UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/42694
IB/81564

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP
T689e

SECRETÁRIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Ericka Barbosa Trarbach

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM PACIENTES COM SÍNDROME DE KALLMANN

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) Ericka Barbosa Trarbach e aprovada pela Comissão Julgadora.
26/07/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Humana e Médica.

Orientadora : Profa. Dra. Christine Hackel

Campinas – S.P.
2000

UNICAMP

UNIDADE IB/87564
N.º CHAMADA:
Unicamp
T689e
V. Ex.
TOMBO BC/42694
PROC. 16/2K8100
C [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 14/10/00
N.º CPD

CM-00147051-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Trarbach, Ericka Barbosa

T689e Estudos citogenéticos em pacientes com síndrome de Kallmann / Ericka Barbosa Trarbach. - Campinas, SP. [s.n.], 2000
85f: ilus.

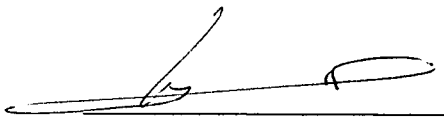
Orientador: Christine Hackel
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Genética médica. 2. Cromossomo X. 3. Citogenética. 4. Hibridação. I. Hackel, Christine. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

DATA DA DEFESA: 26 de julho de 2000.

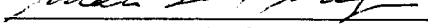
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Christine Hackel (Orientadora)



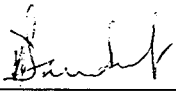
Assinatura

Profa. Dra. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno



Assinatura

Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann



Assinatura

Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra

Assinatura

À minha mãe, Perciliana, que, mais que uma mãe, tem sido amiga e companheira, por sempre acreditar em mim .

À minha madrinha, "Nezinha", por seus imensos cuidados.

Ao meu pai, seu "Zé", de quem tanto me orgulho, pela pessoa simples e valiosa que tem demonstrado ser.

Aos meus irmãos, "Marcita" e Bruno, pelo amor e carinho dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é sinônimo de "VIDA" e me dá inspiração para vivê-la da melhor forma possível.

Aos meus pais, Mamy e Papy, pelo apoio, dedicação e amor.

Às minhas outras mães, Bené e Vó Ana, e minha irmã Marcia, simplesmente por serem maravilhosas.

A Chris, excelente profissional, que, antes de ser orientadora, é AMIGA, estando sempre aberta ao diálogo com seus alunos.

A Nilma, não só pelos ensinamentos e sugestões, mas também pela amizade e por ter me dado a maior força nos momentos difíceis.

Às colegas Daniela e Belzinha, que tanto me ajudaram, e a toda moçada dos laboratórios do CBMEG e do DGM.

Aos funcionários e amigos do laboratório de Citogenética Humana, Jô, Henry, Toninho e Sônia, pela colaboração prestada.

A Neusa, e família, que sempre me recebeu como uma filha em sua casa.

Aos amigos da moradia, Brod, Luiz, Alex, Takeda e Fernando, por terem me dado abrigo logo que cheguei em Campinas.

Aos amigos, que por algum motivo, não vejo mais, mas que sempre estarão presentes em meus pensamentos.

Aos novos amigos que chegaram e já estão "ocupando espaço", pelos quais já sinto profunda admiração e carinho.

Aos colegas da pensão, Rose, Henrique, Arthur, Rodrigo, Lucas, etc, que são verdadeiros companheiros de luta.

A todos que, embora não nomeados, colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (PG/ 12814-15) e concessão de bolsa.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....i
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....iii
RESUMO.....iv
ABSTRACT.....v
1. INTRODUÇÃO.....1
1.1 – Síndrome de Kallmann.....3
1.2 – Citogenética de Alta Resolução.....12
1.3 – Hibridação *in situ* por Fluorescência.....14
2. OBJETIVOS.....19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....20
3.1 – Casuística.....20
3.2 – Metodologia.....24
3.2.1 – Técnicas de Cultivo de Linfócitos.....24
3.2.2 – Técnica de Bandamento GTG.....27
3.2.3 – Hibridação *in situ* por Fluorescência.....27
3.2.4 – Análise Citogenética.....30
4. RESULTADOS.....31
5. DISCUSSÃO.....35
6. CONCLUSÕES.....39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....40
8. ANEXOS.....51

ABREVIATURAS

ace – Fragmento cromossômico acêntrico

BAC – Cromossomos artificiais de bactéria

BrdU – Bromodesoxiuridina

CCD – "Cooled Charge Device"

CEP – "Chromosome Enumeration Probe"

cr - cromossomo

DAPI – 4'-6-diamidino-2phenylindole

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfato

EtBr – Brometo de Etídio

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

FISH – Hibridação *in situ* por fluorescência

FSH – Hormônio folículo estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

GTG – bandamento G por tratamento com Tripsina e corado com Giemsa

HCl – Ácido clorídrico

HHI – Hipogonadismo Hipogonadotrófico Idiopático

KAL-1 – gene da síndrome de Kallmann ligado ao X

kb – quilobases

KCl – Cloreto de potássio

LH – Hormônio luteinizante

LH-RH – Hormônio liberador de hormônio luteinizante.

LSI – "*locus* specific identifier"

mar – Cromossomo marcador

MIM – "Mendelian inheritance in man"

NaOH – Hidróxido de sódio

p – braço curto

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

q – braço longo

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

RPMI – Royal Park Memory Institute

SK – Síndrome de Kallmann

SKX – Síndrome de Kallmann ligada ao X

SSC – "Saline-Sodium-Citrate"

t – translocação

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

YAC – Cromossomos artificiais de levedura

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Ilustração do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (página 2).

Figura 2 – Mapa mórbido da região Xp22.3 (página 6)

Figura 3 – Modelo patogênico da síndrome de Kallmann (página 7)

Figura 4 – Representação diagramática do cromossomo 10 com bandamento GTG em 3 diferentes níveis de resolução de bandas (página 13).

Figura 5 - Representação esquemática da técnica de FISH (página 16).

Figura 6 – Aplicação da técnica de FISH no diagnóstico de síndromes associadas a microdeleções (página 18).

Figura 7 – Heredogramas dos pacientes com SKX (página 22)

Figura 8 – Heredogramas dos pacientes com herança autossômica dominante da SK (página 22).

Figura 9 - Hibridação *in situ* por fluorescência utilizando sonda específica para o *locus KAL-1* (página 34).

Tabela I - Resumo dos achados clínicos observados nos pacientes estudados (página 21).

Tabela II - Interpolação pela somatória do número (n°) de bandas visíveis no cromossomo (cr) 10 para determinação do nível de resolução de bandas de uma preparação cromossômica (página 30).

Tabela III - Resultado dos cariótipos, descrevendo as alterações estruturais observadas, e da análise de FISH para o *locus KAL-1* (página 32).

Tabela IV - Análise comparativa entre as técnicas utilizadas na obtenção das preparações cromossômicas (página 33).

RESUMO

A síndrome de Kallmann (SK) envolve a associação de hipogonadismo hipogonadotrófico e anosmia. Esta é, provavelmente, uma síndrome heterogênea, havendo a descrição de diversos casos nos quais a síndrome parece ser herdada de modo autossômico dominante ou recessivo, ou recessivo ligado ao X. A incidência da SK é estimada em 1/10.000 indivíduos do sexo masculino e 1/50.000 indivíduos do sexo feminino; contudo, estudos entre pacientes com hipogonadismo mostram que esta é a forma mais freqüente de hipogonadismo resultante da deficiência de gonadotrofinas.

O *locus* determinante da síndrome de Kallmann ligada ao X, *KAL-1*, foi identificado e mapeado em Xp22.3, próximo ao gene da sulfatase de esteróides. Este gene possui 14 éxons e codifica uma proteína, a anosmina, cujo papel tem sido relacionado ao processo de migração de neurônios olfativos e liberadores de gonadotrofinas que ocorre durante a embriogênese. Apesar de ser reconhecida a existência de um ou mais *loci* em cromossomos autossômicos, sua localização permanece ainda desconhecida, existindo relatos de indivíduos com SK portadores de anomalias estruturais envolvendo os cromossomos 1,3,7,9,10,12 e 18.

Neste estudo, 15 pacientes com SK (12 homens e três mulheres) foram investigados citogeneticamente, utilizando técnicas de alta resolução e de hibridação *in situ* por fluorescência. A análise cromossômica não revelou qualquer rearranjo ou deleções cromossômicas maiores que pudessem auxiliar no mapeamento dos *loci* autossômicos da síndrome. Dentre os oito casos esporádicos de SK, em apenas um dos pacientes detectou-se uma microdeleção envolvendo o *locus KAL-1*, pela técnica de FISH. Nos casos famílias não foram detectadas microdeleções neste gene.

Dentre os casos familiais, que somam sete indivíduos na amostra analisada, duas famílias exibiam padrão de herança recessiva ligado ao X, sendo observadas características da SK que têm sido associadas à alterações no gene *KAL-1*, como agenesia renal e pés cavos. Duas outras genealogias mostraram segregação da síndrome compatível com herança autossômica dominante, com expressividade variável e penetrância incompleta.

ABSTRACT

Kallmann's syndrome (KS) is a disorder characterized by hypogonadotropic hypogonadism and anosmia. This is, probably, a genetically heterogeneous syndrome, with both autosomal and X-linked forms. The incidence of KS is estimated to be 1:10,000 in males and 1:50,000 females, although the of patients with hypogonadism have shown that is the most frequent form of hypogonadotropic hypogonadism.

A gene responsible for the X-linked form of Kallmann's syndrome has been identified and mapped in Xp22.3 *(KAL-1),* proximal to the steroid sulfatase gene. This gene contains 14 exons and codes for a protein, termed anosmin, that plays an important role in migration of the GnRH- and olfactory neurons during embryonic development. Although the existence of one or more autosomal *loci* is recognized, its localization remains unknown. There are reports of patients with chromosomal aberrations involving autosomes 1,3,7,9,10, 12 and 18.

In this study, 15 patients with KS (12 males and 3 females) were cytogenetically investigated with high-resolution techniques and FISH. Chromosomal analysis did not reveal any rearrangements or deletions that could be useful for the mapping autosomal *loci* of this syndrome. Among eight sporadic cases of KS, only one patient exhibited a microdeletion of the *KAL-1* gene, detected by FISH. No microdeletions were detected in the familial cases.

Seven familial cases of KS were studied. In two families a recessive X-linked inheritance pattern was observed and these patients exhibited other clinical features associated with mutations in the *KAL-1* gene, such as renal anomalies and pes cavus deformity. Segregation analysis in two other families showed autosomal dominant inheritance patterns, with incomplete penetrance and variable expressivity.

1. INTRODUÇÃO

1- Introdução

Em humanos, o início e a manutenção das funções reprodutivas são controlados pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), de origem hipotalâmica. Esse hormônio age na hipófise causando a liberação de hormônios gonadotróficos, hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), que atuam sobre os testículos e os ovários. Nos testículos, a secreção de LH estimula as células de Leydig a produzirem testosterona, enquanto o FSH estimula as células de Sertoli no processo de espermatogênese. Nos ovários, o LH atua sobre a ovulação e o FSH controla a produção de estrogénos e progesterona (Figura 1). Assim, as gonadotrofinas regulam o desenvolvimento das características sexuais primárias e secundárias de homens e mulheres, culminando na maturação sexual do indivíduo (PINSKY *et al.*, 1999).

A produção de andrógenos ocorre ainda nos testículos fetais, onde a testosterona é convertida a di-hidrotestosterona, que viriliza os rudimentos genitais externos de embriões masculinos. Nestes embriões, a secreção de andrógenos é controlada pela gonadotrofina coriônica até o final da primeira metade da gestação; a partir de então, esse estímulo é feito pelas gonadotrofinas hipofisárias do próprio feto, em especial o LH, que é, portanto, fundamental para a completa descida testicular bem como para o crescimento peniano (JOSSO, 1992).

Um déficit hipotalâmico na produção ou secreção de GnRH, consequentemente, leva à deficiência de esteróides sexuais, resultando em hipogonadismo hipogonadotrófico. Esta é uma condição geneticamente determinada e, na maioria dos casos, está relacionada a uma deficiência olfativa (anosmia ou hiposmia) caracterizando a chamada síndrome de Kallmann (SK). No entanto, alguns casos de hipogonadismo são relacionados a uma olfação normal, sendo diagnosticados como hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático (HHI). Ambas as entidades citadas podem ocorrer numa mesma família, sendo ainda controversa a idéia de que estas possam representar manifestações de um mesmo espectro clínico (WALDSTREICHER *et al.*, 1996) ou defeitos de campo de desenvolvimento distintos (DEAN *et al.*, 1990; QUINTON *et al.*, 1996a).

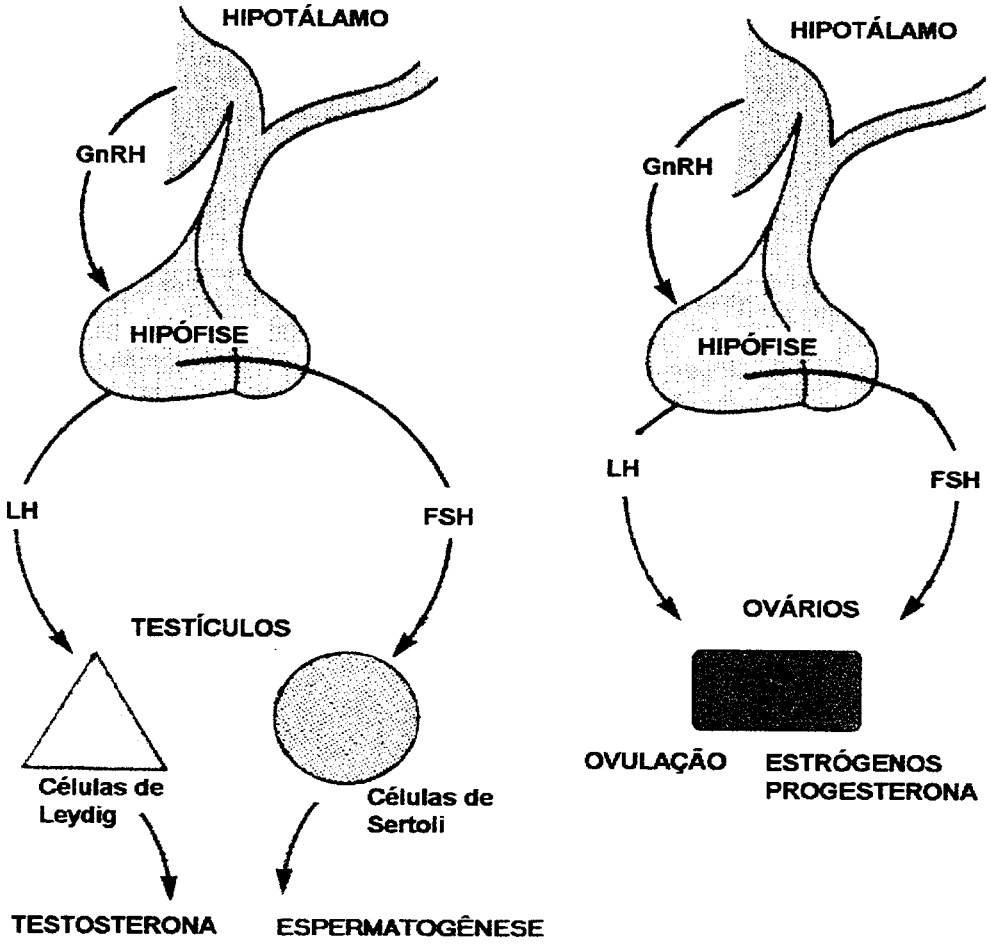


Figura 1 - Ilustração esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. À esquerda, estímulo pituitário sobre os testículos na liberação de testosterona e na produção de espermatozóides. À direita, atuação da hipófise sobre os ovários na liberação de esteróides sexuais. Em ambos os casos, a hipófise libera LH e FSH em resposta ao GnRH hipotalâmico.

1.1 - A Síndrome de Kallmann

Historicamente, a síndrome de Kallmann foi primeiramente descrita por MAESTRE DE SAN JUAN (1856). Entretanto, KALLMANN *et al.* (1944) foram os primeiros a assegurar a base genética de sua transmissão, sendo inicialmente estabelecida uma herança recessiva ligada ao X (MIM308700). Além deles, DE MORSIER (1954) descreveu sob o termo "displasia olfato-genital" uma série de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico nos quais foi detectada, na autopsia, agenesia de bulbos e tratos olfativos. Estudos subseqüentes de análise de segregação mostraram ainda padrões de herança autossômica dominante (MIM244200) e recessivo (MIM147950) em famílias acometidas pela síndrome, apesar de ter sido demonstrado que a maioria dos casos de SK é esporádica.

A heterogeneidade genética da síndrome é ilustrada pelo trabalho de HERMANUSSEM & SIPPEL (1985), que descreveram uma família com herança ligada ao X e outra com herança autossômica dominante. CHAUSSAIN *et al.* (1988), na tentativa de avaliar a freqüência dos diferentes modos de herança da síndrome, estudaram 38 indivíduos com hipogonadismo hipogonadotrófico com ou sem anosmia, pertencentes a 30 famílias distintas. Em 15 destas, foi observado um padrão de herança recessivo ligado ao X, enquanto que a transmissão patrilinear, sugerindo herança autossômica dominante, ocorreu em 12 genealogias. Em apenas três famílias o padrão de herança foi considerado autossômico recessivo. Numa outra avaliação, feita por WALDSTREICHER *et al.* (1996), as formas autossômicas de SK representaram mais de 80% de uma amostra de 36 casos familias da síndrome. Nesse mesmo trabalho, onde, no total, 106 pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico foram investigados, observou-se que 66% dos casos eram esporádicos.

A associação entre hipogonadismo e anosmia pode ser explicada por uma origem embrionária comum de neurônios olfativos e liberadores de gonadotrofinas. WRAY *et al.* (1989) demonstraram, por meio de estudos imunohistoquímicos e de hibridação *in situ* em camundongos, que estes neurônios provêm de células progenitoras da placa olfativa. No mesmo ano, SCHWANZEL & PFAFF observaram que, durante o desenvolvimento, estes neurônios migram através do septo nasal até alcançarem os bulbos olfativos e o hipotálamo.

Clinicamente, distúrbios nesta rota de migração poderiam explicar a deficiência de gonadotrofinas observada em SK. Esta hipótese foi confirmada por estudos anatomopatológicos realizados em um feto humano de 19 semanas afetado pela síndrome, onde foi observado um emaranhado anormal sobre a placa cribiforme formado pelo acúmulo de neurônios olfativos e secretores de GnRH na área nasal superior (SCHWANZEL *et al.*, 1989). Esses dados sugerem que o defeito embrionário observado em indivíduos com SK não envolve os processos iniciais de diferenciação de neurônios GnRH e olfativos; ao invés disso, propõem que este seja subsequente à elongação dos axônios olfativos e esteja associado à migração de neurônios GnRH.

Em adição às características cardinais da síndrome, indivíduos com SK podem ainda exibir diversas outras malformações como anomalias faciais leves (atresia e estenose coanal, fissura labiopalatina e hipertelorismo), anomalias neurológicas (sincinesia bimanual, nistagmo, agenesia do lobo olfativo e ataxia) e anomalias genitourinárias (agenesia renal unilateral, micropênis e criptorquidismo), sendo que a sincinesia bimanual e a agenesia renal têm sido relatadas apenas na forma da síndrome ligada ao X (BOULOUX *et al.*, 1994). Muitas famílias com SK exibem ainda uma variação fenotípica entre seus membros afetados, onde estes podem apresentar anosmia e/ou hipogonadismo. Deste modo, atribui-se uma expressão variável aos genes relacionados à doença, sendo tal variação mais extensa nas famílias com herança autossômica do que naquelas com síndrome de Kallmann ligada ao X (SKX). Além disso, a penetrância nem sempre é completa na SK, existindo o relato de gêmeos idênticos discordantes para o fenótipo da síndrome (HIPKIN *et al.*, 1990).

A incidência de SK foi estabelecida em 1/10.000 em indivíduos do sexo masculino e 1/50.000 em indivíduos do sexo feminino (JONES & KEMMANN, 1976). PAWLOWTZKI *et al.* (1987), investigando a freqüência da síndrome de Kallmann entre pacientes com hipogonadismo e pacientes com anosmia, mostraram que esta não é uma síndrome incomum. Eles observaram que, de 605 homens 46,XY com hipogonadismo hipogonadotrófico, 19 apresentavam anosmia associada (1/30) e que entre 24 pacientes com deficiência olfativa um tinha síndrome de Kallmann (1/24). Esses dados apóiam a observação de que a SK é a causa mais freqüente de hipogonadismo resultante de deficiência isolada de gonadotrofinas, podendo atingir um décimo da freqüência da síndrome de Klinefelter.

