucleic Acids Research* 6:3177-3198, 1979.
- CUSSEN L.J. & MacMAHON R.A. Germ cells and ova in dysgenetic gonads of a 46 XY female dizygotic twin. *American Journal Dis Child* 133:373-375, 1979.
- DAMIANI, D. Classificação das anomalias da diferenciação sexual. In: Endocrinologia Pediátrica - aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente. São Paulo, 1989.
- DISTECHE, M.D. Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends in Genetics* 11:17-22,1995.
- FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B.A. Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-9, 1983.
- FERGUSON-SMITH, M.A.; JOHNSTON, A.W.; WEINBERG, A.N. The chromosome complement in true hermaphroditism. *Lancet* ii:126-128, 1960.
- FERNÁNDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J.; PIÑEIRO, C.; PEREIRA, S.; GOYANES, V. Chromosome fragments with alphoid sequences derived from a pseudoisodicentric Y chromosome. *Journal of Medical Genetics* 33:84-88, 1996.
- FERNÁNDEZ, R.; MÉNDEZ, J.; PÁSARO, E. Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. *Human Genetics* 98:29-35, 1996.
- FERRARI, S.; HARLEY, V.R.; PONTIGGIA, A.; GOODFELLOW, P.N.; LOVELL-BADGE, R.; BIANCHI, M.E. SRY, like HMG1, recognises sharp angles in DNA. *The European Journal of Molecular Biology* 11:4497-4506, 1992.
- FISHER, E.M.; BEER-ROMERO, P.; BROWN, L.G. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 63:1205-1218, 1990.

- FORD, C.E.; JONES, K.W.; POLANI, P.E.; de ALMEIDA, J.C.; BRIGGS, J.H. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* i:711-713, 1959.
- GEERKENS, C.; JUST, W.; HELD, K.R.; VOGEL, W. Ullrich-Turner syndrome is not caused by haploinsufficiency of RPS4X. *Human Genetics* 97:39-44, 1996.
- GIESE, K.; COX, J.; GROSSCHEDL, R. The HMG domain of the lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69:185-195, 1992.
- GOODFELLOW, P.N. & DARLING, S.M. Genetics of sex determination in man and mouse. *Development* 102:251-258, 1988.
- GOODFELLOW, P.N. Mapping the Y chromosome. *Development* 101 (Supplement):39, 1987.
- GORDON, J.W. & RUDDLE, F.H. Mammalian Gonadal Determination and Gametogenesis. *Science* 211:1265-1271, 1981.
- 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 Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250, 1990.
- GUELLAEN, G.; CASANOVA, M.; BISHOP, C. Human XX males with Y single-copy DNA fragments. *Nature* 307:172-173, 1984.
- GUERRA-JÚNIOR, G. & MACIEL-GUERRA, A.T. A determinação e a diferenciação sexual normais: atualização. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 41:191-197, 1997.
- HADJIATHANASIOU, C.G.; BRAUNER, R.; LORTAT-JACOB, S. True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. *The Journal of Pediatrics* 125:738-744, 1994.
- HARLEY, V.R.; JACKSON, D.I.; HEXTALL, P.J.; HAWKINS, J.R.; BERKOVITZ, G.D.; SOCKANATHAN, S.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P.N. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255:453-456, 1992.
- HASELTINE, F.P.; GENEL, M.; CRAWFORD, J.D. H-Y antigen negative patients with testicular tissue and 46,XY Karyotype. *Human Genetics* 57:265-268, 1981.

- HASSOLD, T.; ARNOVITZ, K.; JACOBS, P.A.; MAY, K.; ROBINSON, D. The parental origin of the missing or additional chromosome in 45,X and 47,XXX females. *Birth Defects* 26:297-304, 1991.
- HAWKINS, J.R.; TAYLOR, A.; GOODFELLOW, P.N.; MIGEON, C.J.; SMITH, D.; BERKOVITZ, G.D. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *American Journal of Human Genetics* 51:979-984, 1992a.
- HAWKINS, J.R.; TAYLOR, A.; BERTA, P.; LEVILLIERS, J.; VAN DE AUWERA, B.; GOODFELLOW, P.N. Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Human Genetics* 88:471-474, 1992b.
- HAWKINS, J.R. Mutational analysis of SRY in XY females. *Human Mutation* 2:348-350, 1993.
- HELD, K.R.; KERBER, S.; KAMINSKY, E.; SINGH, S.; GOETZ, R.; SEEMANOVA, E.; GOEDDE, H.W. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Human Genetics* 88:288-294, 1992.
- HELD, K.R. Turner's syndrome and chromosome Y. *The Lancet* 342:128-129, 1993.
- HSU, L.Y.F. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *American Journal of Medical Genetics* 53:108-140, 1994.
- HUNTER, R.H.F. Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals. Cambridge, Cambridge University Press, 1995. 310p.
- IIDA, T.; NAKAHORI, Y.; KOMAKI, R.; MORI, E.; HAYASHI, N.; TSUTSUMI, O.; TAKETANI, Y.; NAKAGOME, Y. A novel nonsense mutation in the HMG box of the SRY gene in a patient with XY sex reversal. *Human Molecular Genetics* 3:1437-1438, 1994.
- JACOBS, P.A. & STRONG, J.A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302-303, 1959.
- JAGER, R.J.; ANVRET, M.; HALL, K.; SCHERER, G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 348:452-454, 1990.
- JAGER R.J.; PFEIFFER, R.A.; SCHERER, G. A familial amino acid substitution in SRY can lead to conditional XY sex inversion. *American Journal of Human Genetics* 49:219, 1991.