A maior parte dos casos de SK é diagnosticada na adolescência combinando-se achados clínicos de um pobre desenvolvimento puberal com baixos níveis de esteróides gonadais e de gonadotrofinas. Considera-se que o teste olfativo seja importante para diferenciar indivíduos com SK do hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático (ROSEN *et al.*, 1979), muito embora seja discutível a hipótese de que se tratem de entidades distintas. Em muitos casos, a realização de ressonância magnética pode auxiliar nesta diferenciação, pois evidencia a existência de aplasia ou hipoplasia de bulbos e lobos olfativos consistentes com o diagnóstico de SK (CASTILLO *et al.*, 1998). Contudo, alguns casos da síndrome não possuem alterações anatômicas visíveis em tais estruturas (DISSAVANETE *et al.*, 1998). O tratamento desses pacientes consiste em reposição hormonal, o que permite a progressão do desenvolvimento sexual dos pacientes na puberdade, e na administração de GnRH, quando é desejada a indução da fertilidade (KOUSTA *et al.*, 1996).

Ocasionalmente, pacientes com SK exibem fenótipos de outras síndromes distintas, também associadas ao cromossomo X, como ictiose, condrodisplasia "punctata", retardo mental e albinismo ocular (BALLABIO *et al.*, 1986; BALLABIO *et al.*, 1987; BICK *et al.*, 1989). Esta combinação é resultante da deleção de genes adjacentes, e representa um exemplo de uma síndrome de genes contíguos (Figura 2). Em alguns pacientes (METAXOTOU *et al.*, 1983; TIEPOLO *et al.*, 1980) uma translocação resultante de um pareamento anormal entre os cromossomos X e Y e de um evento de recombinação entre seqüências de alta homologia em Xp22.3 e Yq11.2 foi detectada (BALLABIO & ANDRIA, 1992). A caracterização molecular de tais pacientes, portadores de deleções e translocações envolvendo Xp22.3, permitiu a localização do gene *KAL-1*, num intervalo específico dessa região (BALLABIO *et al.*, 1989). Esta localização foi confirmada por análise de ligação utilizando-se o marcador CRI-S232, previamente mapeado em Xp22.3, em famílias com SKX (MEITINGER *et al.*, 1990) e pelo achado de uma deleção intragênica de 3,3 kb dentro do *locus KAL-1* em dois irmãos com a síndrome (BICK *et al.*, 1992).

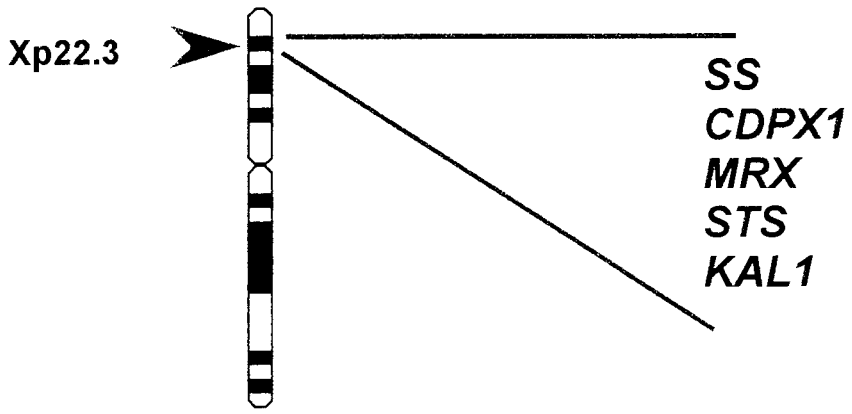


Figura 2 – Mapa mórbido da região Xp22.3 mostrando a posição dos genes *SS* (baixa estatura), *CPDX* (condrodisplasia punctata ligada ao X), *MRX* (retardamento mental ligado ao X), STS (sulfatase de esteróides) e *KAL-1* (síndrome de Kallmann)

Posteriormente, seguiu-se o isolamento e a clonagem do gene, mostrando que o *locus KAL-1* é formado por 14 éxons compreendendo cerca de 210 kb (FRANCO *et al.*, 1991; LEGOUIS *et al.*, 1991), para o qual foi identificado um homólogo não funcional em Yq11.2 (DEL CASTILLO *et al.*, 1992). O gene *KAL-1* é expresso por ambos X, ativo e inativo, sendo altamente conservado em espécies relacionadas como primatas e bovinos, mas não em roedores (INCERTI *et al.*, 1992; SAMONTE *et al.*, 1997).

O gene *KAL-1* codifica uma proteína de 680 aminoácidos, a anosmina, que possui forte homologia com moléculas envolvidas no desenvolvimento neuronal, incluindo um domínio rico em cisteína na porção aminoterminal, similar a estruturas previamente descritas em inibidores de proteases. A região carboxiterminal da proteína contém repetições de fibronectina do tipo III, domínios adesivos típicos de moléculas de matriz extracelular observados em várias moléculas com papel morforegulatório (FRANCO *et al.*, 1991). Tais características são consistentes com o papel putativo da proteína KAL no processo de migração neuronal que ocorre durante o desenvolvimento embrionário humano.

RUGARLI & BALLABIO (1993) propuseram um modelo patogênico para SK, onde a proteína KAL atuaria como mediador de interações entre os axônios dos neurônios olfativos e os dendritos das células mitrais essenciais para a morfogênese do bulbo olfativo. A ausência da proteína KAL funcional afetaria tais interações impedindo que o bulbo adquirisse sua estrutura normal acarretando, assim, a anosmia. Desde que os neurônios secretores de GnRH atravessam essa estrutura para alcançarem o hipotálamo, a falha em seu desenvolvimento seria um efeito secundário à ausência de uma rota normal de migração (Figura 3).

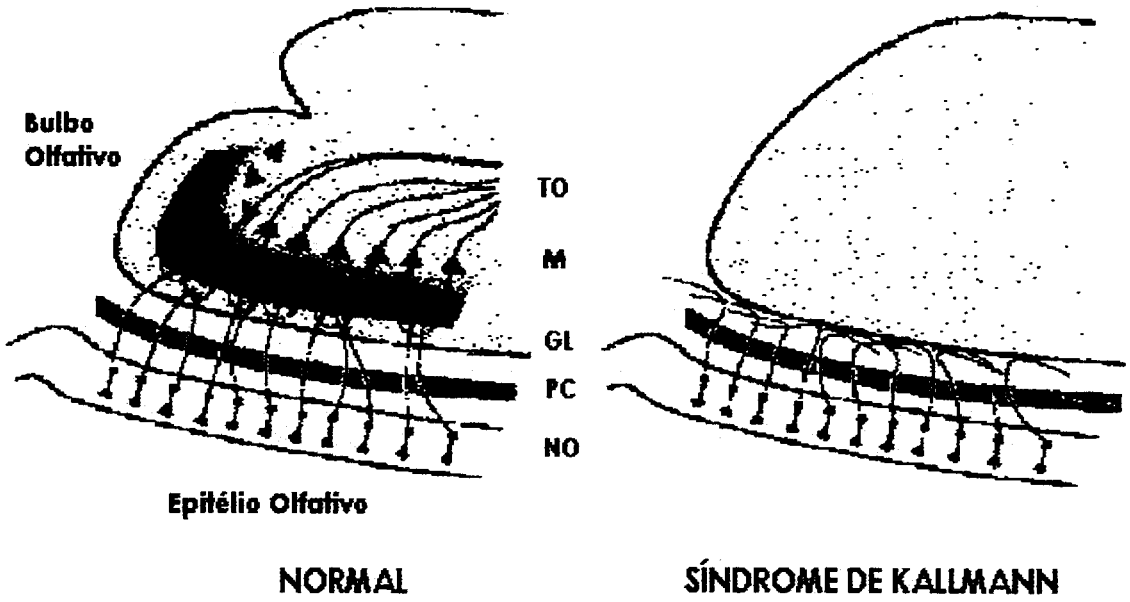


Figura 3 – Modelo patogênico da SK. Em um indivíduo normal os axônios dos neurônios olfativos (NO) atravessam a placa cribriforme (PC) para alcançar o bulbo olfativo. Dentro da camada glomerular (GL) do bulbo, eles fazem sinapse com dendritos das células mitrais (M), cujos axônios formam o trato olfativo (TO). Um modelo funcional para a proteína KAL propõe que esta é secretada pelas células mitrais sendo necessária para o estabelecimento/manutenção das interações dos axônios olfativos na camada glomerular. Em SK, a proteína estaria ausente; deste modo os axônios olfativos não poderiam interagir adequadamente com seu alvo, finalizando sua migração entre a placa cribriforme e o córtex cerebral (adaptado de RUGARLI & BALLABIO, 1993).

A caracterização do padrão de expressão do gene durante o desenvolvimento foi obtida quando um homólogo ao gene *KAL-1* foi identificado em galinhas (*KALc*). O produto deste gene mostra 77% de identidade de aminoácidos com a proteína humana e este valor aumenta em 20% quando são consideradas apenas as regiões que englobam os domínios funcionais da proteína KAL (RUGARLI *et al.*, 1993). Para detecção do transcrito *KALc*, estudos de "Northern Blot" e hibridação *in situ* foram realizados em embriões de galinha utilizando-se o cDNA do gene como sonda. Dentro do sistema olfativo, a expressão do gene foi inicialmente observada em células do bulbo olfativo, sendo também identificada nas células de Purkinje do cerebelo, nos primórdios do núcleo oculomotor, no mesênquima facial, no mesonefro/metanefro e na retina. Com esses resultados, a maioria dos sintomas ocasionais descritos em pacientes com síndrome de Kallmann, como disfunções cerebelares, sincinesia bimanual, nistagmo, palato fendido e agenesia renal, poderia ser atribuída a um mau funcionamento do gene nestas áreas que, em galinhas, expressam o gene *KALc* (LEGOUIS *et al.*, 1993).

SOUSSI-YANICOSTAS *et al.* (1998), usando linhagens celulares derivadas do epitélio olfativo de camundongos, demonstraram que a anosmina promove a adesão de diversos tipos celulares e funciona também como um substrato permissivo para o crescimento de neurites em neurônios cerebelares de camundongos. RUGARLI *et al.* (1996) observaram que, em sistemas de expressão celular *in vitro*, a proteína sofre clivagem proteolítica, formando um componente difusivo que se liga à superfície celular. Este dado sugere que a proteína KAL pode funcionar como uma molécula quimioatrativa para axônios olfativos.

Estudos recentes mostraram que a anosmina é um componente de membranas basais, encontrada também na matriz extracelular de vários tecidos. Sua presença foi detectada em matrizes epiteliais, mesenquimais, pré-cartilaginosas e tendinosas, entre outras. Entretanto, em vários sistemas, seu aparecimento parece estar restrito a estruturas específicas ou a períodos definidos do desenvolvimento embrionário. No sistema urinário, foi demonstrada a presença de anosmina nas primeiras etapas da nefrogênese de embriões humanos, a partir da 5ª semana de gestação. Esses achados sugerem que a aplasia renal observada em pacientes com síndrome de Kallmann seja resultante de agenesia do metanefro e não de um evento degenerativo posterior à sua organogênese (HARDELIN *et al.*, 1999).

Mutações de ponto são comumente observadas no *locus KAL-1* e, cada vez mais, surgem evidências da natureza heterogênea dessas mutações. HARDELIN *et al.* (1993), estudando uma amostra de 21 homens com SKX familial, identificaram nove portadores de mutações de ponto. Essas alterações determinaram a formação de mutações sem sentido e/ou mutações que alteram a matriz de leitura dentro da região codificadora do gene, sendo que a maior parte delas foi observada nos éxons 5, 6 e 9 e as demais envolviam um dos sítios de "splicing" do éxon 12. QUINTON *et al.* (1996b), investigando uma casuística de 27 indivíduos afetados pela SK, descreveram nove alterações no gene *KAL-1*, sendo que dessas mutações três eram, até então, desconhecidas. As novas mutações por eles descritas incluíam uma substituição de base no éxon 12, gerando um códon de parada prematuro e deleções dos éxons 1 e 11, cada deleção caracterizando uma mutação diferente.

GEORGOPOULOS *et al.* (1997), estudando 21 casos esporádicos de hipogonadismo hipogonadotrófico, observaram alteração do gene *KAL-1* em um paciente, consistindo tal alteração numa deleção de 14 pb no éxon 10 do gene. Os autores estudaram ainda três casos de SKX familial onde foram detectadas mutações no gene *KAL-1*, envolvendo os éxons 7, 8 e 11. GU *et al.* (1998) e IZUMI *et al.* (1999), realizando seqüenciamento direto do gene *KAL-1* em indivíduos com SKX, revelaram alterações no éxon 1, uma deleção de 11 pb e uma transição de base C $\rightarrow$ T, levando a uma mutação que altera a matriz de leitura e ao aparecimento de um códon de parada prematuro. O'NEIL *et al.* (1998), descreveram um indivíduo portador de uma mutação no gene *KAL-1* que resulta na remoção do sítio aceptor de "splicing" na junção do íntron5/éxon6.

O primeiro registro de mutação recorrente no gene *KAL-1* foi feito por MAYA-NUNES *et al.* (1998). Esses autores identificaram seis indivíduos não aparentados com a mesma alteração de base G $\rightarrow$ A no códon 514 do éxon 11 levando a uma alteração do aminoácido glutamina para lisina na cadeia polipeptídica correspondente. Esse achado pode indicar a existência de um "hot spot" nesta região do gene, ou que tal mutação seja derivada de um ancestral comum, por efeito de gene fundador.

Existem poucos casos relatados de síndrome de Kallmann devido a deleção completa do *locus KAL-1*, sendo a primeira descrição feita por HARDELIN *et al.* (1993b). Esses autores hibridaram o DNA genômico extraído de 20 pacientes com SKX familial com sondas para os *loci KAL-1* e *STS* (gene da sulfatase de esteróides, adjacente ao gene *KAL-1*) e outros marcadores localizados em Xp22.3. Em dois desses pacientes, nenhuma banda específica para o *locus KAL-1* pôde ser detectada, enquanto o sinal de hibridação para a sonda STS foi observado. Um estudo similar, realizado por QUINTON *et al.* (1996b), identificou mais dois pacientes com SKX familial portadores de deleções envolvendo apenas o gene *KAL-1*, concluindo-se, com esses relatos, que deleções maiores seriam raras em SK. De acordo com BALLABIO *et al.* (1989), sondas específicas para o *locus KAL-1* podem ser empregadas no estudo de suas alterações, incluindo-se sondas comerciais já disponíveis que são utilizadas na detecção de microdeleções deste gene pelo método de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). A aplicação desta técnica e seus princípios serão detalhados num tópico à parte.

Por outro lado, pouco se sabe sobre os mecanismos autossômicos da doença. No entanto, segundo GEORGOPOULOS *et al.* (1997), os genes autossômicos, comumente referidos como *KAL-2* e *KAL-3*, respectivamente relacionados aos padrões dominante e recessivo, parecem ser responsáveis pela maioria dos casos familiais da síndrome de Kallmann. Esta hipótese é baseada em uma estimativa feita a partir dos casos de SK familial em que a freqüência de mutações observadas no gene *KAL-1* é de apenas 11%, ficando ainda mais baixa, entre 5 e 8%, nos casos esporádicos de SK (WALDSTREICHER *et al.*, 1996).

Anomalias cromossômicas são raras em SK, existindo relatos isolados de: (1) mosaicismo celular em fibroblastos (46,XX/47,XX,+F) com cariótipo normal em linfócitos de sangue periférico em um indivíduo (JONES *et al.*, 1974); (2) a identificação de um pequeno cromossomo metacêntrico supranumerário em linfócitos de um paciente e sua mãe (VENTRUTO *et al.*, 1976); e (3) o achado de um pequeno cromossomo marcador, possivelmente derivado do grupo D ou G num outro paciente (BERGSTROM *et al.*, 1987).

O primeiro relato definitivo de anomalia cromossômica autossômica relacionada à SK foi feito por BEST *et al.* (1990). Os autores descreveram um paciente onde a análise cariotípica revelou a presença de uma translocação recíproca, 46,XY,t(7;12)(7pter→7q22::12q24→12qter;12pter→12q24::7q22→7qter). Anos mais tarde, CASAMASSIMA *et al.* (1993) relataram um outro paciente com fenótipo característico da síndrome de Kallmann, cujo estudo cromossômico revelou um rearranjo complexo entre os cromossomos 3, 9, 12, resultando no cariótipo: 46,XY,t(3;9)(9;12) (3pter→3q13.3::9q21.2→9pter;12qter→12q15::9p13→9q21::3q13→3qter;12pter→12q15::9 p13→9pter). SCHINZEL *et al.* (1995) descreveram o caso de um paciente pré-pubere com cariótipo 46,XY,der(1),(1pter→1q44::10q26→10qter) apresentando algumas manifestações fenotípicas da SK. Neste último, a hipótese de SKX foi afastada pelo diagnóstico molecular que demonstrou a ausência de mutações no *locus KAL-1*.

E, finalmente, KROISEL *et al.* (2000) relataram o achado de uma translocação cromossômica complexa entre os cromossomos 3, 13 e 18 em um paciente com SK, que ainda exibia uma inversão paracêntrica no braço longo do outro cromossomo 3. Neste paciente, a possiblidade de microdeleção do gene *KAL-1* foi excluída, uma vez que a região correspondente foi visualizada por FISH com sonda específica para o gene *KAL-1*. O cariótipo desse indivíduo foi descrito como 46,XY,inv(3)(q24q26.32),t(3;13;18)(q26.32;q21.2;q12.2), tendo os pontos de quebra sido determinados com o auxílio da técnica de pintura cromossômica.

Um fato importante a mencionar é que o estudo dessas alterações pode ser a chave para identificação do *locus* (*loci*) autossômico (s) mutante (s) envolvido (s) no aparecimento da SK, e essa análise torna-se muito mais precisa e acurada utilizando-se técnicas de citogenética de alta resolução. O próximo tópico dedica-se à descrição deste método.

1.2 - Citogenética de Alta Resolução

O padrão de bandas-G de cromossomos humanos visualizado em vários estágios da mitose demonstra que as bandas observadas em metáfase resultam da coalescência progressiva de numerosas bandas menores presentes nos cromossomos em fases tardias da prófase. Este fenômeno ocorre simplesmente devido ao processo de condensação cromossômica durante a divisão celular.

Deste modo, o uso de substâncias capazes de inibir a condensação cromossômica permite a obtenção de células em prófase e prometáfase, preparação de alta resolução, onde o número de bandas visualizado aumenta consideravelmente, variando de 550 a 850 podendo ser observadas até 1250 bandas por complemento haplóide (Figura 4).

Dos agentes empregados em técnicas citogenéticas de alta resolução o mais popular é o brometo de etídio (EtBr). Este se liga uniformemente ao longo de todo o cromossomo prevenindo, de forma homogênea, a condensação cromossômica (IKEUCHI, 1984). Dessa forma, postula-se que o EtBr se intercale entre as bases do DNA, causando alterações conformacionais em sua estrutura que impedem a colisão de fibras de cromatina e a ligação de proteínas necessárias à condensação cromossômica normal. Vários trabalhos descrevem ainda a utilização de agentes como 5-azacitidina (VIEGAS-PÉQUIGNOT & DUTRILLAUX, 1976), Hoechst 33258 (MARCUS *et al.*, 1979) e DAPI (SCHWEIZER *et al.*, 1980) com este propósito, contudo estes se ligam preferencialmente a pares de base específicos, levando a uma inibição diferencial da condensação ao longo do cromossomo.

Protocolos de sincronização também têm sido utilizados na obtenção de preparações citogenéticas de alta resolução. Nestes, as células são bloqueadas num estágio específico do ciclo celular, empregando-se drogas como metotrexato, excesso de timidina e fluorodesoxiuridina, seguindo-se de sua liberação e coleta da cultura em tempos apropriados.

Vários métodos de contagem tem sido descritos para estimar o número de bandas de uma preparação cromossômica. Estes consistem basicamente no uso de um ou mais cromossomos-índices ou regiões cromossômicas de referência para extrapolar o número total de bandas de uma metáfase (STALLARD & JOHNSON, 1983; JOSIFEK *et al.*, 1991). Em alguns métodos, a estimativa da resolução de bandas é feita multiplicando-se o número de bandas visualizado nos cromossomos-índices por um fator de correção (WELBORN & WELBORN, 1993).

A citogenética de alta resolução tem sido amplamente empregada na determinação exata de pontos de quebra cromossômica, no mapeamento genético e no estudo de síndromes associadas a microdeleções.

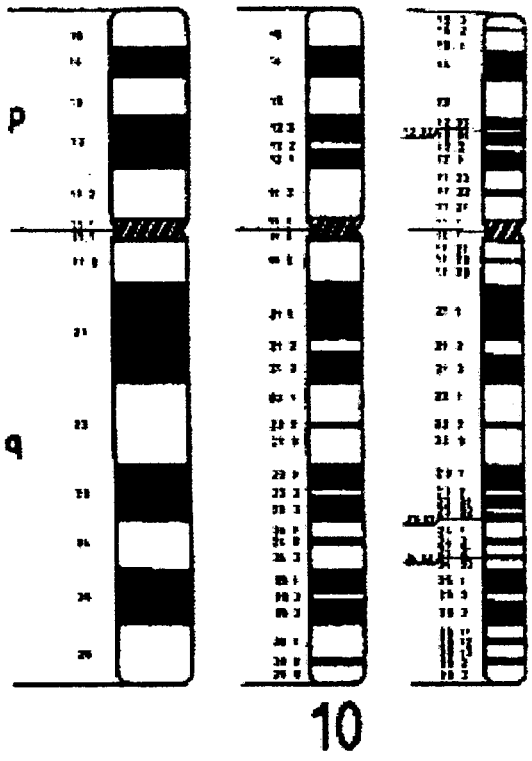


Figura 4 – Representação diagramática do cromossomo 10 com bandamento GTG em três diferentes graus de resolução de bandas. À esquerda, cromossomo 10 correspondente ao cariótipo haplóide com aproximadamente 400 bandas; e, ao centro e a direita, as figuras representam cariótipos de 550 e 850 bandas respectivamente (ISCN, 1995).

1.3 - Hibridação *in situ* por Fluorescência - FISH

Os ácidos nucléicos, DNA e RNAs, ocupam posições precisas nas células e tecidos, e um grande número de informações em potencial são perdidas quando estas moléculas são extraídas por homogeneização. Por esta razão, desenvolveram-se técnicas em que sondas de ácidos nucléicos são utilizadas para localizar seqüências complementares em preparações citológicas, um procedimento denominado hibridação *in situ*. Esta técnica pode ser aplicada sobre o DNA cromossômico fixado em lâminas ou RNA em tecidos. Seu uso é baseado nos estudos pioneiros de GALL & PARDUE (1969) que utilizaram sondas de RNA ribossômico 18S + 28S para identificação dos genes que codificam estas moléculas em *Xenopus laevis*, e de JONES (1970) que localizou seqüências de DNA satélites nas regiões heterocromáticas dos cêntromeros de cromossomos de camundongos.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, que tornou possível, ao menos em princípio, gerar sondas para qualquer gene de interesse, a aplicação do método de hibridação *in situ* se expandiu ao mapeamento de outras seqüências de DNA repetidas ou únicas no genoma. Os DNAs clonados podem ser empregados como sondas na identificação de moléculas de DNA ou RNA que possuam seqüências de bases que lhes são complementares. Essa identificação baseia-se na capacidade do DNA fita simples encontrar sua fita complementar e renaturar (ou hibridar) formando uma dupla hélice perfeita unida por pontes de hidrogênio. O DNA utilizado como sonda é primeiramente desnaturado e incubado com o DNA alvo, também previamente desnaturado. A mistura de ácidos nucléicos é então mantida a uma temperatura abaixo da temperatura de renaturação do DNA e "anelada". O "anelamento" refere-se ao processo de formação de híbridos moleculares que contêm fitas pareadas de diferentes origens biológicas, obtidos mediante o esfriamento lento de uma mistura de ácidos nucléicos desnaturados (Figura 5A).

Originalmente, a técnica de hibridação foi desenvolvida utilizando sondas de DNA marcadas radiativamente, geralmente com trítio H^3, que decai produzindo uma partícula β de baixa energia. A detecção de tais sondas é feita por auto-radiografia, procedimento para

localização de um radioisótopo dentro de uma amostra sólida, que envolve a produção de uma imagem em emulsão fotográfica contendo cristais de prata. Contudo, a resolução espacial obtida é limitada, pois a partícula β do átomo de trítio, ao desintegrar-se, viaja uma certa distância antes de alcançar os grãos de prata, formando um halo ao redor do sítio marcado com um raio de aproximadamente 0,5 μm (LARA, 1995).

Uma resolução muito melhor é obtida com sondas marcadas quimicamente ao invés de radiativamente. Uma dessas sondas é o DNA no qual a timina é substituída por uma uracila biotinilada. Os grupos laterais da biotina no DNA modificado não perturbam sua propriedade de emparelhamento, mas o tornam alvo para a proteína avidina, que é uma proteína que se liga com grande afinidade à biotina. Depois que o DNA biotinilado é hibridizado com o DNA nos cromossomos, a avidina marcada com fluoresceína é adicionada. Esta se une aos segmentos de DNA biotinilados e os torna fluorescentes. A intensidade da fluorescência pode ser aumentada juntando-se um anticorpo, específico para a avidina, marcado com fluoresceína (Figura 5B). Os segmentos cromossômicos assim marcados podem então ser visualizados em microscópio de fluorescência (THERMAN & SUSMAN, 1995).

O número de métodos destinados ao estudo de cromossomos mediante o uso de sondas não radiativas está aumentando rapidamente. Sondas de DNA contendo bromodesoxiuracila, digoxigenina, dinitrofenol e outros grupos laterais podem ser detectadas com anticorpos fluorescentes altamente específicos. Atualmente, análogos de nucleosídeos trifosfato diretamente conjugados com grupos fluorescentes (fluorocromos) em sondas de DNA ou de RNA estão sendo desenvolvidos; além disso, estão sendo sintetizados quimicamente nucleotídeos (ribo-ou desoxi-) marcados com uma ou mais moléculas de fluorocromos (Figura 5C). Essas sondas oferecem a vantagem de poderem ser visualizadas imediatamente após a lavagem pós-hibridação, eliminando a necessidade de se adicionar uma molécula fluorescente que se ligue à sonda; contudo, a intensidade do sinal obtido é de somente 10 a 15% daquela produzida por sondas equivalentes detectadas por reagentes secundários. Este fato não é problemático quando dispositivos digitais de captura de imagem são utilizados, semelhantes aos de câmeras CCD ("cooled charge device"), ou quando a microscopia convencional é assistida por computador (VERMA & BABU, 1995).

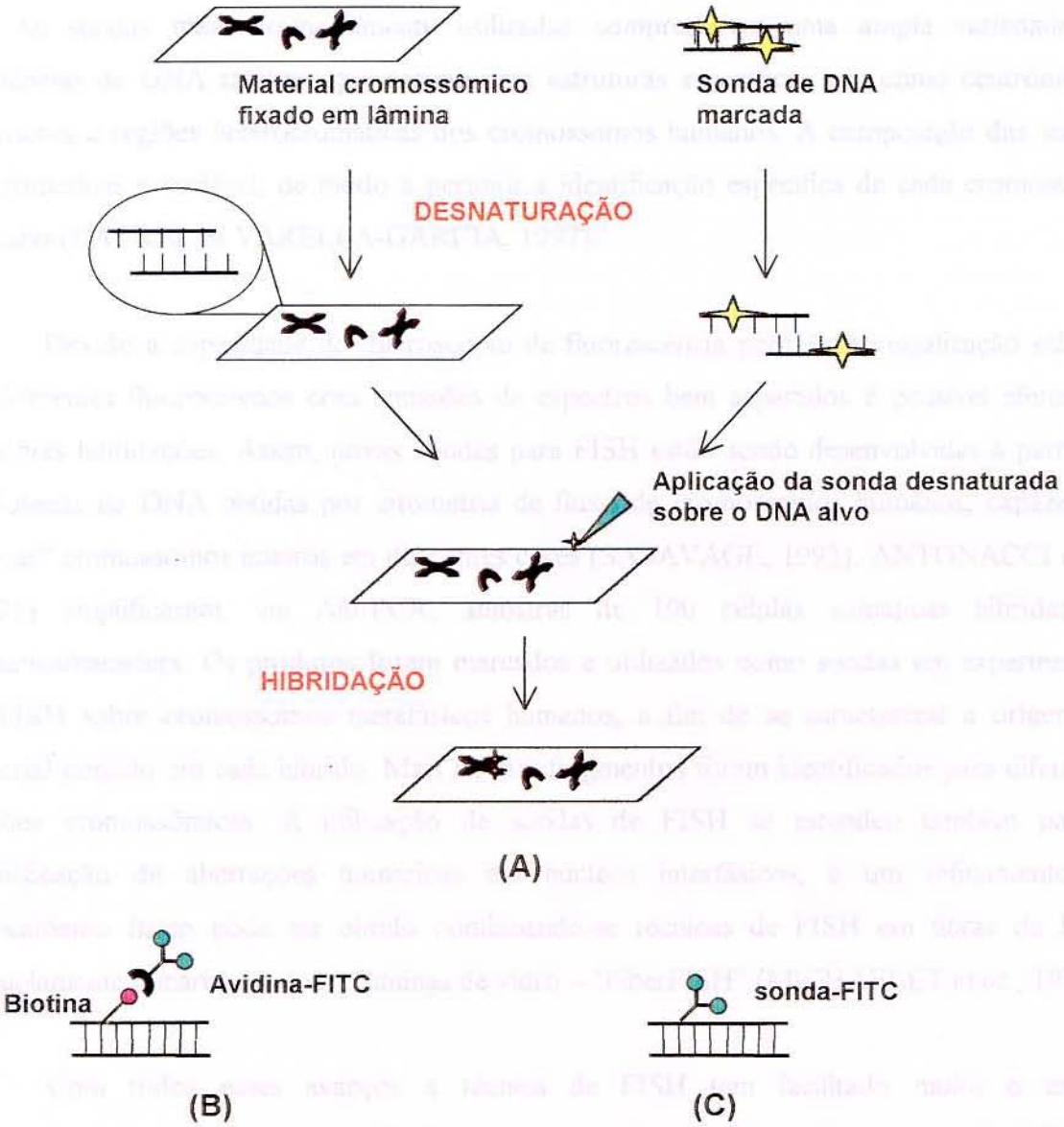


Figura 5 – Representação esquemática da técnica de FISH. (A) A sonda marcada e o DNA alvo são desnaturados e hibridados. O resultado é a marcação do segmento cromossômico complementar à sonda, que poderá então, ser visualizado ao microscópio de fluorescência. (B) Marcação indireta da sonda com biotina e detecção feita com avidina/FITC. (C) Exemplo de marcação direta, onde a sonda é diretamente conjugada ao fluorocromo.

Diversos tipos de sondas de DNA estão disponíveis comercialmente, tendo sido clonadas em plasmídeos, fagos e cosmídeos, que comportam insertos que variam entre 4 e 40 kb. As sondas mais extensivamente utilizadas compreendem uma ampla variedade de seqüências de DNA satélites que reconhecem estruturas específicas tais como centrômeros, telômeros e regiões heterocromáticas dos cromossomos humanos. A composição das sondas centroméricas é variável, de modo a permitir a identificação específica de cada cromossomo humano (HACKEL & VARELLA-GARCIA, 1997).

Devido à capacidade do microscópio de fluorescência permitir a visualização seletiva de diferentes fluorocromos com emissões de espectros bem separados é possível efetuar-se múltiplas hibridações. Assim, novas sondas para FISH estão sendo desenvolvidas a partir de bibliotecas de DNA obtidas por citometria de fluxo de cromossomos humanos, capazes de "pintar" cromossomos inteiros em diferentes cores (SASAVAGE, 1992). ANTONACCI *et al.* (1995) amplificaram, via Alu-PCR, amostras de 100 células somáticas híbridas de humanos/hamsters. Os produtos foram marcados e utilizados como sondas em experimentos de FISH sobre cromossomos metafásicos humanos, a fim de se caracterizar a origem do material contido em cada híbrido. Mais de 300 fragmentos foram identificados para diferentes regiões cromossômicas. A utilização de sondas de FISH se estendeu também para a identificação de aberrações numéricas em núcleos interfásicos, e um refinamento do mapeamento físico pode ser obtido combinando-se técnicas de FISH em fibras de DNA paralelamente linearizadas sobre lâminas de vidro – "FiberFISH" (MICHAELET *et al.*, 1997).

Com todos esses avanços a técnica de FISH tem facilitado muito o estudo citogenético, podendo ser utilizada na caracterização de rearranjos cromossômicos complexos, translocações crípticas, e na identificação de pequenos cromossomos marcadores, difíceis de se detectar pelas técnicas convencionais de bandamento (LE BEAU, 1996; DIE-SMULDERS *et al.*, 1999). Esta técnica também tem sido aplicada no diagnóstico de síndromes associadas a microdeleções, como mostrado na Figura 6.

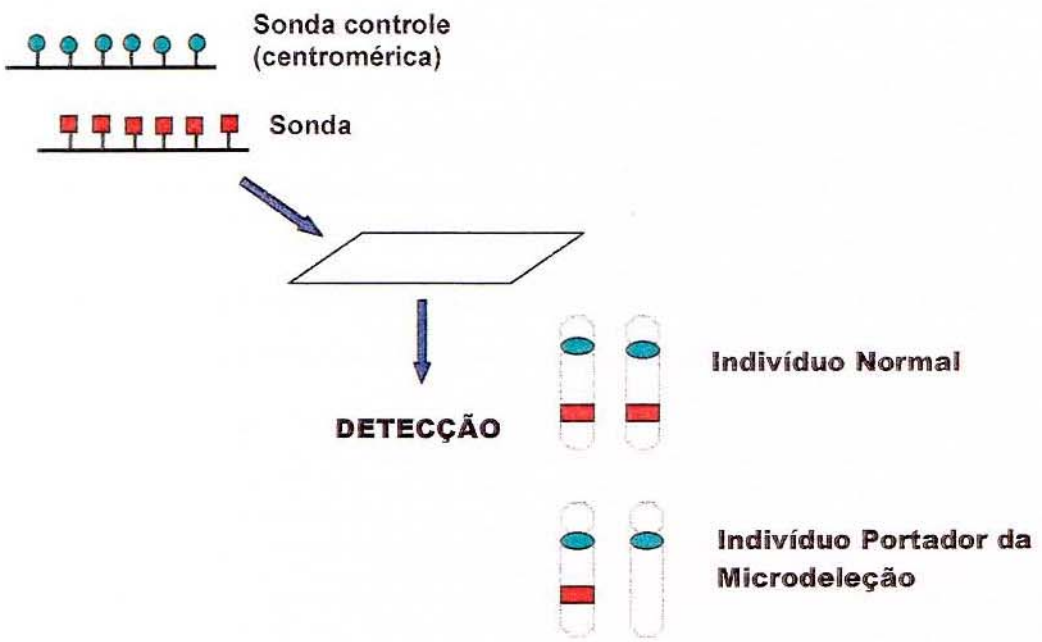


Figura 6 - Aplicação da técnica de FISH no diagnóstico de síndromes associadas a microdeleções. A sonda (sinal vermelho), específica para a região envolvida na determinação da síndrome, é hibridida com o material cromossômico do indivíduo. Se o indivíduo for normal, o sinal referente à sonda poderá ser visualizado; no caso de presença de microdeleção o mesmo não é detectado. Em geral, utiliza-se também uma sonda controle (sinal verde), específica para a região centromérica, que auxilia na identificação do cromossomo e serve como controle interno da reação.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- investigar a ocorrência de aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos de pacientes com síndrome de Kallmann, utilizando técnicas citogenéticas de alta resolução e

- determinar a freqüência de microdeleções na região Xp 22.3 por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) com a sonda específica para o gene *KAL 1*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1 - Casuística

Os 15 pacientes que compõem a casuística deste trabalho tinham diagnóstico confirmado de hipogonadismo hipogonadotrófico e sinais clínicos compatíveis com a síndrome de Kallmann, sendo 12 do sexo masculino e três do sexo feminino (Tabela I). Esses indivíduos foram atendidos nos ambulatórios de Endocrinologia e do GIEDDS (Grupo Interdisciplinar de Estudos de Determinação e Diferenciação do Sexo) do Hospital de Clínicas da UNICAMP, onde os critérios adotados no diagnóstico da síndrome de Kallmann foram: 1) sinais clínicos e sintomas de hipogonadismo; 2) baixos níveis de esteróides gonadais e de gonadotrofinas; - LH /FSH; 3) baixos níveis de testosterona total e livre; 4) teste de estímulo com GnRH; 5) imagem tomográfica normal do hipotálamo e hipófise para exclusão de tumor; 6) função tireoidiana normal.

Na avaliação clínica (Anexo I) os pacientes foram questionados quanto à história familiar e deficiência olfativa, sendo a anosmia referida em 66% dos casos. Nos casos com recorrência familial, a síndrome foi considerada como recessiva ligada ao X quando padrões clássicos desse tipo de herança foram observados: presença de no mínimo dois indivíduos afetados do sexo masculino, ausência de transmissão do caráter de pai para filho, ausência de mulheres afetadas e de consangüinidade.

O estabelecimento de herança ligada ao X foi possível nos pacientes SK-5 e 6 (Figura 7-A) e SK-7 e 8 (Figura 7-B). Apesar de não poder ser excluída herança autossômica pela análise de heredograma no primeiro caso, a observação de características clínicas que tem sido descritas apenas nos indivíduos com SKX, indica o envolvimento do gene *KAL-1* no estabelecimento da síndrome nesta família.

Nos casos SK-12 e 15 (Figura 8-A) e SK-13 (Figura 8-B), a história genealógica é fortemente sugestiva de padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta e expressidade variável. No primeiro heredograma, o propósito afetado pela SK, possui uma tia (SK-15) e um primo paternos afetados e no segundo, o caso índice (SK-13) possui mãe anósmica e irmã afetada pela SK.

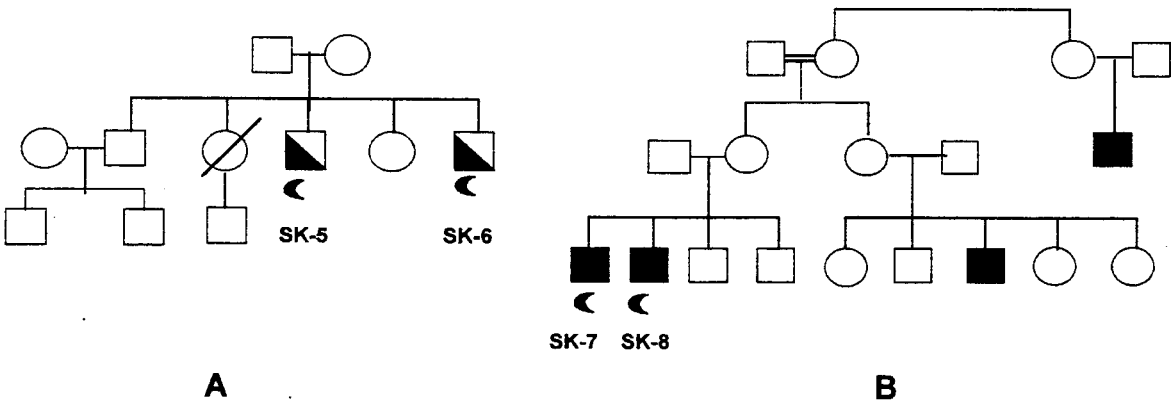
Tabela I – Resumo dos achados clínicos observados nos 15 pacientes estudados e provável modelo de herança nos casos onde ocorre recorrência familial da síndrome de Kallmann AP, atraso puberal; Mp, micropênis; Mc, microrquidia; Cp, criptorquidia; PSE, pêlos sexuais escassos; Gn, ginecomastia; Am, amenorréa primária; AD, autossômica dominante.

N	Sex.	Idad.	Anosm/ Hipos.	Carac. associadas ao hipogonadismo							Carac. adicionais	Herança
				AP	Mp	Mc	Cp	Gn	PSE	Am		
SK-1	M	34	-	+	+	+	+	+	+		Baixa estatura	Esporádico
SK-2	M	27	+	+	+	-	+	+	+		Palato alto	Esporádico
SK-3	M	24	+	+	+	+	-	-	+		*Pes cavos*	Esporádico
SK-4	M	27	+	+	+	+	+	-	+		Ataxia, hipertelorismo	Esporádico
SK-5*	M	35	-	+	+	-	+	+	+		Rim ectópico	Ligada ao X
SK-6*	M	28	-	+	+	-	+	-	-		Agenesia renal, Retardo mental	Ligada ao X
SK-7#	M	32	+	+	+	+	-	+	+		Agenesia renal, *Pes cavus*	Ligada ao X
SK-8#	M	28	+	+	+	+	+	-	+		Agenesia renal	Ligada ao X
SK-9	F	31	-	?					+	+	Baixa estatura	Esporádico
SK-10	F	26	+	+					-	+	osteoporose	Esporádico
SK-11	M	37	+	+	+	+	-	-	-			Esporádico
SK-12♣	M	16	+	+	+	-	+	-	+			AD?
SK-13	M	27	+	+	+	+	-	-	+			AD?
SK-14	M	17	-	+	+	-	+	+	+			Esporádico
SK-15♣	F	37	+	?					+	+		AD?

? – informação não disponível.

*/# pacientes pertencentes à mesma irmandade.