- JAGER, R.J.; HARLEY, V.R.; PFEIFFER, R.A.; GOODFELLOW, P.N.; SCHERER, G. A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Human Genetics* 90:350-355, 1992.
- JOBLING, M.A.; SAMARA, V.; PANDYA, A.; FRETWELL, N.; BERNASCONI, B.; MITCHELL, R.J.; GERELSAIKHAN, T.; DASHNYAM, B.; SAJANTILA, A.; SALO, P.J.; NAKAHORI, Y.; DISTECHE, C.M.; THANGARAJ, K.; SINGH, L.; CRAWFORD, M.H.; TYLER-SMITH, C. Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males. *Human Molecular Genetics* 5:1767-1775, 1996.
- JOST, A.; VIGIER, B.; PREPIN, J.; PERCHELLET, J.P. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec. Prog. Horm. Res.* 29:1-41, 1973.
- KELLY, T.E.; FERGUSON, J.E.; GOLDEN, W. Survival of fetuses with 45,X: an instructive case and an hypothesis. *American Journal of Medical Genetics* 42:825-826, 1992.
- KNUDTZON, J. & AARSKOG, D. 45,X/46,XY mosaicism - a clinical review and report of ten cases. *European Journal of Pediatrics* 146:266-271, 1987.
- KOCOVA, M.; SIEGEL, S.F.; WENGER, S.L.; LEE, P.A.; TRUCCO, M. Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *The Lancet* 342:140-143, 1993.
- KOOLER, P.C. & DARLINGTON, C.D. The genetical and mechanical properties of the sex chromosomes. *Journal of Genetics* 29:159-173, 1934.
- KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 351:117-121, 1991.
- KUZNETZOVA, T.; BARANOV, A.; SCHWED, N.; IVASCHENKO, T.; MALET, M.; GIOLLANT, M.; SAVISKY, G.A.; BARANOV, V. Cytogenetic and molecular findings in patients with Turner's syndrome stigmata. *Journal of Medical Genetics* 32:962-967, 1995.
- KWOK, C.; TYLER-SMITH, C.; MENDONÇA, B.B.; HUGHES, I.; BERKOWITZ, G.D.; GOODFELLOW, P.N.; HAWKINS, J.R. Mutational analysis of 2Kb 5'to the SRY in XY females and XY intersex subjects. *Journal of Medical Genetics* 33:465-468, 1996.
- LARSEN, T.; GRAVHOLT, C.H.; TILLEBECK, A.; LARSEN, H.; JENSEN, M.; NIELSEN, J.; FRIEDRICH, U. Parental origin of the X chromosome, X