♣ pacientes pertencentes à mesma família (tia - SK-15 e sobrinho – SK-12)



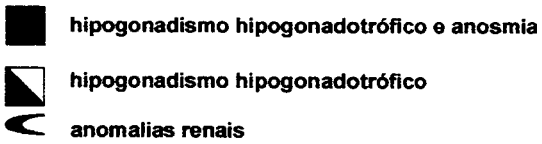
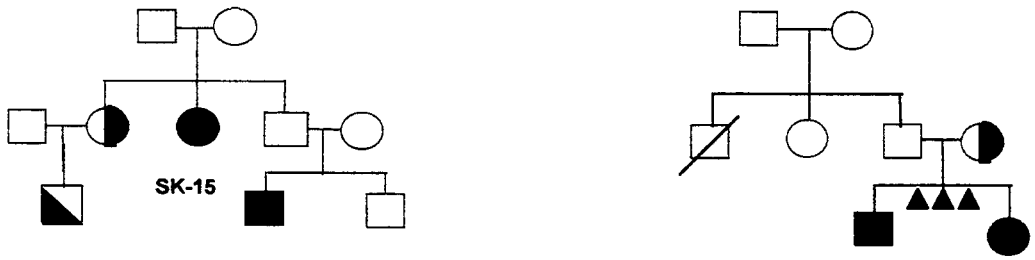


Figura 7 – Heredogramas dos pacientes SK-5 e 6 (A) e SK-7 e 8 (B), exemplificando o modelo de herança ligada ao X na síndrome de Kallmann.



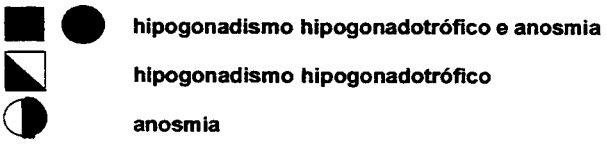


Figura 8 – Heredogramas dos pacientes SK-12 e 15 (A) e SK-13 e 8 (B), ilustrando provável modelo de herança autossômica da SK em nossa casuística.

Seguindo o protocolo de investigação do hipogonadismo, amostras de sangue foram colhidas dos pacientes e encaminhadas ao Laboratório de Citogenética Humana da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP para a realização de exames citogenéticos. As amostras foram utilizadas para a obtenção de material cromossômico por intermédio de cultivo de linfócitos, sendo as preparações utilizadas nas técnicas de FISH, para o estudo de microdeleções do gene *KAL-1*, e de bandamento GTG, para a identificação dos cromossomos e suas anomalias estruturais.

3.2 – Metodologia

Foram realizadas duas técnicas diferentes no cultivo de linfócitos para a obtenção de cromossomos prometafásicos: a) uma técnica utilizando o brometo de etídio e b) um protocolo de sincronização de células, bloqueando-se o ciclo com excesso de timidina. Ambas as técnicas foram utilizadas a fim de se evitar perda de material, que pode, eventualmente, ocorrer tanto em um quanto em outro procedimento.

3.2.1 – Técnicas de Cultivo de Linfócitos de Sangue Periférico

a) Técnica Citogenética de Alta Resolução com EtBr (YUNIS, 1976)

Coleta do Sangue:

Com seringa e agulha descartáveis previamente heparinizadas (0,1 mL de Liquemine), foram colhidos de 5-8 mL de sangue da veia do paciente após assepsia local com álcool 70%.

Procedimento de Cultura:

1. Foram preparados quatro frascos de cultura, contendo cada um 10 mL de meio RPMI-1640 completo suplementado com 20% de soro fetal bovino e 0,2 mL de fitohemaglutinina (pH para 6.8-7.0). Cada frasco foi devidamente etiquetado indicando o número do paciente e tempo de coleta; em todas as etapas do processo o material foi manipulado em condições assépticas, preferencialmente sob fluxo laminar.

2. Foi inoculado em cada frasco de 0,5 a 0,7 mL de sangue e incubado em estufa a 37°C.

Procedimento de Coleta das células:

1. Decorridas 70 horas foram adicionados10 μL de solução de EtBr (100μg/mL) aos tubos alcançando-se uma concentração final de 10μg/mL de meio e 2 gotas de colquicina (4 x 10^{-5}M) 30 minutos antes da coleta.

2. Terminado o período de incubação o conteúdo dos frascos de cultura foi transferido para um tubo cônico e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm.

3. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C para realização da hipotonia. Foi utilizada solução hipotônica de KCl 0,075M, previamente aquecida (37°C), sendo que foi acrescentado, a cada tubo, 1 mL dessa solução, por cinco vezes, com intervalos de 10 minutos. A cada acréscimo o sedimento foi ressuspenso delicadamente com pipeta Pasteur.

4. Após esse período foi adicionado cerca de 0,5 mL de fixador (3 metanol: 1 ácido acético) recém preparado para interromper a hipotonia. O material foi novamente centrifugado por mais 10 minutos a 900 rpm, descartando-se o sobrenante. O sedimento foi ressuspenso com pipeta Pasteur.

5. Aos tubos foram acrescentados 3 mL de fixador, misturando-se gentilmente a solução, e estes foram centrifugados por outros 10 minutos. Após a centrifugação, este procedimento foi repetido por mais três vezes.

Preparação das Lâminas:

1. Foram utilizadas lâminas limpas guardadas na geladeira em água destilada.

2. Com uma pipeta Pasteur a suspensão de células foi colhida (após a última lavagem, não foi adicionado fixador para que a solução ficasse bem concentrada) e 2 ou 3 gotas foram pingadas sobre uma lâmina levemente inclinada. A lâmina foi colocada em estufa a 38°C por 1-2 minutos até que estivesse seca.

3. Em cada lâmina foram marcados o número do paciente, o tipo de cultura, o número da lâmina e a data de sua preparação.

4. Preparadas às lâminas, o restante da suspensão foi guardado a –20°C adicionando-se um pouco de fixador em cada tubo e lacrando-o com PARAFILM-M. As lâminas que não foram utilizadas de imediato foram guardadas a 4°C.

b) Técnica de Alta Resolução por Sincronização de Células com Timidina e BrdU (Manoel Nunes, Instituto Pasteur de Paris, comunicação pessoal)

Procedimento de Cultura:

1. Foram preparados dois frascos de cultura, contendo cada um 10 mL de meio 199 completo suplementado com 20% de soro fetal bovino, 0,2 mL de fitohemaglutinina e 12,5 μL de tampão HEPES (pH final do meio: 6.8-7.0).

2. Em cada frasco foi inoculado de 0,5 a 0,7 mL de sangue e incubado em estufa a 37°C.

Bloqueio com Timidina:

1. Após 72 horas de incubação, foram adicionados em cada frasco 300 μL de timidina pura (concentração final de 10mg/mL de meio). Os frascos foram novamente levados à estufa e incubados durante a noite.

2. Ao mesmo tempo, um frasco de PBS foi colocado em banho-maria a 37°C para as lavagens e uma solução de BrdU: 5 mg de BrdU em 5 mL de água destilada estéril (10mg/mL) foi preparada.

Lavagem das Culturas:

1. Na manhã seguinte, a solução de BrdU foi diluída em 1:10 (1mg/mL de meio).

2. O sangue e o meio de cultura foram transferidos para tubos de centrífuga com rolha e centrifugados por 6 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e descartado.

3. Foram adicionados aos tubos 10 mL de PBS e misturado com auxílio de uma pipeta. Este material foi centrifugado por 3 minutos a 1.000 rpm; o sobrenadante foi aspirado e descartado repetindo-se esse procedimento por mais uma vez.

4. Ao sedimento, foram adicionados 100 mL de meio de cultura com 20% de soro fetal bovino pré-aquecido a 37°C e 200 μL de BrdU diluída, reincubando-se o material por mais 6 horas. Após esse período, foi adicionada uma gota de colquicina em cada tubo e estes foram incubados por 30 minutos. Em todas essas etapas o material foi manipulado no fluxo laminar.

Coleta das células e Preparação das Lâminas

Os procedimentos de coleta e preparo de lâminas foram realizados de acordo com a técnica habitual, como descrito no item anterior.

3.2.2 – Técnica de bandamento GTG – banda G-Tripsina-Giemsa

(DRETS & SHAW, 1971).

Foram preparados cerca de 300 mL de tampão fosfato, juntando-se as solução A e B na proporção de 1:1. O pH foi ajustado para 6,8. A solução tampão foi distribuída em três boréis, mantidos a temperatura ambiente, sendo que em um deles foi dissolvida 0,1 g de tripsina 1:250. Este borel foi deixado num banho-maria a 37°C.

As lâminas foram mergulhadas, uma de cada vez, no borel contendo tripsina e agitadas por 6-12 segundos (esse tempo foi ajustado de acordo com a qualidade das bandas obtidas). A seguir, as lâminas foram lavadas nos boréis com tampão e coradas utilizando-se solução de Giemsa diluída na proporção de 1:3 também tampão fosfato.

Preparação das Soluções:

Solução A: 14,2 g de fosfato dissódico anidro ($NaHPO_4$)/1000 mL de água destilada .

Solução B: 13,8 g de fosfato monobásico de sódio 10 H_2O71000 mL de água destilada.

3.2.3 - Hibridação *in situ* por Fluorescência

Preparação das Lâminas:

1. A área escolhida para a hibridação foi marcada com o lápis diamante sobre as lâminas contendo o espécime.

2. As lâminas foram imersas na solução de desnaturação por 5 minutos e desidratadas em uma série de etanóis (70, 85 e 100%), por 1 minuto cada e após foram secas em estufa (45-50°C).

Preparação das Sondas:

Foi adquirido um Kit para o estudo de microdeleções do gene *KAL-1*, incluindo uma sonda LSI Kallman SpectrumOrange, que se liga especificamente ao *locus KAL-1* em Xp22.3 e uma sonda controle para região centromérica do mesmo cromossomo (CEP X SpectrumGreen – *locus* DXZ1 em Xp11.1-q11.1). O tampão de hibridação e o corante DAPI/"Spectrumgreen and orange", foram adquiridos da mesma firma (Vysis Incorporation).

1. Os seguintes reagentes foram adicionados, para cada área de hibridação, num tubo de microcentrífuga: - 7 μL de tampão de hibridação
   - 1 μL da solução contendo as sondas
   - 2 μL de água milli-Q
2. O tubo foi centrifugado por 1-3 segundos, vortexado e centrifugado novamente. A seguir, foi colocado num banho-maria a 73°C por 5 minutos.
3. O tubo foi removido do banho e deixado no gelo até que seu conteúdo fosse aplicado sobre a lâmina.

Hibridação das Sondas aos DNAs alvos:

1. Foram aplicados 10 μL da sonda desnaturada sobre a área marcada que imediatamente foi coberta com lamínula de vidro.
2. As lâminas foram colocadas numa câmara úmida e incubadas a 37°C por 12-16 horas.

Lavagem e Detecção do Sinal:

1. Foram preparados três boréis ("1", "2" e "3") contendo solução de 50%formamida/2xSSC e deixados à temperatura ambiente.
2. Outros dois boréis, um contendo solução de 2xSSC e outro 2xSSC/NP40, foram preparados.
3. A lamínula foi removida e a lâmina foi imediatamente colocada no borel "1" da solução de 50%formamida/2xSSC e agitada por 3 segundos.

4. Após 10 minutos, a lâmina foi removida da solução e as etapas 3 e 4 foram repetidas utilizando-se os bóreis "2" e "3".

5. A lâmina foi colocada na solução de 2xSSC, agitada por 1-3 segundos. Após 10 minutos a lâmina foi removida e imersa na solução 2xSSC/NP-40, agitada por 1-3 segundos e retirada passados 5 minutos.

8. As lâminas foram deixadas secar em ambiente escuro para secarem. Em seguida, foram coradas com 10 μL da DAPI/"Spectrumgreen and orange" aplicados na área alvo e cobertas com lamínula de vidro. Após a aplicação do corante, as lâminas foram guardadas na geladeira.

Preparação das Soluções:

Solução de 20xSSC – Foram dissolvidos 132 g de 20xSSC em 500 mL de água destilada (pH 5,3).

Solução de 2xSSC – Foram diluídos 100 mL da solução de 20xSSC com 900 mL de água destilada (pH 7,0).

Solução de lavagem 2xSSC/0,1% NP-40 – Foram misturados 100 mL de 20xSSC com 899 mL de água destilada e adicionados 1 mL de NP-40 (pH 7,0).

Solução de desnaturação (70% formamida/2xSSC) – Foram misturados 49 mL de formamida, 7 mL de 20xSSC e 14 mL de água destilada em um borel (pH 7,0-8,0).

Soluções de etanol – As diluições foram preparadas volume/volume de etanol 100% com água destilada.

Solução de formamida para lavagem (50% formamida/20xSSC) – Foram misturados 105 mL de formamida, 21 mL de 20xSSC e 84 mL de água destilada (pH 7,0-8,0).

3.2.4 - Análise Citogenética

De cada paciente foram analisadas, quanto ao padrão de bandas G, 32 metáfases (400-550 bandas), para permitir, com probabilidade de 99,9%, a detecção de mosaicismo com pelo menos 20% de células anômalas (segundo tabela publicada em BEIGUELMAN, 1982) e oito prometáfases (550-850 bandas). As metodologias utilizadas para a estimativa da resolução de bandas das preparações analisadas foram as descritos por WELBORN & WELBORN (1993), que definem o número total de bandas pela soma das bandas do cromossomo 1 e 2 multiplicada por seis, e por STALLARD & JOHNSON (1983) que o fazem por interpolação da soma das bandas obtidas no cromossomo 10 (Tabela II).

A investigação de microdeleções pela técnica de FISH foi realizada utilizando-se uma sonda específica para o *locus KAL-1,* para a qual 30 metáfases foram observadas quanto à presença dos sinais relativos ao *locus* (sonda marcada com fluorocromo vermelho) e centrômero de X (sonda com fluorocromo verde). Se de 80 a 90% das metáfases exibiam ambos os sinais, concluía-se pela integridade do *locus KAL-1*.

As análises descritas foram realizadas em microscópio Olympus BX 60 acoplado a um sistema de captura de imagens da Cytovision™ da Applied Imaging Corporation.

Tabela II - Interpolação pela somatória do número (n°) de bandas visíveis no cromossomo (cr) 10 para determinação do nível de bandas de uma preparação cromossômica (STALLARD & JOHNSON, 1983).

n° bandas no cr 10	Nível de bandas	n° bandas no cr 10	Nível de bandas
12	375	31	625
13-14	400	32	650
15-16	425	33	675
17-18	450	34	700
19-21	475	35	725
22-23	500	36	750
24-25	525	37	775
26-28	550	38	800
29	575	39	828
30	600	40-41	850

4. RESULTADOS

Os resultados do exame de cariótipo e da análise de FISH para o *locus KAL-1* dos 15 pacientes encaminhados para investigação citogenética são apresentados na Tabela III. A maioria das células observadas apresentou número e estrutura de cromossomos aparentemente normais. Algumas anomalias cromossômicas foram detectadas (pacientes SK-3 e SK-9), contudo é provável que tais alterações não estejam associadas ao fenótipo dos pacientes, visto que as mesmas não foram observadas em mais que uma metáfase *in vitro*.

A tabela IV mostra uma análise comparativa entre as duas técnicas. Apesar de obter-se um estiramento cromossômico satisfatório com o emprego do EtBr, muitas vezes as preparações eram díficeis de serem analisadas devido ao alto grau de sobreposição dos cromossomos. Na técnica de sincronização (timidina + BrdU) a hipotonia foi mais eficaz, facilitando a análise, e um número maior de células em ínicio de divisão foi observado.

No paciente SK-2 não foi detectado o sinal referente ao *locus KAL-1* em Xp22.3 em 30 metáfases e em pelo menos 20 núcleos interfásicos examinados (Figura 9), o que indica uma microdeleção do gene. Nos demais pacientes, ambos os sinais foram visualizados em todas as células observadas. No anexo II, são apresentadas ilustrações das metáfases/cariótipos e imagens de FISH de todos os pacientes estudados.

Tabela III: Resultado dos cariótipos, descrevendo as alterações estruturais observadas, e da análise de FISH para o *locus KAL-1* (LSI Kallmann) e CEP-X.

Pacientes	Cariótipo	Alterações Cromossômicas Adicionais	FISH	
			LSI Kallmann	CEP-X
SK-1	46,XY		+	+
SK-2	46,XY		-	+
SK-3	46,XY	46,XY,+ace (1 metafáse) 46,XY,-8,+mar (1 metafáse)	+	+
SK-4	46,XY		+	+
SK-5	46,XY		+	+
SK-6	46,XY		+	+
SK-7	46,XY		+	+
SK-8	46,XY		+	+
SK-9	46,XX	46,XX,-9,+mar (1metafáse)	+	+
SK-10	46,XX		+	+
SK-11	46,XY		+	+
SK-12	46,XY		+	+
SK-13	46,XY		+	+
SK-14	46,XY		+	+
SK-15	46,XX		+	+

+ indica que o referente sinal foi visualizado
- ausência do sinal.

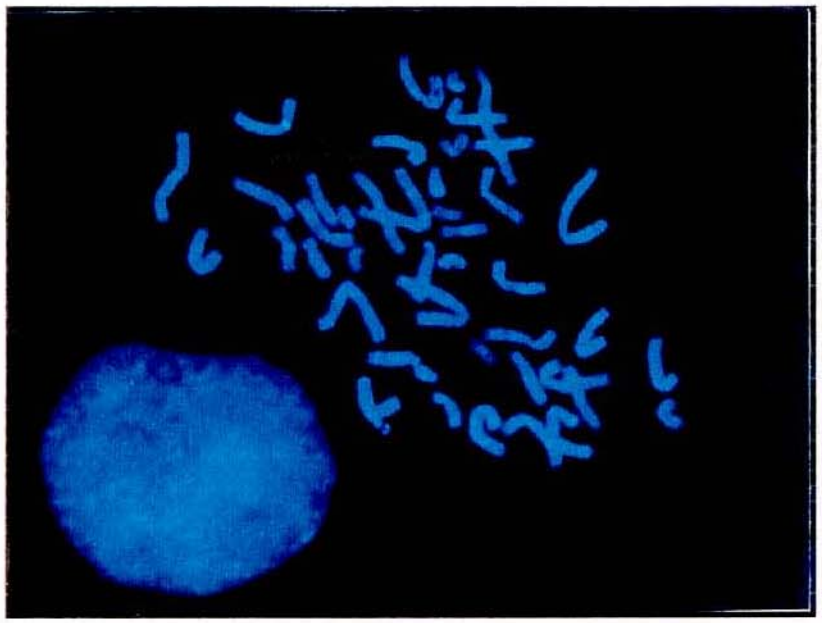
Tabela IV – Análise comparativa entre as técnicas utilizadas na obtenção das preparações cromossômicas.

Pacientes	Cultura					
	EtBr			Timidina + BrdU		
	1	2	3	1	2	3
SK-1	++	++	+++	++	+++	+++
SK-2	+++	+	++	+++	++	++
SK-3	+++	+	++	+++	+	+
SK-4	++	++	+	-	-	-
SK-5	++	++	+	++	++	++
SK-6	+++	+	+	++	++	++
SK-7	++	+	+	+++	++	++
SK-8	++	++	++	+++	++	+
SK-9	++	++	+++	+	++	++
SK-10	+	++	+	++	++	+
SK-11	++	+	+	+	++	+
SK-12	+++	+	+	++	+	++
SK-13	+	+	+	+	+	+
SK-14	++	+	++	+	++	++
SK-15	+++	++	++	++	++	++

1 – Estiramento cromossômico, 2 – hipotonia e 3 – cultura rica* em células em divisão.
- cultura não cresceu; + ++ bom; ++ regular; + ruim
* a cultura foi considerada rica quando três metáfases ou mais foram observadas na objetiva 40x.

5. DISCUSSÃO

A



B

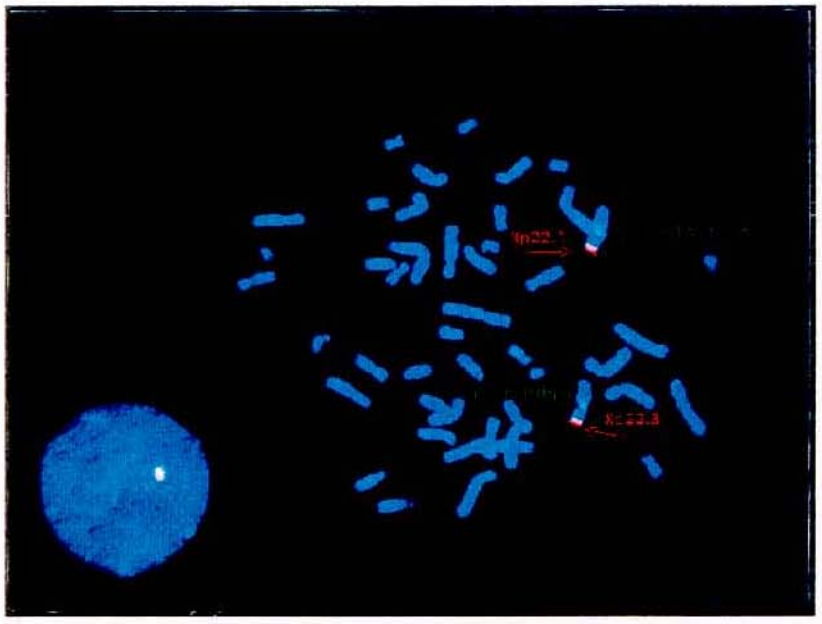


Figura 9 – Hibridação *in situ* por fluorescência utilizando sonda especifica para o *locus KAL-1* em Xp22.3 (sinal vermelho) e sonda centromérica controle CEP-X (sinal verde) realizada em cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos dos pacientes SK-2 e 9. Em (A) apenas o sinal referente ao centrômero de X pode ser visualizado (paciente SK-2), enquanto em (B) ambas as marcações estão presentes (paciente SK-9).