- chromosome mosaicism and screening for "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clinical Genetics* 48:6-11, 1995.
- LEVILLIERS, J.; QUACK, B.; WEISSENBACH, J.; PETIT, C. Exchange of terminal portions of X- and Y chromosomal short arms in human XY females. *Proceedings of National Academy of Science of USA* 86:2296-2300, 1989.
- LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K.L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490, 1994.
- MATHUR, A.; STEKOL, L.; SCHATZ, D.; MacLAREN, N.K.; SCOTT, M.L., LIPPE, B. The parental origin of the single X chromosome in Turner syndrome: lack of correlation with parental age or clinical phenotype. *American Journal of Human Genetics* 48:682-686, 1991.
- McELREAVEY, K.D.; VILAIN, E.; BOUCEKKINE, C.; VIDAUD, M.; JAUBERT, F.; RICHAUD, F.; FELLOUS, M. XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics* 13:838-840, 1992a.
- McELREAVEY, K.; VILAIN, E.; ABBAS, N.; COSTA, J.M.; SOULEYREAU, N.; KUCHERIA, K.; BOUCEKKINE, C.; THIBAUD, E.; BRAUNER, R.; FLAMANT, F.; FELLOUS, M. XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMGbox" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci* 89:11016-11020, 1992b.
- McELREAVEY, K.; VILAIN E; ABBAS, N.; HERSKOWITZ, I.; FELLOUS, M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3368-3372, 1993.
- McELREAVEY, K.; BARBAUX, S.; ION, A.; FELLOUS, M. The genetic basis of murine and human sex determination: a review. *Heredity* 75:599-611, 1995.
- McLAREN, A. What makes a man a man? *Nature* 346:216, 1990.
- MEDLEJ, R.; LOBACCARO, J.M.; BERTA, P. Screening for Y-derived sex determining gene SRY in 40 patients with Turner Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75:1289-1292, 1992.
- MEYER, J.; SÜDBECK, P.; HELD, M.; WAGNER, T.; SCHMITZ, M.L.; BRICARELLI, F.D.; EGGERMONT, E.; FRIEDRICH, U.; HASS, O.A.; KOLBELT, A.; LEROY, J.L.; MALDERGEM, L.V.; MICHEL, E.; MITULLA, B.; PFEIFFER, R.A.; SCHINZEL, A.; SCHIMIDT, H.; SCHERER, G. Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia

- and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlation. *Human Molecular Genetics*:91-98, 1997.
- MOORE K.L., Editor. Embriologia Clínica. Interamericana. Rio de Janeiro, 1978.
- MULDAL, S.; GILBERT, C.W.; LAJTHA, L.G.; LINDSTEN, J.; ROWLEY, J.; FRACCARO, M. Tritiated thymidine incorporation in an isochromosome in man. *Lancet* I:861-863, 1963.
- MÜLLER, U. Mapping of testis-determining locus on Yp by the molecular genetic analysis of XX males and XY females. *Development (Supplement)* 101:51-58, 1987.
- MÜLLER, U.; KIRKELS, G.H.J.; SCHERES, J.M.J. Absence of Turner stigmata in a 46,XYp- female. *Human Genetics* 90:239-242, 1992.
- MÜLLER, J.; SCHATZ, M.; SKAKKEBAEK, N.E. Analysis of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in sex reversed patients: point-mutation in SRY causing sex-reversion in a 46,XY female. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75:331-333, 1992.
- MUSCATELLI, F.; STROM, T.M.; WALKER, A.P.; ZANARIA, E.; RÉCAN, K.; MEINDL, A.; BARDONI, B.; GUIOLI, S.; ZEHETNER, G.; RABI, W.; SCHWARTZ, H.P.; KAPLAN, J.C.; CAMERINO, G.; MEITINGER, T.; MONACO, A.P. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372:672-676, 1994.
- NAGAFUCHI, S.; TAMURA, T.; NAKAHORI, Y. The majority of the marker chromosomes in Japanese patients with stigmata of Turner syndrome are derived from Y chromosomes. *Human Genetics* 89:590-592, 1992.
- NORDENSKJÖLD, A.; FRICKE, G.; ANVRET, M. Absence of mutations in the WT1 gene in patients with XY gonadal dysgenesis. *Human Genetics* 96:102-104, 1995.
- OGATA, T.; HAWKINS, J.R.; TAYLOR, A.; MATSUO, N.; HATA, J.; GOODFELLOW, P.N. Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: support for the existence of a gene(s), located in distal Sp, involved in testis formation. *Journal of Medical Genetics* 29:226-230, 1992.
- OGATA, T.; MATSUO, N. Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. *Human Genetics* 95, 607-629, 1995.