Em nossa casuística, oito, dos 15 pacientes estudados, representavam casos isolados na família. Desses pacientes, seis eram do sexo masculino e em apenas um (SK-2) foi identificada deleção completa do gene *KAL-1*. Tal alteração foi detectada por FISH utilizando sonda específica para o *locus KAL-1*, não sendo esta observável por meio de análise citogenética com bandamento GTG de cromossomos prometafásicos. Os demais pacientes também apresentaram cariótipo normal.

De fato, deleções semelhantes, não são grandes o suficiente para serem observadas por citogenética de alta resolução, nem mesmo quando envolvem a deleção de um gene adjacente (BALLABIO *et al.*, 1986). As microdeleções do gene *KAL-1* tem sido evidenciadas por meio de técnicas de "Southern blotting" e, em sua maioria, estão associadas à síndrome de genes contíguos (BALLABIO *et al.*, 1987; BICK *et al.*, 1989; MEINDL *et al.*, 1993; WEISSÖRTEL *et al.*, 1998). Em dois estudos, realizados por HARDELIN *et al.* (1993) e QUINTON *et al.* (1996), onde um total de 32 indivíduos do sexo masculino com SKX familial foram investigados, identificaram-se quatro pacientes portadores de deleção em Xp22.3 com remoção única do *locus KAL-1*. O primeiro relato prévio de um paciente com SK com microdeleção isolada do gene *KAL-1* detectado por FISH foi feito por HOU *et al.* (1999). O paciente descrito HOU *et al.* (1999) também apresentava outros indivíduos afetados na família.

O mecanismo mais provável para o aparecimento dessas deleções, pode ser decorrente da existência de seqüências repetidas localizadas em ambos os lados do gene *KAL-1* (BARDONI *et al.*, 1988). Estas seqüências podem se parear erroneamente durante a divisão celular e a ocorrência de um evento de recombinação homóloga entre essas regiões leva ao surgimento da deleção. Esse mecanismo tem sido proposto como o fator causal de deleções envolvendo o gene da sulfatase de esteróides, também localizado em Xp22.3, em indivíduos com icitiose ligada ao X (YEN *et al.*, 1990).

Levando em conta tais considerações, não pode ser descartada a possibilidade da mãe do paciente SK-2 ser portadora assintomática da mesma deleção observada no filho. Se esta hipótese for excluída, este seria o primeiro caso esporádico descrito de um paciente com SK devido a deleção completa do gene *KAL-1*. Para tal seria necessário realizar-se o estudo citogenético da mãe do paciente pela técnica de FISH.

O fato é que, independente de serem descritas em casos familiais ou esporádicos, as microdeleções em Xp22.3, envolvendo apenas o gene *KAL-1* em indivíduos com manifestação isolada de SK, parecem ser raras. No presente trabalho esta freqüência foi de 1/6 nos casos esporádicos do sexo masculino, sendo necessária a análise de um maior número de casos para o estabelecimento desta freqüência.

Foram estudados ainda quatro pacientes com SK e provável padrão de herança recessiva ligada ao X, pertencentes a duas genealogias distintas (SK-5 e 6; SK-7 e 8), para os quais não foram detectadas deleções do gene *KAL-1* pela técnica de FISH. Nesses indivíduos foram observadas anomalias renais, que, juntamente com sincinesia bimanual, palato alto, *pes cavus* e nistagmo, parecem se manifestar apenas em pacientes com SKX. Uma vez que não foram identificadas microdeleções nos pacientes aqui estudados, é possível que estes sejam portadores de mutações de ponto ou de pequenas deleções intragênicas somente detectáveis pela técnica de PCR.

A ocorrência de agenesia renal entre homens afetados pela SKX tem sido relatada em cerca de 35 a 50% dos casos (KIRK *et al.*, 1994; ZENTENO *et al.*, 1999), sendo que metade desses indivíduos apresenta mutações no gene *KAL-1*. Apesar desses achados corroborarem a hipótese de que o gene *KAL-1* possa contribuir com desenvolvimento renal, ainda não existe uma relação bem definida entre mutações neste gene e anomalias renais. COLQUHOUN-KERR *et al.* (1999), estudaram uma família com alta incidência de agenesia renal em presença ou ausência de mutações intragênicas de *KAL-1*, sugerindo a presença de um gene autossômico dominante (ou ligado ao X) que, juntamente com *KAL-1*, contribuem para a agenesia renal.

No indivíduo com microdeleção em Xp22.3 (SK-2), ao contrário de outros pacientes com SKX aqui estudados, o exame de ultra-sonografia de abdômen não mostrou a existência de anomalias renais, que também não são referidas no paciente estudado por HOU *et al.* (1999).

Nos casos familiais, onde a síndrome parece segregar como uma característica autossômica dominante com penetrância incompleta (SK-12 e 15, sobrinho e tia respectivamente) e expressividade variável (SK-13), não foram observadas alterações cromossômicas envolvendo autossomos ao exame de cariótipo, e, como esperado, foram excluídas as microdeleções em Xp22.3. Dessa forma, a análise citogenética em alta resolução realizada em tais casos não foi informativa em relação à identificação de um possível *locus* autossômico da síndrome de Kallmann.

A despeito da descrição de alguns casos de aberrações estruturais em cromossomos autossômicos, incluindo uma translocação envolvendo 7q22e 12q24 (BEST *et al.* 1990), um rearranjo cromossômico complexo entre os cromossomos 3, 9 e 12 com pontos de quebra em q13.3, q21.2p13 e q15 respectivamente (CASAMASSIMA *et al.* 1993) e um derivado do cromossomo 1 apresentando deleção de 1q44 com adição da região 10q26 (SCHINZEL *et al.* 1995), nenhuma informação conclusiva sobre a localização dos genes autossômicos para SK foi, até o momento, encontrada.

Segundo PERSSON *et al.* (1999) o diagnóstico da síndrome em alguns desses casos é contestável, já que as concentrações de FSH não são particularmente baixas, sendo inconsistentes com este diagnóstico. Além disso, não foram realizadas análises moleculares que pudessem excluir a participação do gene *KAL-1* na determinação da doença nos casos relatados por BEST *et al.* (1990) e CASAMASSIMA *et al.* (1993).

O mais recente relato do achado de uma translocação complexa envolvendo 3q26.32, 13q21.2 e 18q12.2, feito por KROISEL *et al.* (2000), indica outras possíveis regiões cromossômicas candidatas a portarem gene (s) autossômico (s) para a síndrome de Kallmann. Muito embora tal descrição seja extremamente interessante, cabe lembrar que, apesar da possibilidade de microdeleção em Xp22.3 ter sido excluída por análise em FISH, não foram investigadas mutações de ponto no gene *KAL-1* no paciente estudado.

É importante mencionar a relevância da análise citogenética no mapeamento gênico, na medida que restringe a localização dos genes a um determinado cromossomo, ou região cromossômica, dentro do genoma. Contudo, seu sucesso depende da ocorrência de eventos, relativamente raros, que levem ao aparecimento de aberrações cromossômicas citogeneticamente visíveis. A possibilidade de detecção dessas alterações aumenta consideravelmente quando são combinados resultados de estudo de citogenética convencional com os de análise citogenética molecular, sendo que um grande número de oncogenes foi clonados dessa forma.

Deste modo, seria interessante investigar a participação dessas regiões, em especial naqueles casos em que foi excluída a participação do *locus KAL-1* na determinação da síndrome, em pacientes com SK e cariótipo normal, por meio de técnicas de citogenética molecular. Esse estudo poderia ser realizado utilizando sondas de pintura cromossômica parcial que se encontram clonadas em YAC'S e BAC'S, específicas para diversas regiões do genoma humano, incluindo aquelas envolvidas nas alterações acima descritas.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi possível a identificação de apenas uma microdeleção do gene *KAL-1* por técnica de FISH dentre os oito casos esporádicos analisados, não sendo tal alteração detectada nos pacientes pertencentes a duas genealogias com provável padrão de herança recessivo ligado ao X ou nos demais casos familiais.

A análise citogenética em alta resolução, realizada em todos os pacientes analisados, não foi informativa quanto à localização de genes autossômicos da SK, já que alterações cromossômicas constitucionais não foram observadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONACCI, R.; MARZELLA, R.; FINELLI, P.; LONOCE, A.; FORABOSCO, A.; ARCHIDIACONO, N. & ROCCHI, M. A panel of subchromosomal painting libraries representing over 300 regions of the human genome. *Cytogenet Cell Genet* 68: 25-32, 1995.

BALLABIO, A. & ANDRIA, G. Deletions and translocation involving the distal short arm of the human X chromosome: review and hypothesis. *Hum Mol Genet* 1(4): 221-227, 1992.

BALLABIO, A.; SEBASTIO, G.; CARROZZO, R.; PARENTI, G.; PICCIRILLO, A.; PERSICO, M. G. & ANDRIA, G.; BICK, D.; CAMPBELL, L.; HAMEL, B.; FERGUSSON-SMITH, M. A.; GIMELLI, G.; FRACARRO, M.; MARASCHIO, P.; ZUFFARD, O.; GUIOLI, S. & CAMERINO, G. Contiguous gene syndrome due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 10001-10005, 1989.

BALLABIO, A.; SEBASTIO, G.; CARROZZO, R.; PARENTI, G.; PICCIRILLO, A.; PERSICO, M. G. & ANDRIA, G. Deletions of the steroid sulphatase gene in "classical" X-linked ichthyosis and in X-linked ichthyosis associated with Kallmann syndrome. *Hum Genet* 77: 338-341, 1987.

BALLABIO, A.; PARENTI, G.; TIPPETT, P.; MONDELLO, C.; DiMAIO, S.; TENORE, A. & ANDRIA, G. X-linked ichthyosis, due to steroid sulphatase deficiency, associated with Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia): linkage relationships with Xg and cloned DNA sequences from distal short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 72: 237-240, 1986.

BARDONI, B.; GUIOLI, S.; RAIMONDI, E.; HEILIG. R.; MANDEL, J. L.; OTTOLENGHI, S. & CAMERINO, G. Isolation and characterization of a family of sequences dispersed on the human X chromosome. *Genomics* 3(1): 32-8, 1988.

BEIGUELMAN, B. Citogenética humana. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 214-215, 1982.

BERGSTROM, R. W.; HANSEN, K. L.; CLARE, C. N. & KATZ, M. S. Hypogonadotropic hypogonadism and anosmia (Kallmann's syndrome) associated with a marker chromosome. *J Androl* 8: 55-60, 1987.

BEST, L. G.; WASDAHL, W. A.; LARSON, L. M. & STURLAUGSON, J. Chromosome abnormality in Kallmann syndrome. *Am J Med Genet* 35(3): 306-309, 1990.

BICK D.; FRANCO, B.; SHERINS, R. J.; HEYE, B.; PIKEL, L.; CRAWFORD, J.; MADDALENA, A.; INCERTI, B.; PRAGLIOLA, A.; MEITINGER, T. & BALLABIO, A. Intragenic deletion of the *KALIG-1* gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med.* 326: 1752-1755, 1992.

BICK, D.; CURRY, C. J. R.; McGILL, J. R.; SCHORDERET, D. F.; BUX, R. C.; & MOORE, C. M. Male infant with ichthyosis, Kallmann syndrome, chondrodysplasia punctata, and an Xp chromosome deletion. *Am J Med Genet* 33(1): 100-107, 1989.

BOULOUX, P. Congenital pituitary endocrine failure. Em: Shaw RW, ed. Hypothalamic pituitary dysfunction. New York: Parthenon; 17-33, 1994.

CASAMASSIMA, A. C.; WILMOT, P. L.; VIBERT, B. K. & SHAPIRO, L. R. Kallmann syndrome associated with complex chromosome rearrangement. *Am J Med Genet* 45(5): 539-541, 1993.

CASTILLO, G.G.V.; MOLINA, H. L.; GONZALEZ, L. B. & UIRBE, A. M. La resonancia magnética en el diagnóstico síndrome de Kallmann. Presentación de dos casos y revisión de la literatura. *Ginecol Obstet Mex* 66: 57-61, 1998.

CHAUSSAIN, J.L.; TOUBLANC, J. E.;FEINGOLD, J.; NAUD, C.; VASSAL, J. & JOB, J. C. Mode of inheritance in familial cases of primary gonadotropic deficiency. *Horm Res* 29: 202-206, 1988.

COLQUHOUN-KERR, J. S.; GU, W. X.; JAMESON, L.; WITHERS, S. & BODE, H. H. X-linked Kallmann syndrome and renal agenesis ocurring together and independently in a large australian family. *Am J Med Genet* 83: 23-27, 1999.

DEAN, J. S. C.; JOHNSTON, A. W. & KLOPPER, A. I. Isolated hypogonadotrophic hypogonadism: a family with autosomal dominant inheritance. *Clin Endocrinol* 32: 341-347, 1990.

DEL CASTILLO, I.; COHEN-SALMON, M.; BLANCHARD, S.; LUTFALLA, G. & PETIT, C. Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet* 2(4): 305-310, 1992.

DE MORSIER, G. Etudes sur les dysraphies cranio-encephaliques. 1. Agenesie de lobes olfactifs (telencephaloschizis lateral) et des commissures calleuse et anterieure (telencephaloschizis median). La dysplasie olfacto-genitale. *Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiatr* 74: 309-361, 1954.

DIE-SMULDERS, C. E.; ENGELEN, J. J.; ALBRECHTS, J. C & HAMERS, G. J. Detection of a cryptic translocation t(13;20) (q34;p13) in an unexplained case of MCA/MR: Value of FISH over high resolution banding. *Am J Med Genet* 86(4): 385-388, 1999.

DISSANEEVATE, P.; WARNE, G. L. & ZACHARIN, M. Clinical evaluation in isolated hypogonadotrophic hypogonadism (Kallmann syndrome). *J Pediat Endocrinol Metab* 11: 631-638, 1998.

DRETS, M. E. & SHAW, M. W. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 2073-2077, 1971.

FRANCO, B.; GUIOLI, S.; PRAGLIOLA, A.; INCERTI, B.; BARDONI, B.; TONLORENZI, R.; CARROZZO, R.; MAESTRINI, E.; PIERETTI, M.; TAILLON-MILLER, P.; BROWN, C. J.; WILLARD, H.; LAWRENCE, C.; PERSICO, M. G.; CAMERINO, G. & BALLABIO, A. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homolgy with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353: 529-536, 1991.

GALL, J. G. & PARDUE, M. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 378-383, 1969.

GEORGOPOULOS, N. A.; PRALONG, F. P.; SEIDMAN, C. E.; SEIDMAN, J. G.; CROWLEY, W. F. Jr & VALLEJO, M. Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82(1): 213-217, 1997.

GU, W. X.; COLQUHOUN-KERR, J. S.; KOPP, P.; BODE, H. H. & JAMESON, J. L. A novel aminoterminal mutation in the KAL-1 gene in a large pedigree with X-linked Kallmann syndrome. *Mol Genet Metab* 65(1): 59-61, 1998.

HACKEL, C. & VARELLA-GARCIA, M. Interphase cytogenetics using fluorescence *in situ* hybridization: an overview of its application to diffuse and solid tissue. *Braz J Genet* 20(1): 97-106, 1997.

HARDELIN, J.P.; LEVILLIERS, J.; BLANCHARD, S.; CAREL, J. C.; LEUTENEGGER, M.; PINARD-BERTELLETTO, J. P.; BOULOUX, P. & PETIT, C. Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* 2 (4): 373-377, 1993.

HARDELIN, J.P.; LEVILLIERS, J.; DelCASTILLO, I.; COHEN-SALMON, M.; LEGOUIS, R.; BLANCHARD, S.; COMPAIN, S.; BOULOUX, P.; KIRK, J.; MORAINE, C.; CHAUSSAIN, J-L.; WEISSENBACH, J. & PETIT, C. X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 41: 577-580, 1994.

HARDELIN, J.P.; JULLIARD, A. K.; MONIOT, B.; SOUSSI-YANICOSTAS, N.; VERNEY, C.; SCHWANZEL-FUKUDA, M.; LIEVRE, C. A-L & PETIT, C. Anosmin-1 is a regionally restricte component of basement membranes and interstitial matrices during organogenesis: implications for the developmental anomalies of X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Dev Dyn* 215: 26-44, 1999.

HERMANUSSEN, M. & SIPPELL, W.G. Heterogeneity of Kallmann's syndrome. *Clin Genet* 28: 106-111, 1985.

HIPKIN, L.J.; CASSON, I. F. & DAVIS, J. C. Identical twins discordant for Kallmann's syndrome. *J Med Genet* 27: 198-199, 1990.

HOU, J.W.;TSAI W.Y.; & WANG T. R. Detection of KAL-1 gene deletion with fluorescense *in situ* hybridization. *J Formos Med Assoc* 98(6): 448-451, 1999.

IKEUCHI, T. Inhibitory effect of ethidium bromide on mitotic chromosome condensation and its application to high resolution chromosome banding. *Cytogenet Cell Genet* 38: 56-61, 1984.

INCERTI, B.; GUIOLI, S.; PRAGLIOLA, A.; ZANARIA, E.; BORSANI, G.; TONLORENZI, R.; BARDONI B.; FRANCO, B.; WHEELER, D. & BALLABIO, A. Kallmann syndrome gene on the X and Y chromosomes: implications for evolutionary divergence of human sex chromosomes. *Nat Genet* 2(4): 311-314, 1992.

ISCN: An International System for Human Cytogenetics Nomenclature, F. Mitelman (ed); S. Karger, 1995.

IZUMI, Y.; TATSUMI, K.; OKAMOTO, S.; HOSOKAWA, A.; UENO, S.; FUKUI, H. & AMINO, N. A novel mutation of the KAL-1 gene in Kallmann syndrome. *Endocrinol J* 46(5): 651-658, 1999.

JONES, J. R. & KEMMANN, E. Olfacto-genital dysplasia in the female. *Obstet Gynecol Ann* 5: 443-446, 1976.

JONES, J. R.; KEMMANN, E.; CRESCI, J. & SOLISH, G. I. Anosmia and hypogonadism with ovarian mosaicism. *Am J Obstet Gynecol* 121: 991-994, 1974.

JONES, S. The chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* 225: 312-315, 1970.

JOSIFEK, K.; HAESSING, C. & PANTZART, T. Evaluation of the chromosome banding resolution: a simple guide for laboratory quality assurence. *Appl Cytogenet* 17: 101-104, 1991.

JOSSO, N. Hormonal regulation of sexual differentiation. *Semin Perinatol* 16: 279-288, 1992.

KALLMANN, F. J.; SCCHOENFFELD, W. A. & BARRERA, S. E. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic* 48: 203-236, 1944.

KIRK, J. M. W.; GRANT, D. B.; BESSER, G. M.; SHALET, S.; QUINTON, R.; SMITH, C. S.; WHITE, M.; EDWARDS, O. & BOULOUX, P. Unilateral renal aplasia in X-linked Kallmann's syndrome. *Clin Genet* 46: 260-262, 1994.

KOUSTA, E.; WHITE, D. M.; PIAZZI, A.; LOUMAYE, E. & FRANKS, S. Successful induction ovulation and completed pregnancy using recombinant human luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in a woman with Kallmann's syndrome. *Hum Reprod* 11(1): 70-1, 1996.

KROISEL, P. M.; PETEK E.; WAGNER, K. & KURNIK, P. Complex chromosomal translocation in a patient with kallman syndrome. *Am J Med Genet* 93(3):240, 2000.

LARA, F. J. S. Hibridação de ácidos nucléicos. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética: 36-38, 1995.

LE BEAU, M. M. One FISH, two FISH, red FISH, blue FISH. *Nat Genet* 12: 341-344, 1996.

LEGOUIS, R.; LIEVRE, C. A-L.; LEIBOVICI, M.; LAPOINTE, F. & PETIT, C. Expression of KAL gene in multiples neuronal sites during chicken development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2461-2465, 1993.

LEGOUIS, R.; HARDELIN, J-P.; LEVILLIERS, J.; CLAVERIE, J-M.; COMPAIN, S.; WUNDERIE, V.; MILASSEAU, P.; LePASLIER, D.; COHEN, D.; CATERINA, D.; BOUGUELERET, L.; DELEMARRE-VAN de WAAL., LUTFALLA, G.; WEISSENBACH, J. & PETIT, C. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67: 423-435, 1991.

MAESTRE de SAN JUAN A. Teratologia: falta total de los nervios olfactorios con anosmian en un individuo en quien existia un atrofia congentia de los testiculos y miembro viril. *El Siglo Med* 3:211, 1856.

MARCUS, M.; GOITEN, R. & GROPP, A. A condensation of all human chromosomes in phase G2 and early mitosis can be drastically inhibited by 33258-Hoechst treatment. *Hum Genet* 51: 99-105, 1979.

MAYA-NUNEZ, G.; ZENTENO, J. C.; ULLOA-AGUIRRE, A.; KOFMAN-ALFARO, S. & MENDEZ, J. P. A recurrent missense mutation in KAL gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1650-1653, 1998.

MEITINGER, T.; HEYE, B.; PETIT, C.; LEVILLIERS, J.; GOLLA, A.; MORAINE, C.; PICCOLA, B. D.; SIPPELL, W. G.; MURKEN, J. & BALLABIO, A. Definitive localization of X-linked Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia) to Xp22.3: close linkage to the hypervariable repeat sequence CRI-S232. *Am J Hum Genet* 47: 664-669, 1990.

METAXOTOU, C.; IKKOS, D.; PANAGIOTOPOULOU, P.; ALEVIZAKI, M.; MAVROU, A.; TSENGHI, C. & MATSANIOTIS, N. A familial X/Y translocation in a boy with ichthyosis, hypogonadism and mental retardation. *Clin Genet* 24: 380-383, 1993.

MICHAELET, X.; EKONG, R.; FOUGEROUSSE, F.; ROUSSEAUX, S.; SCHURRA, C.; HORNIGOLD, N.; SLEGTENHORST, M.; WOLFE, J.; POVEY, S.; BECKMAN, J. S. & BENSIMON, A. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 277(5): 1518-1523, 1997.

O'NEIL, M. J.; TRIDJAJA, B.; SMITH, M. J.; BELL, K. M.; WARNE, G. L. & SINCLAIR, A. H. Familial Kallmann syndrome: a novel splice acceptor mutation in the KAL gene. *Hum Mutat* 11(4): 340-342, 1998.

PAWLOWTZKI, H.; DIEKSTALL, P.; SCHADEL, A.; & MINY, P. Estimating frequency of Kallmann syndrome among hypogonadic and among anosmic patients. *Am J Med Genet* 26(2): 473-479, 1987.

PERSSON, J. W.; HUMPHREY, K.; WATSON, C.; TAYLOR, P.; LEIGH, D.; McDONALD, B. & FRASER, I. S. Investigation of a unique male and female sibship with Kallmann's syndrome and 46,XX gonadal dysgenesis with short stature. *Human Reprod* 14(5): 1207-1212, 1999.

PINSKY, L. ERICKSON, R. P. & SCHIMKE, R. N. Genetic disorders of human sexual development. New York, Oxford University: 41-42, 1999.

QUINTON, R.; DUKE, V. M.; ZOISA, P. A. & BOULOUX, P. M. G. The neurorobiology of Kallmann's syndrome. *J Br Fertil Soc* 1: 121-127, 1996a.

QUINTON, R.; DUKE, V. M.; ZOISA, P. A.; PLATTS, A. D.; VALENTINE, A.; KENDALL, B.; PICKMAN, S.; KIRK, J. M. W & BESSER, G. M. The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3010-3017, 1996b.

ROSEN, S. W.; GANN, P. G. & ROGOL, A. D. Congenital anosmia: detection thresholds for seven odorant classes in hypogonadal and eugonadal patients. *Ann Otol* 88: 288-292, 1979.

RUGARLI, E. I; GHEZZI, C.; VALSECCHI, V. & BALLABIO, A. The Kallmann syndrome gene product expressed in COS cells is cleaved on the surface to yeld a diffusible component. *Hum Mol Genet* 5(8): 1109-1115, 1996.

RUGARLI, E. I & BALLABIO, A. Kallmann syndrome: from genetics to neurobiology. *JAMA* 270: 2713-2715, 1993.

RUGARLI, E.; LUTZ, B.; KURATANI, S. C.; WAWERSIK, S.; BORSANI, G.; BALLABIO, A. & EICHELE, G. Expression pattern of the Kallmann syndrome gene in the olfactory system suggests a role in neuronal targeting. *Nat Genet* 4: 19, 1993.

SAMONTE, R.; CONTE, R. & VERMA, R. S. Comparative mapping of the human estrogen receptor (ESR) and the Kallmann (KAL) regions to the chromosomes of the great apes. *Am J Phys Anthropol* 103: 561-563, 1997.

SASAVAGE, N. Painting by the chromosome numbers. *J NIH Res USA* 4: 44-46, 1992.

SCHINZEL, A.; LORDA-SANCHEZ, I.; BINKERT, F.; CARTER, N. P.; BEBB, C.E.; FERGUNSON-SMITH, M. A.; EIHOLZER, U.; ZACHMANN, M. & ROBINSON. Kallmann syndrome in a boy with a t(1;10) translocation detected by reverse chromosome painting. *J Med Genet* 32(12): 957-961, 1995.

SCHWANZEL-FUKUDA, M. & PFAFF, D.W. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338: 161-164, 1989.

SCHWANZEL-FUKUDA, M.; BICK, D. & PFAFF, D. W. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in a inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol Brain Res* 6: 311-326, 1989.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27: 190-193, 1980.

SOUSSI-YANICOSTAS, N.; FAIVRE-SARRAILH, C.; HARDELIN, J-P.; LEVILLIERS, J.; ROUGON, G. & PETIT, C. Anosmin-1 underlying the X chromosome-linked Kallmann syndrome is an adhesion molecule that can modulate neurite growth in a cell-type specific manner. *J Cell Sci* 111: 2953-2965, 1998.

STALLARD, B. & JOHNSON, W. Non subjective method for estimating the resolution of banded chromosome. *Am J Hum Genet* 35: 155A, 1983.

THERMAN, E. & SUSMAN, M. Human chromosomes – structure, behavior and effects. 3 ed. New York, Spring-Verlag: 53-54, 1995.

TIEPOLO, L.; ZUFFARDI, O.; FRACARRO, M.; NATALE, D.; GARGANTINI, L.; MULLER, C. R.; ROPERS, H-H. Assignment by deletion mapping of the steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to Xp223. *Hum Genet* 54: 205-206, 1980.

VENTRUTO, V.; CALI, A.; FARINA, L.; FESTA, B.; RICCIARDI, I. & SEBASTIO, L. A case of hypogonadotrophic hypogonadism with anosmia (Kallmann's syndrome) in a male, with familial incidence of a small metacentric chromosome (47,XY,mat?+). *J Med Genet* 13: 71-75, 1976.

VERMA, R. S. & BABU, A. Human chromosomes – principles and techniques. 2 ed. New York, McGraw-Hill: 184-191, 1995.

VIEGAS-PEQUIGNOT, E. & DUTRILLAUX, B. Segmentation of human chromosomes induced by 5-ACR (5-azacytidine). *Hum Genet* 34: 247-254, 1976.

WALDSTREICHER, J.; SEMINARA, S. B.; JAMESON, J. L.; GEYER, A.; NACHTIGALL, L. B.; BOEPPLE, P. A.; HOLMES, L. B. & CROWLEY, W. F Jr. The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 81(12): 4388-4395, 1996.

WEISSÖRTEL, R.; STROM, T. M.; DÖRR, H. G.; RAUCH, A. & MEITINGER, T. Analysis of an interstitial deletion in a patient with Kallmann syndrome, X-linked ichthyosis and mental retardation. *Clin Genet* 54: 45-51, 1998.

WELBORN, I. & WELBORN, R. Banding resolution of human chromosomes: a method of accuracy and simplicity. *Am J Med Genet* 47: 1180-1183, 1993.

WRAY, S.; GRANT, P. & GAINER, H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8132-8136, 1989.

YEN, P. H.; LI, X-M.; TSAI, S. P.; JOHNSON, C.; MOHANDAS, T. & SHAPIRO, L. J. Frequent deletion of the human X chromosome distal short arm result from recombinantion between low copy repetitive elements. *Cell* 61: 603-610, 1990.

YUNIS, J. High resolution of human chromosomes. *Science* 191: 1268-1270, 1976.

ZENTENO, J.C.; MÉNDEZ, J. P.; MAYA-NUNEZ, G.; ULLOA-AGUIRRE, A. & KOFMAN-ALFARO. Renal abnormalities in patients with Kallmann syndrome. *BJU Int* 83(4): 383-386, 1999.

8. ANEXOS

ANEXO I

AVALIAÇÃO CLÍNICA DIRIGIDA – SÍNDROME DE KALLMANN

Nome:_____ **Idade:** _____
DGM: _____
Médico: _____ **Data:** ____/____/____

CARACTERISTICAS CLÍNICAS:

	SIM	NÃO
- HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO	[ ]	[ ]
- AMENORREIA PRIMÁRIA	[ ]	[ ]
- ATRASO PUBERAL	[ ]	[ ]
- ASPECTO EUNUCÓIDE	[ ]	[ ]
- BAIXA ESTATURA	[ ]	[ ]
- GINECOMASTIA	[ ]	[ ]
- PÊLOS SEXUAIS ESCASSOS	[ ]	[ ]
- MICROPÊNIS	[ ]	[ ]
- CRIPTORQUIDIA	[ ]	[ ]
- MICRORQUIDIA	[ ]	[ ]
- ANOSMIA/ HIPOSMIA	[ ]	[ ]
- SINCINESIA BIMANUAL	[ ]	[ ]
- ATAXIA	[ ]	[ ]
- NISTAGMO	[ ]	[ ]
- RETARDO MENTAL	[ ]	[ ]
- HIPOACUSIA	[ ]	[ ]
- HIPERTELORISMO	[ ]	[ ]
- PALATO ALTO/ OGIVAL	[ ]	[ ]
- FISSURA LABIO-PALATINA	[ ]	[ ]
- PÉS CAVOS	[ ]	[ ]
- ANOMALIAS CARDIACAS CONGÊNITAS	[ ]	[ ]
- ATRESIA /ESTENOSE DE COANAS	[ ]	[ ]
- AGENESIA RENAL UNILATERAL _____	[ ]	[ ]
- AGENESIA DO LOBO OLFATÓRIO	[ ]	[ ]

- OUTRAS: _____
_____

ANTECEDENTES FAMILIARES.

- Recorrência familiar de problema semelhante:
_____
_____
_____

- Genealogia:

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

- Níveis hormonais: FSH _____

LH _____

Testosterona Total _____

Testosterona Livre _____

Estradiol _____

Prolactina _____

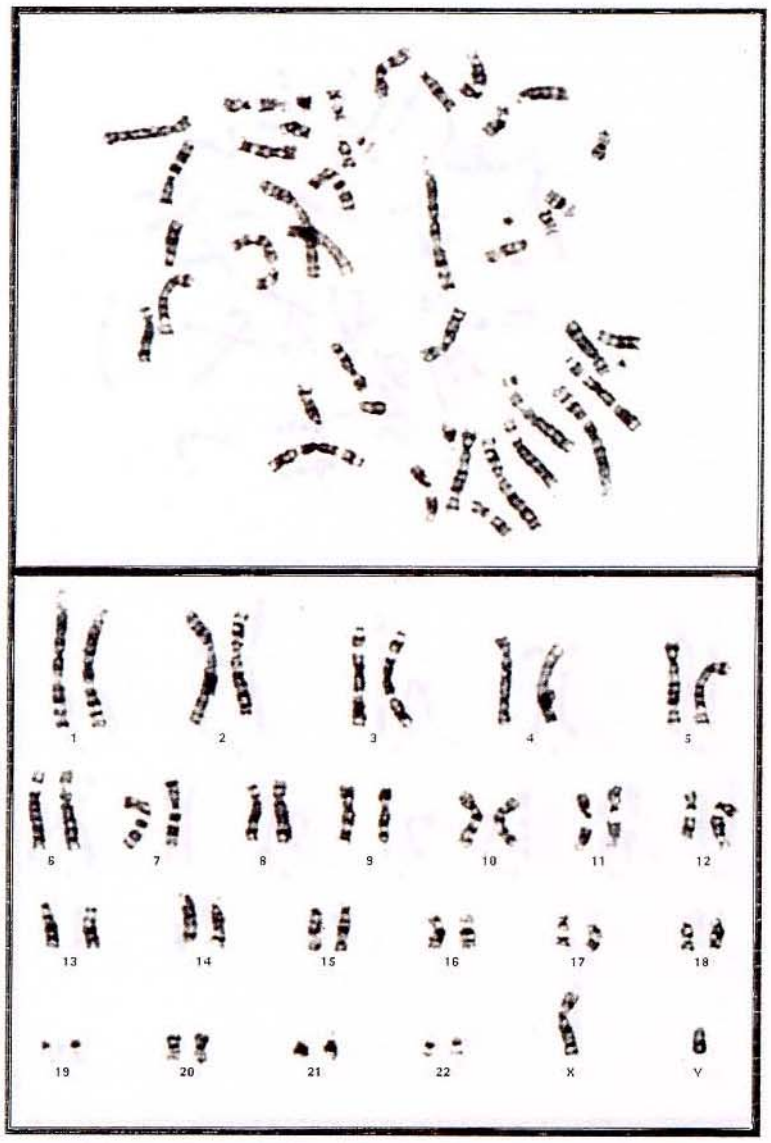
- Teste de estímulo com LH-RH (hormônio liberador de hormônio luteinizante)

Tempo (minutos)	LH (mUI/mL)	FSH (mUI/mL)
0		
15'		
30'		
45'		
60'		

OBSERVAÇÕES:

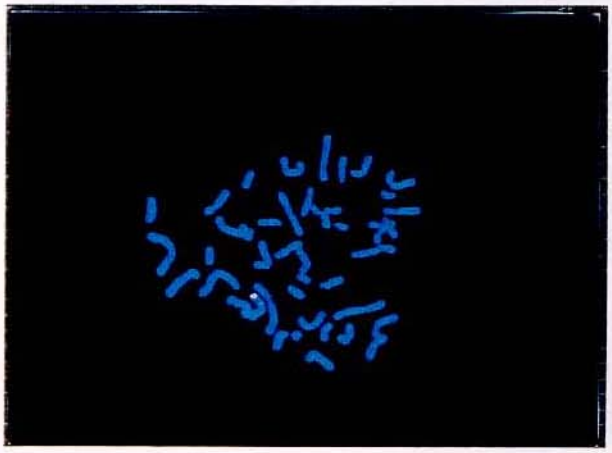
_____
_____
_____
_____
_____
_____.

ANEXO II

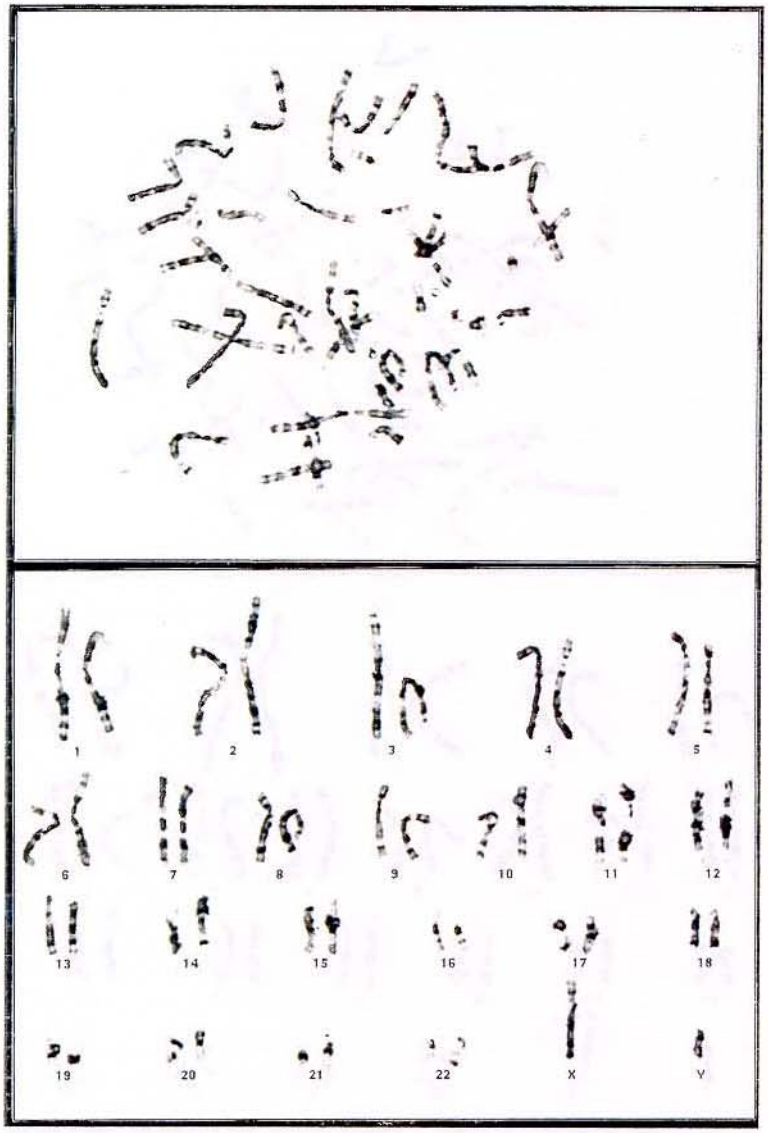


Paciente: SK-1
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 400 bandas por complemento haplóide.

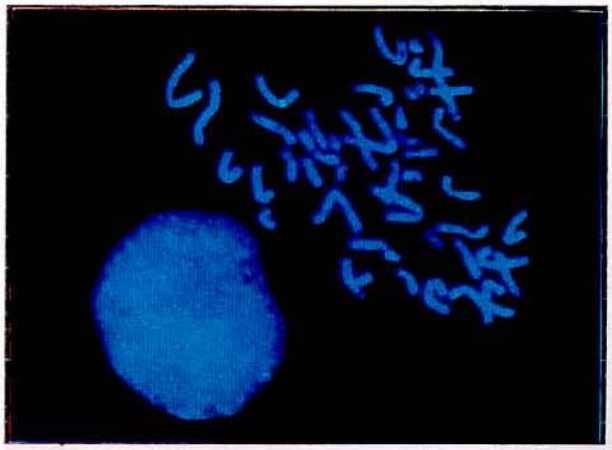


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

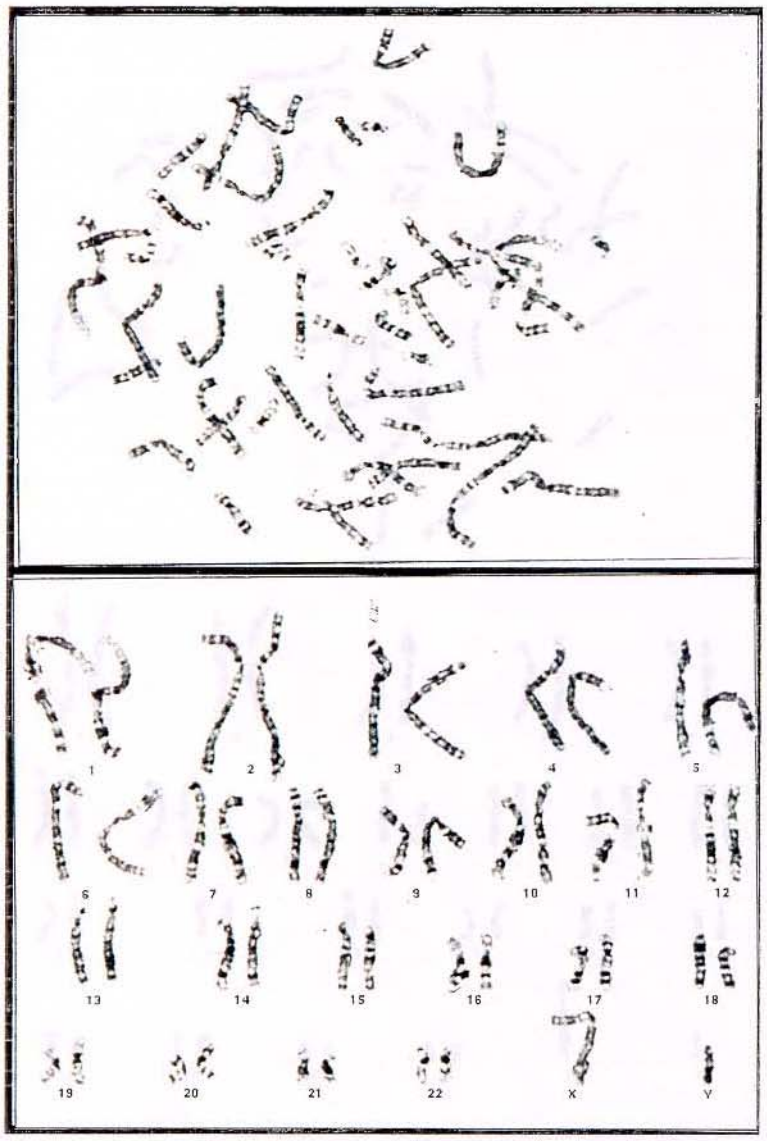


Paciente: SK-2
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 475 bandas por complemento haplóide.