- PAGE, D.C. Sex reversal: Deletion mapping the male-determining function of the human Y chromosome. *Cold Spring Harbour Symp. quant. Biol.* 51:224-226, 1986.
- PAGE, D.C.; MOSHER, R.; SIMPSON, E.M; FISHER, E.M.C.; MARDON, G.; POLLACK, J.; MCGILLIVRAY, B.; DE LA CHAPELLE, A.; BROWN, L.G. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104, 1987a.
- PAGE, D.C. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* 101 (Supplement):151-155, 1987b.
- PAGE, D.C. Y chromosome sequences in Turner's syndrome and risk of gonadoblastoma or virilisation. *The Lancet* 343:240, 1994.
- PALMER, M.S.; SINCLAIR, A.H.; BERTA, P; ELLIS, A. GOODFELLOW, P.N.; ABBAS, N.E.; FELLOUS, M. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342:937-939, 1989.
- PATSALIS, P.C.; HADJIMARCOU, M.I.; VELISSARIOU, V.; KITSIOU-TZELI, S.; ZERA, C.; SYRROU, M.; LYBERATOU, E.; TSEZOU, A.; GALLA, A.; SKORDIS, N. Supernumerary marker chromosomes (SMCs) in Turner syndrome are mostly derived from the Y chromosome. *Clinical Genetics* 51:184-190, 1997.
- POULAT, F.; SOULLIER, S.; GOZE, C.; HEITZ, F.; CALAS, B.; BERTA, P. Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene SRY. *Human Mutation* 3:200-204, 1994.
- POULAT, F.; DESCLOZEAUX, M.; TUFFERY, S.; JAY, P.; BOIZET, B.; BERTA, P. Mutation in the noncoding region of the SRY gene in an XY sex-reversed patient. *Human Mutation*:1-3, 1997.
- PRITCHARD, C.A. & GOODFELLOW, P.N. Molecular analysis of the Y chromosome: definition of the boundary between the pseudoautosomal region and Y specific sequences and the identification of a candidate sequence for the male determining gene. *Nature, Lond.* 328:273-275, 1987.
- RAYMOND, C.S.; SHAMU, C.E.; SHEN, M.M.;SEIFERT, K.J.; HIRSCH, B.; HODGKIN, J.; ZARKOWER, D. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391:691-694, 1998.
- REIJO, R.; LEE, T.Y.; SALO, P.; ALAGAPPAN, R.; BROWN, L.G.; ROSENBERG, M.; ROZEN, S.; JAFFE, T.; STRAUS D.; HOVATTA, O.; de la CHAPELLE, A.; SIBER, S.; PAGE, D.C. Diverse spermatogenic

defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics* 10:383-393, 1995.

ROSENFELD, R.G., Editor. Turner syndrome: a guide for physicians. The Turner's Syndrome Society USA, 1992.

SAENGER, P. Abnormal sex differentiation. *The Journal of Pediatrics* 104:1-17, 1984.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATIS, T.E. Molecular cloning: a laboratory manual, 2^a ed., *Cold Spring Harbour Laboratory*, Cold Spring Harbour, N.Y., 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467, 1977.

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.

SCHIMITT-NEY, M.; THIELE, H.; KALWABER, P.; BARDONI, B.; CISTERNINO, M.; SCHERER, G. Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *American Journal of Human Genetics*, 56:862-869, 1995.

SCHNEIDER-GADICKE, A.; BEER-ROMERO, P.; BROWN, L.G. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57:1247-1258, 1989.

SCHWARTZ, S.; DEPINET, T.W.; LEANA-COX, J.; ISADA, N.B.; KARSON, E.M.; PARK, V.M.; PASZTOR, L.M.; SHEPPARD, L.C.; STALLARD, R.; WOLFF, D.J.; ZINN, A.B.; ZÜRCHER, V.L.; ZACKOWSKI, J.L. Sex chromosome markers: characterisation using fluorescence in situ hybridisation and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics* 71:1-7, 1997.

SCULLY, R.E. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 25:1340-1356, 1970.

SHEN, W.H.; MOORE, C.C.D.; IKEDA, Y.; PARKER, K.L.; HOLLY, A.I. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77:651-661, 1994.

- SIMPSON, J.L. & PHOTOPHOULOS, G. The relationship of neoplasia to disorders of abnormal sexual differentiation. *Birth Defects* 12:15-20, 1976.
- SINCLAIR, A.H.; POSTER, J.W.; SPENCER, J.A. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 336:780-783, 1988.
- SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; PALMER, M.S.; HAWKINS, J.R.; GRIFFITHS, B.L.; SMITH, M.J.; FOSTER, J.W.; FRISCHAUF, A.M.; LOWELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P.N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244, 1990.
- SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-1975.
- STUPPIA, L.; CALABRESE, G.; FRANCHI, P.G.; MAINGARELLI, R.; MORIZIO, E.; SABATINO, G.; PALKA, G. Molecular studies in three patients with isodicentric Y chromosome. *Human Genetics* 98:691-695, 1996.
- SU, H.; LAU, Y.F.C. Identification of the transcriptional unit, structural organisation, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *American Journal of Human Genetic* 52:24-38, 1993.
- SWAIN, A.; NARVAEZ, V.; BURGOYNE, P.; CAMERINO, G.; LOVELL-BADGE, R. Dax1 antagonizes SRY action in mammalian sex determination. *Nature* 391:761-767, 1998.
- TAJIMA, T.; NAKAE, J.; SHINOHARA, N.; FUJIEDA, K. A novel mutation localised in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46,XY gonads dysgenesis. *Human Molecular Genetics* 3:1187-1189, 1994.
- TSUCHIYA, K.; REIJO, R.; PAGE, D.C.; DISTECHE, C.M. Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. *American Journal of Medical Genetics* 57:1400-1407, 1995.
- VEITIA, R.; ION, A.; BARBAUX, S.; JOBLING, M.A.; SOULEYREAU, N.; ENNIS, K.; OSTRER, H.; TOSI, M.; MEO, T.; CHIBANI, J.; FELLOUS, M.; McELREAVEY, K. Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Human Genetics* 99:648-652, 1997.
- VERNAUD, G.; PAGE, D.C.; SIMMLER, M.C.; BROWN, L.; ROYER, F.; NOEL, B.; BOTSTEIN, D.; DE LA CHAPELLE, A.; WEISSENBACH, J.A. A

- deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridisation. *Journal of Human Genetics* 38:109-124, 1986.
- VERP, M.S. & SIMPSON, J.L. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenetics* 25:191-218, 1987.
- VOGT, P.H.; EDELMANN, A.; KIRSCH, S.; HENEGARIU, O.; HIRSCHMANN, P.; KIESEWETTER, F.; KOHN, F.M.; SCHILL, W.B.; FARAH, S.; RAMOS, C.; HARTMANN, M.; HARTSCHUH, W.; MESCHEDÉ, D.; BEHRE, H.M.; CASTEL, A.; NIESCHLAG, E.; WEIDNER, W.; GRONE, H.J.; JUNG, A.; ENGEL, W.; HAIDL, G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* 5:933-943, 1996.
- VOLLRATH, D.; FOOTE, S.; HILTON, A.; BROWN, L.G.; BEER-ROMERO, P.; BOGAN, J.S.; PAGE, D.C. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258:52-59, 1992.
- VOUTILAINEN, R. Differentiation of the fetal gonad. *Hormone Research* 38:(supplement):66-71, 1992.
- WACHTEL, S.S.; KOO, S.; BOYSE, E.A. Evolutionary conservation of H-Y antigen. *Nature* 254:270-272, 1975.
- WAGNER, T.; WIRTH, J.; MEYER, J.; ZABEL, B.; HELD, M.; ZIMMER, J.; PARASANTES, J.; BRICARELLI, F.D.; KEUTEL, J.; WOLF, U.; TOMMERUP, N.; SCHEMPP, W.; SCHERER, G. Autosomal sex reversal and Campomelic Dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120, 1994.
- WATANABE, M.; ZINN, A.R.; PAGE, D.C. and Nishimoto, T. Functional equivalence of human X-and Y-encoded isoforms of ribosomal protein S4 consistent with a role in Turner syndrome. *Nature Genetics* 4:268-271, 1993.
- WERNER, M.H.; HUTH, J.R.; GRONENBORN, A.M.; CLORE, G.M. Molecular determinants of mammalian sex. *Trends in Biochemistry* 21:302-308, 1996.
- WILKIE, A.O.M.; CAMPBELL, F.M.; DAUBENEY, P; GRANT, D.B.; DANIELS, R.J.; MULLARKEY, M.; AFFARA, N.A.; FITCHETT, M.; HUSON, S.M. Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. *American Journal of Medical Genetics* 46:597-600, 1993.
- WITT, M.; MICHALCZAK, K.; LATOS-BIELENSKA, A.; JARUZELSKA, J.; KUCZORA, I.; LOPEZ, M. An improved, non-isotopic method of screening

cells from patients with abnormalities of sexual differentiation for Y chromosomal DNA content. *Journal of Medical Genetics* 30:304-307, 1993.

YORIFUJI, T.; MUROI, J.; KAWAI, M.; SASAKI, H.; MOMOI, T.; FURUSHO, K. PCR-based detection of mosaicism in Turner syndrome patients. *Human Genetics* 99:62-65, 1997.

ZENG, Y.T.; REN, Z.R.; ZHANG, M.L.; HUANG, Y.; ZENG, F.Y.; HUANG, S.Z. A new de novo mutation (A113T) in HMGbox of the SRY gene leads to XY gonadal dysgenesis. *Journal of Medical Genetics* 30:655-657, 1993.

ZINN, A. ; PAGE, D.; FISHER, E. Turner syndrome: the case of the missing sex chromosome. *Trends in Genetics* 9:90-93, 1993.