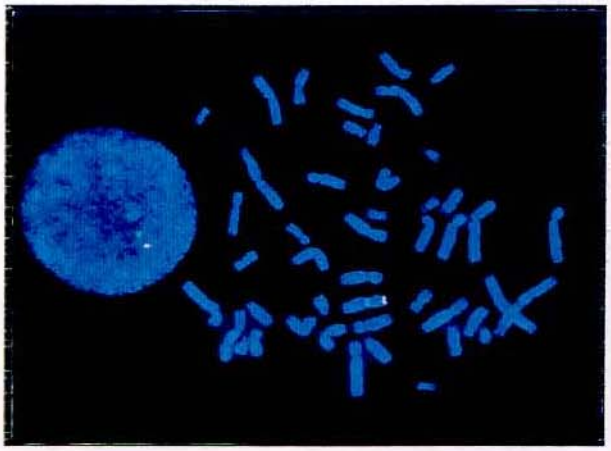


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde). Neste paciente foi detectada microdeleção em Xp22.3 (note ausência do sinal referente ao gene *KAL-1*).

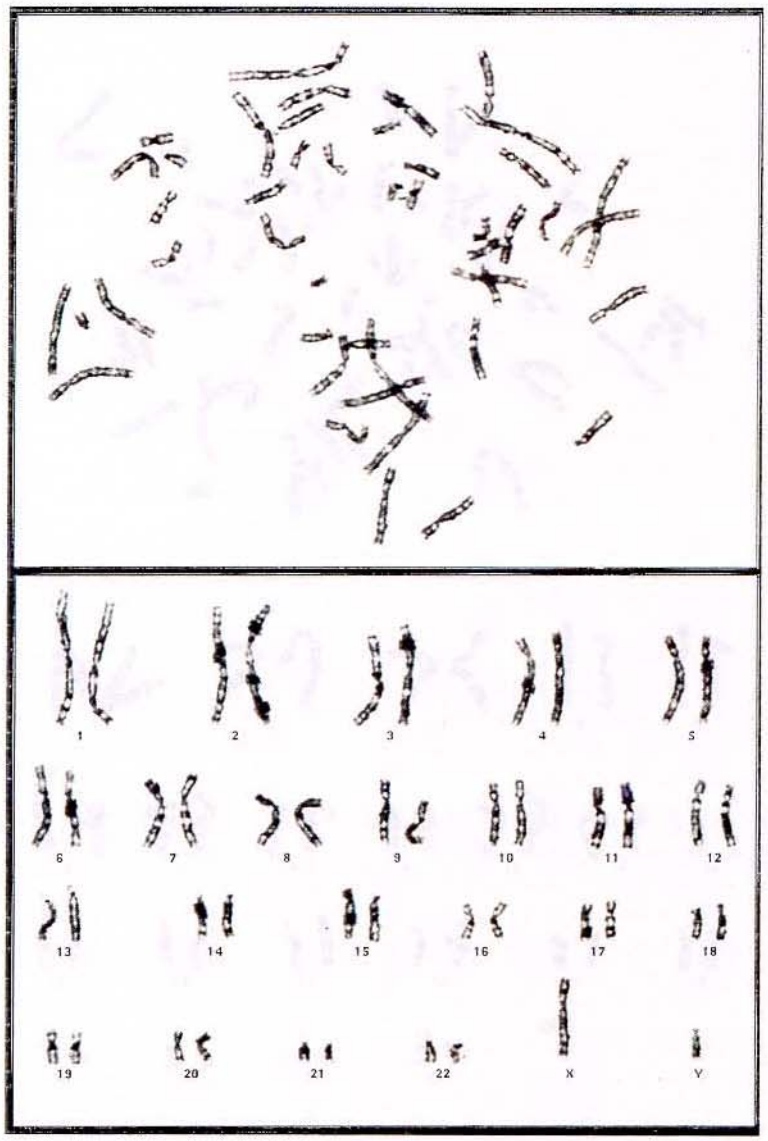


Paciente: SK-3
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 550 bandas por complemento haplóide.

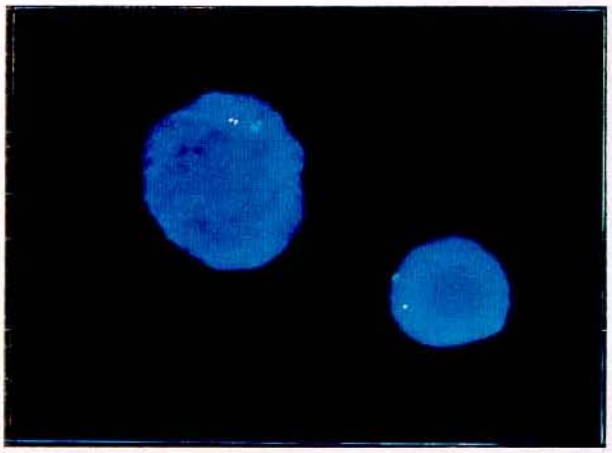


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

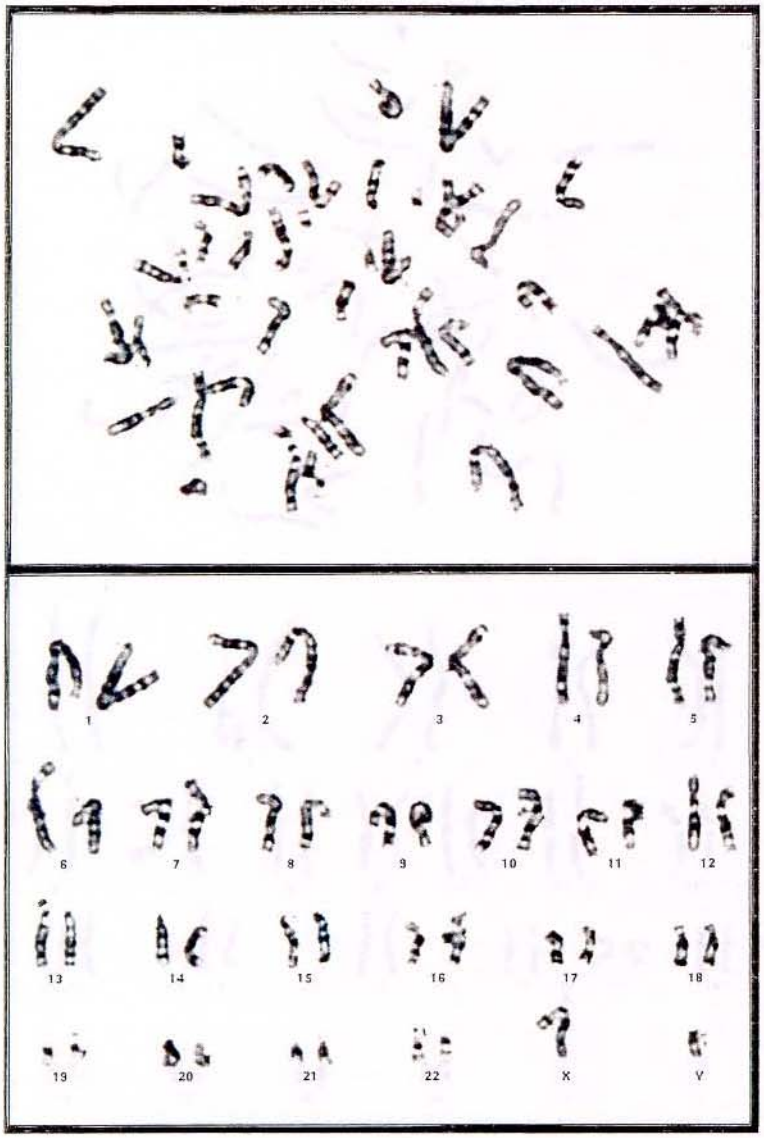


Paciente: SK-4
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 500 bandas por complemento haplóide.

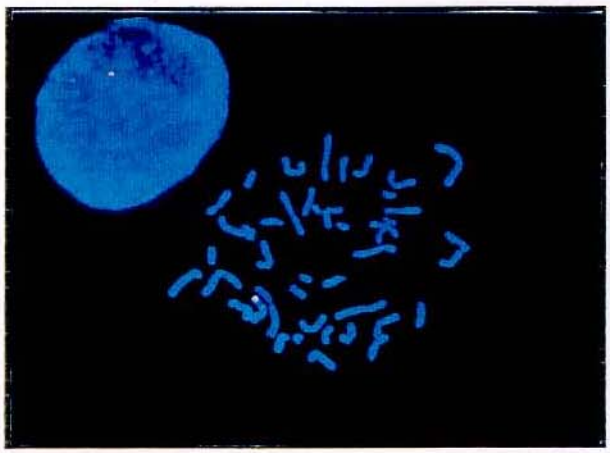


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

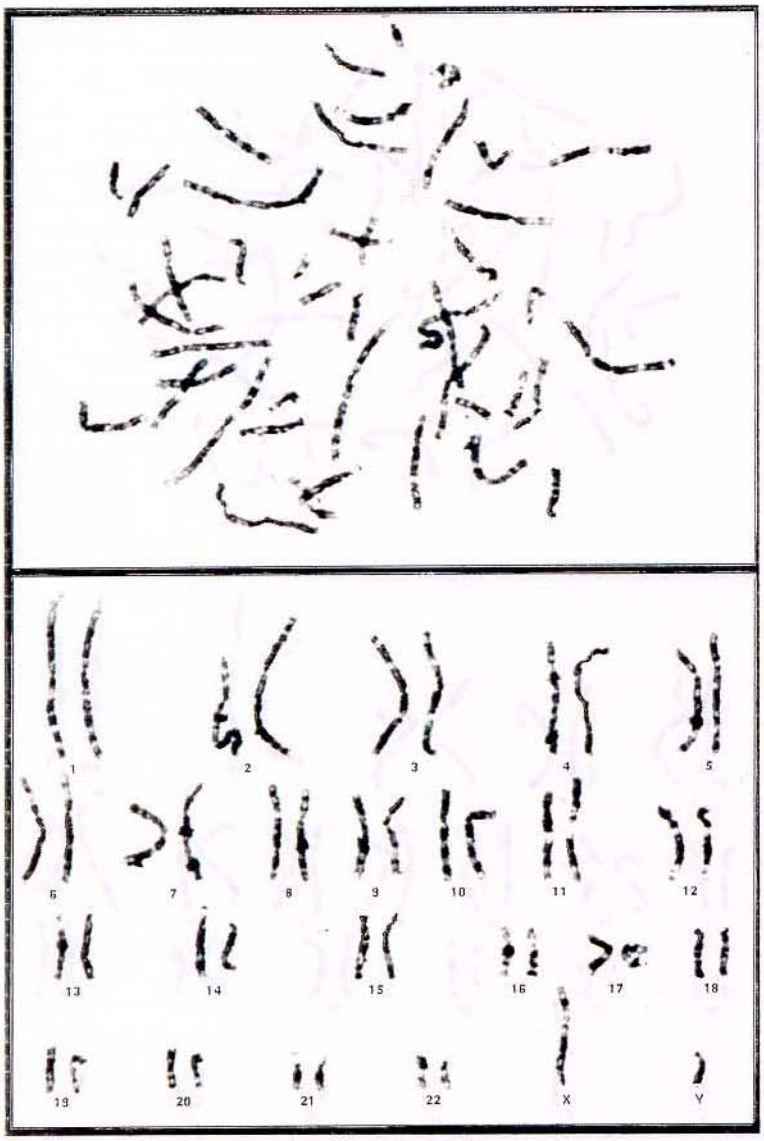


Paciente: SK-5
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 400 bandas por complemento haplóide.

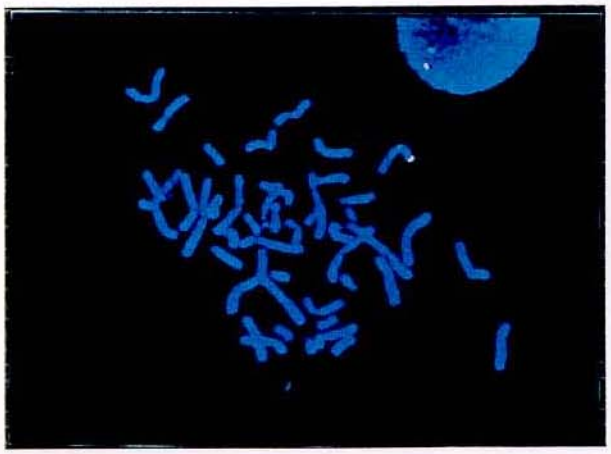


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

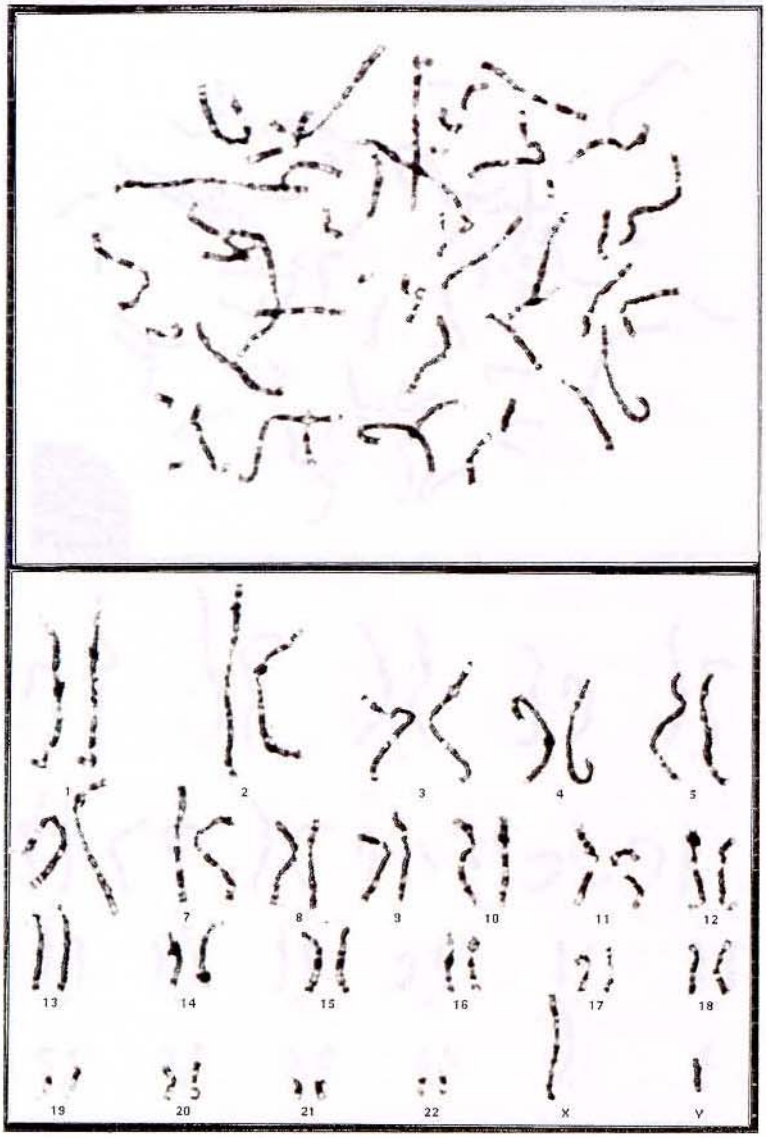


Paciente: SK-6
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 550 bandas por complemento haplóide.

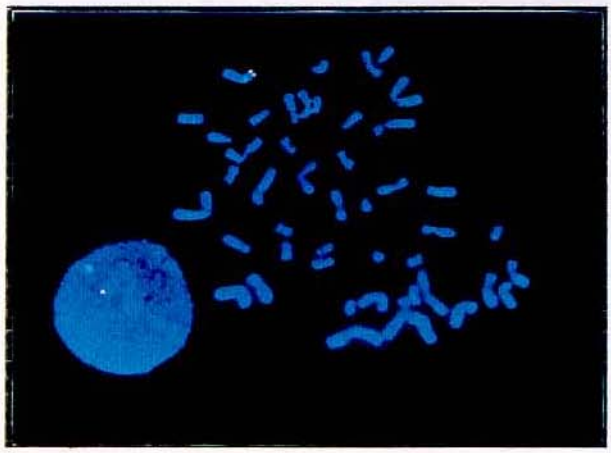


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

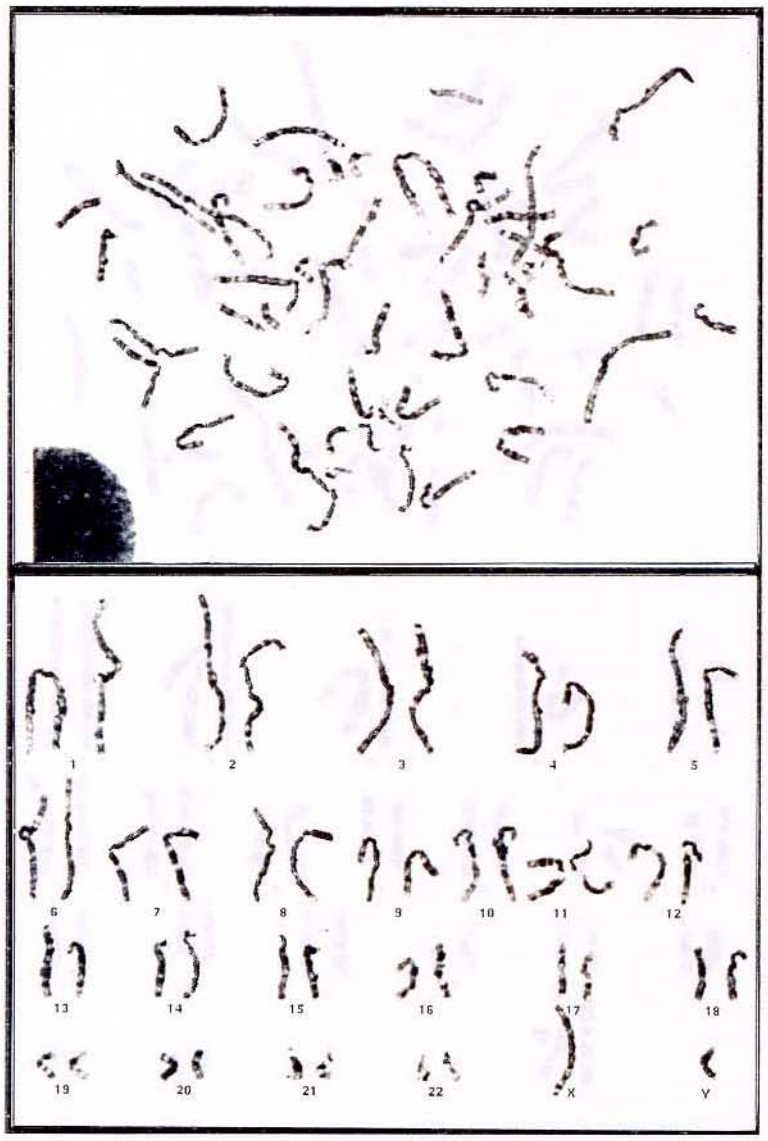


Paciente: SK-7
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 575 bandas por complemento haplóide.

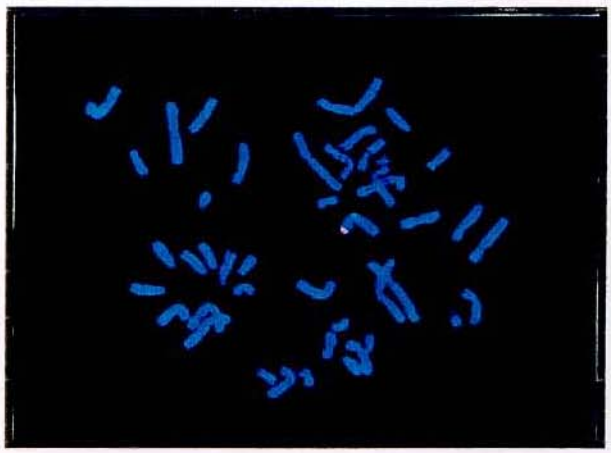


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

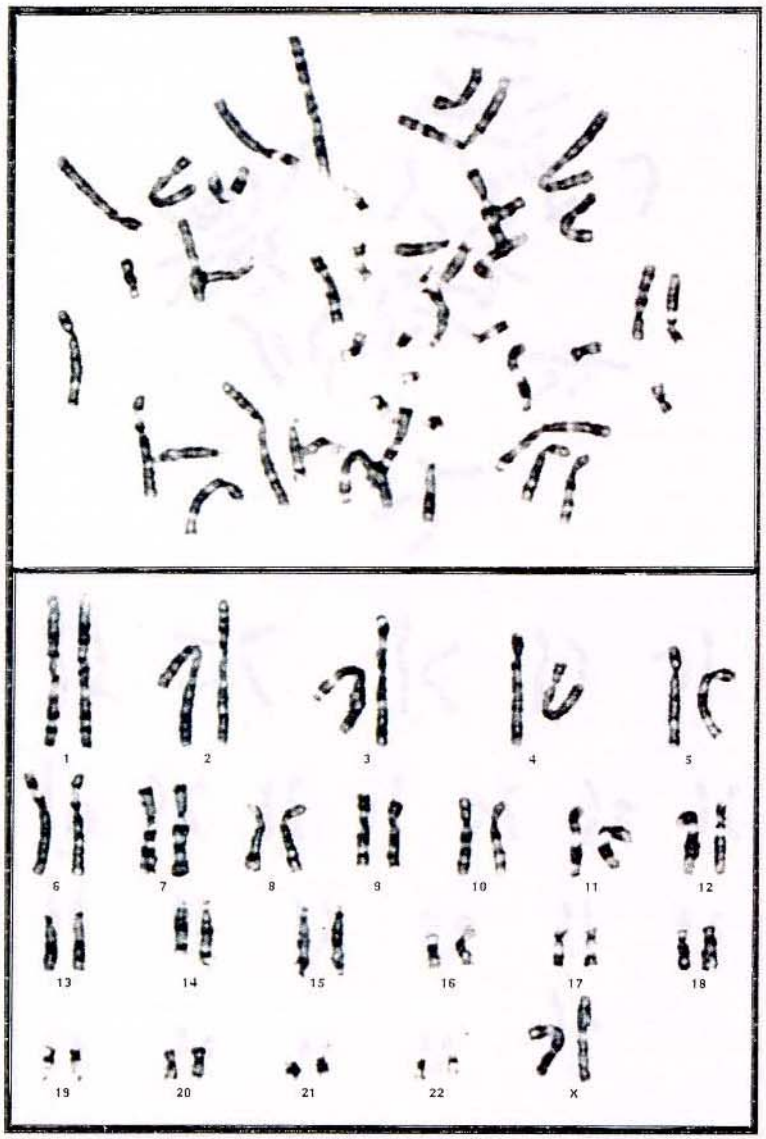


Paciente: SK-8
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 550 bandas por complemento haplóide.

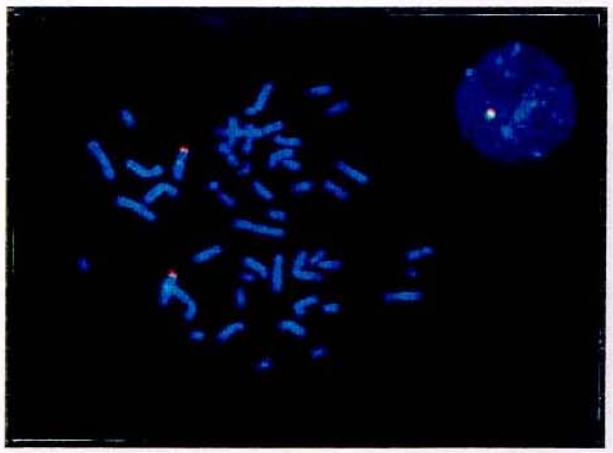


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

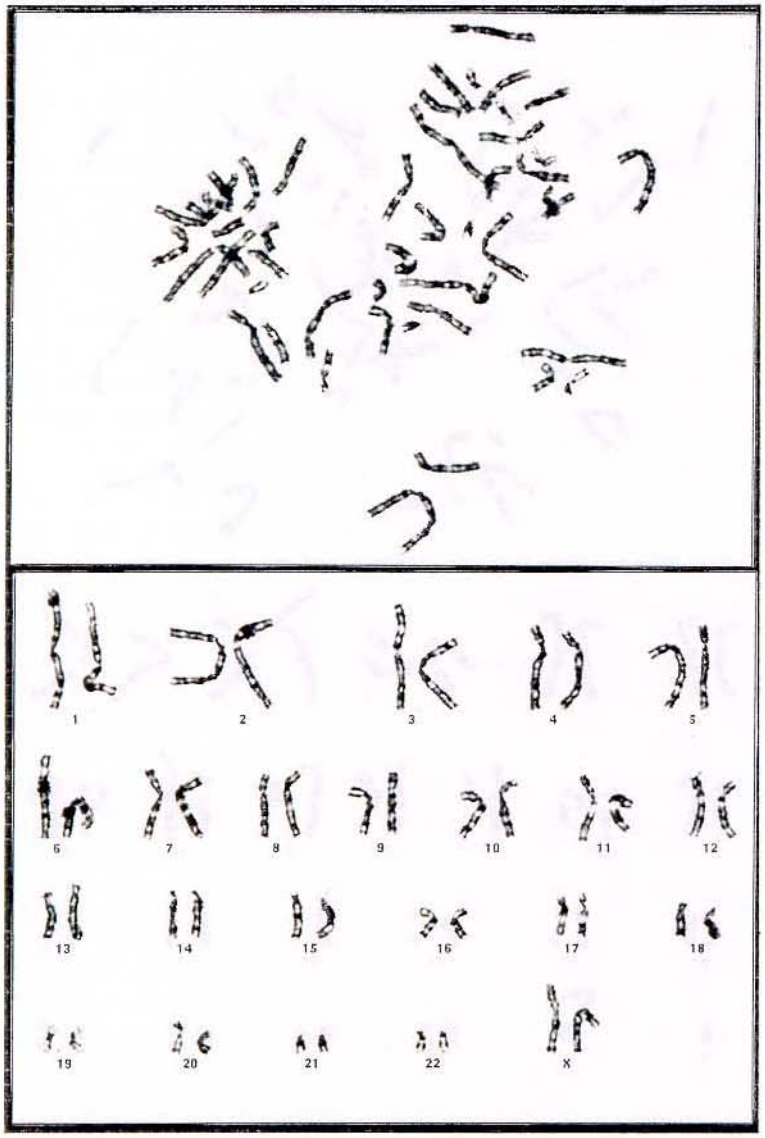


Paciente: SK-9
Cariótipo: 46,XX

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 425 bandas por complemento haplóide.

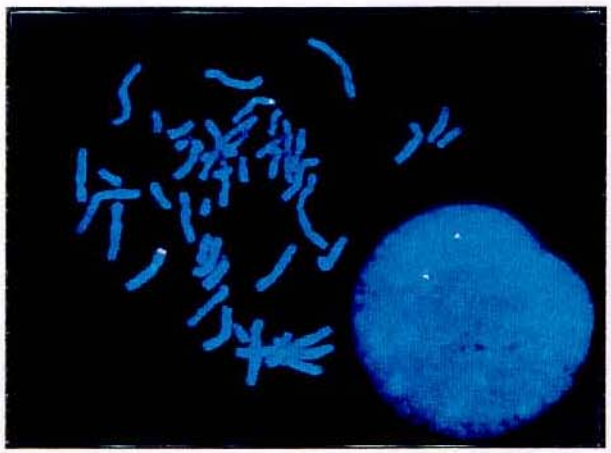


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

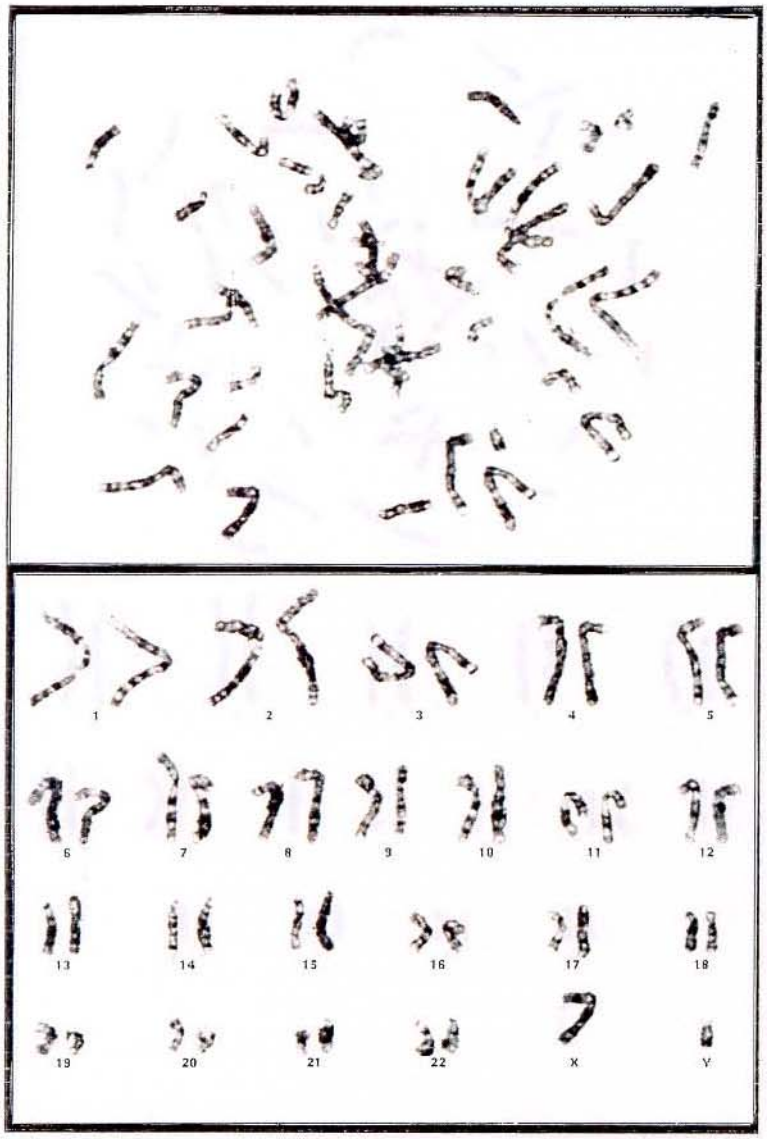


Paciente: SK-10
Cariótipo: 46,XX

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 475 bandas por complemento haplóide.

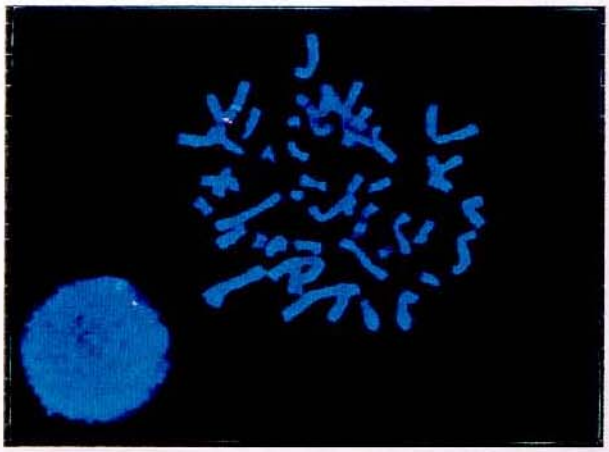


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

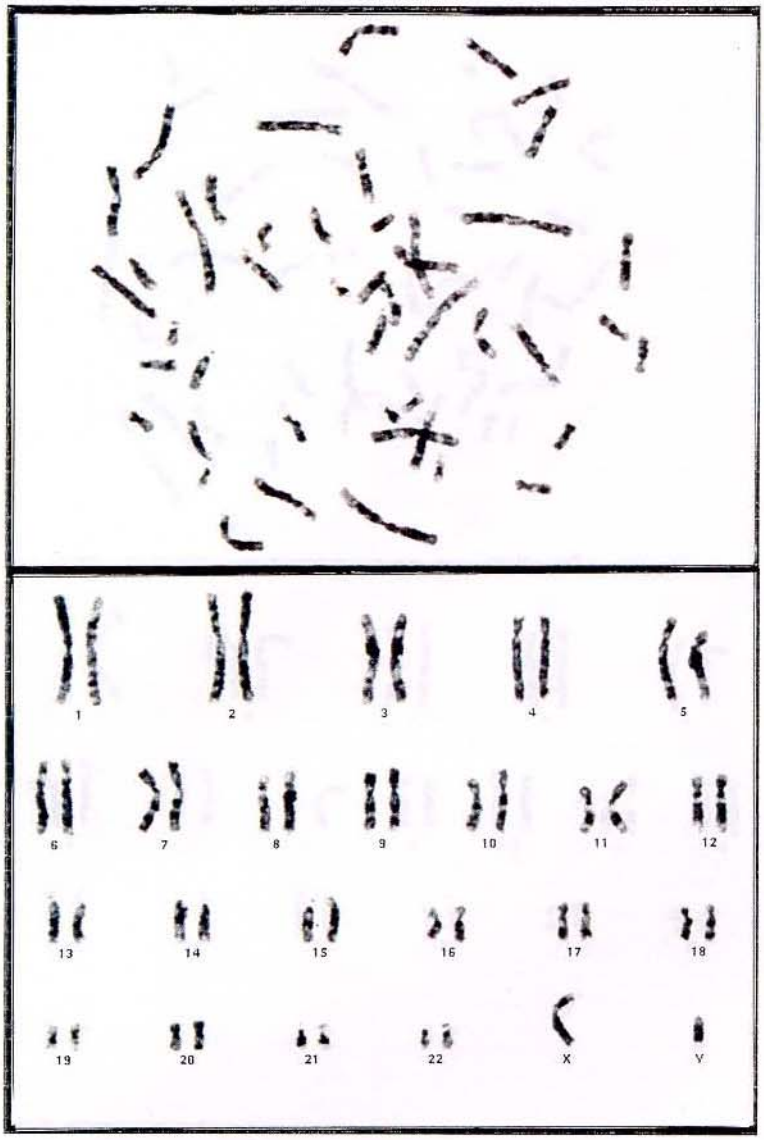


Paciente: SK-11
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 475 bandas por compiemento haplóide.



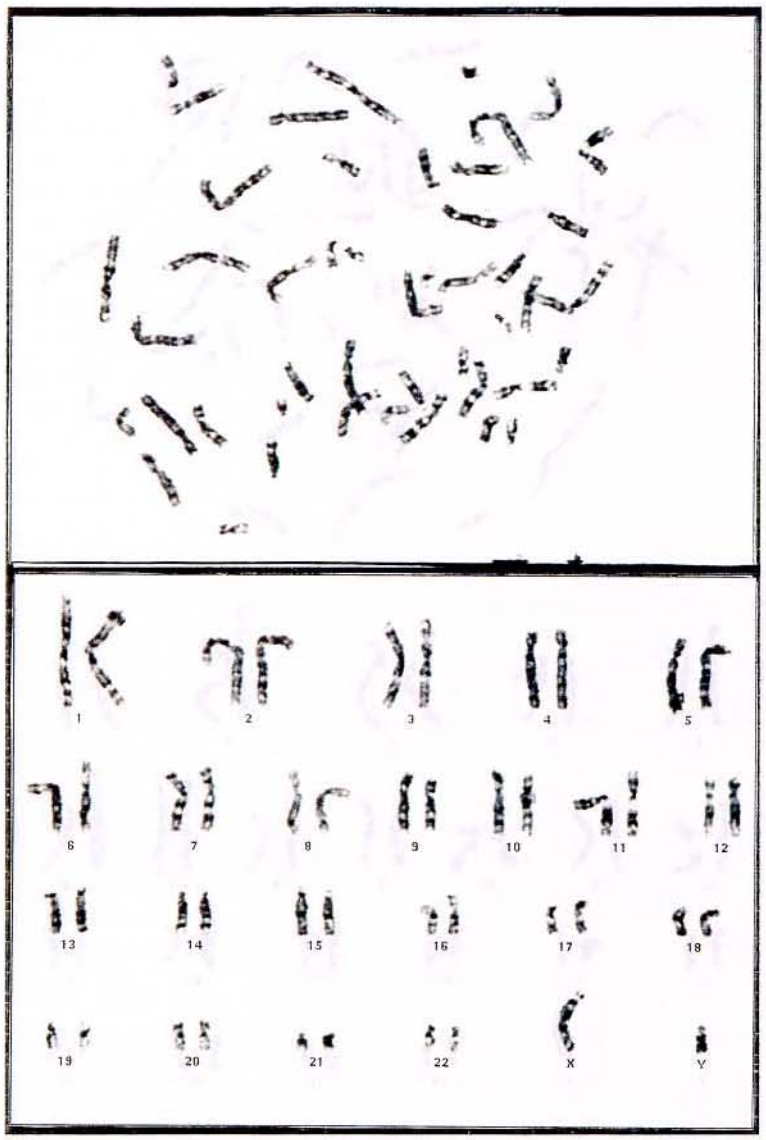
Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).



Paciente: SK-12
Cariótipo: 46,XY

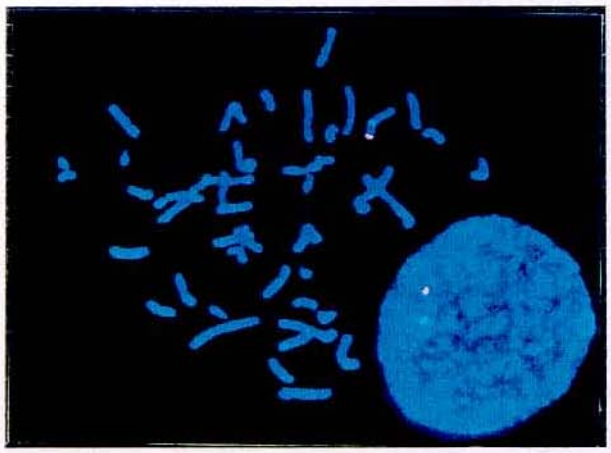
Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 400 bandas por complemento haplóide.

Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

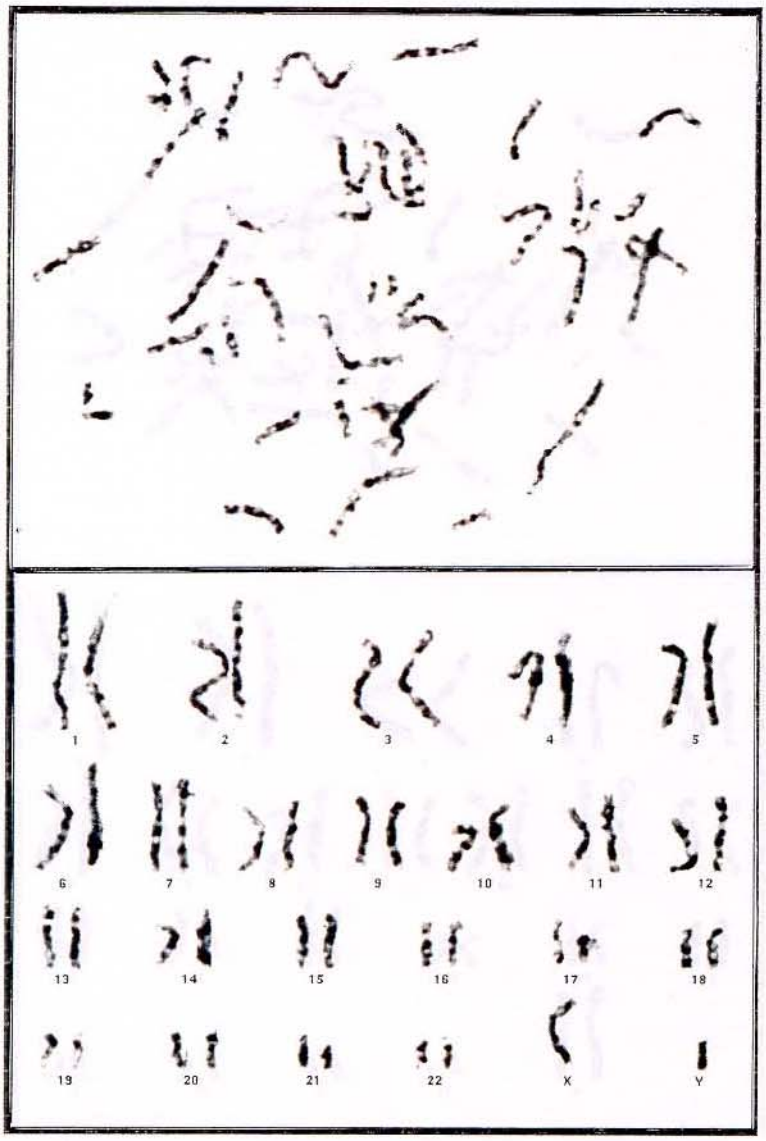


Paciente: SK-13
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 425 bandas por complemento haplóide.

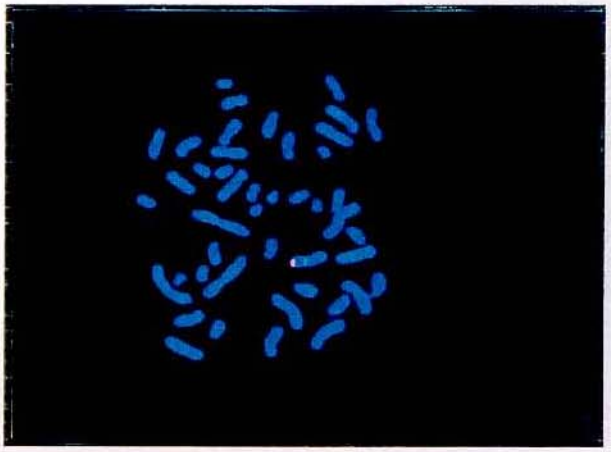


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).

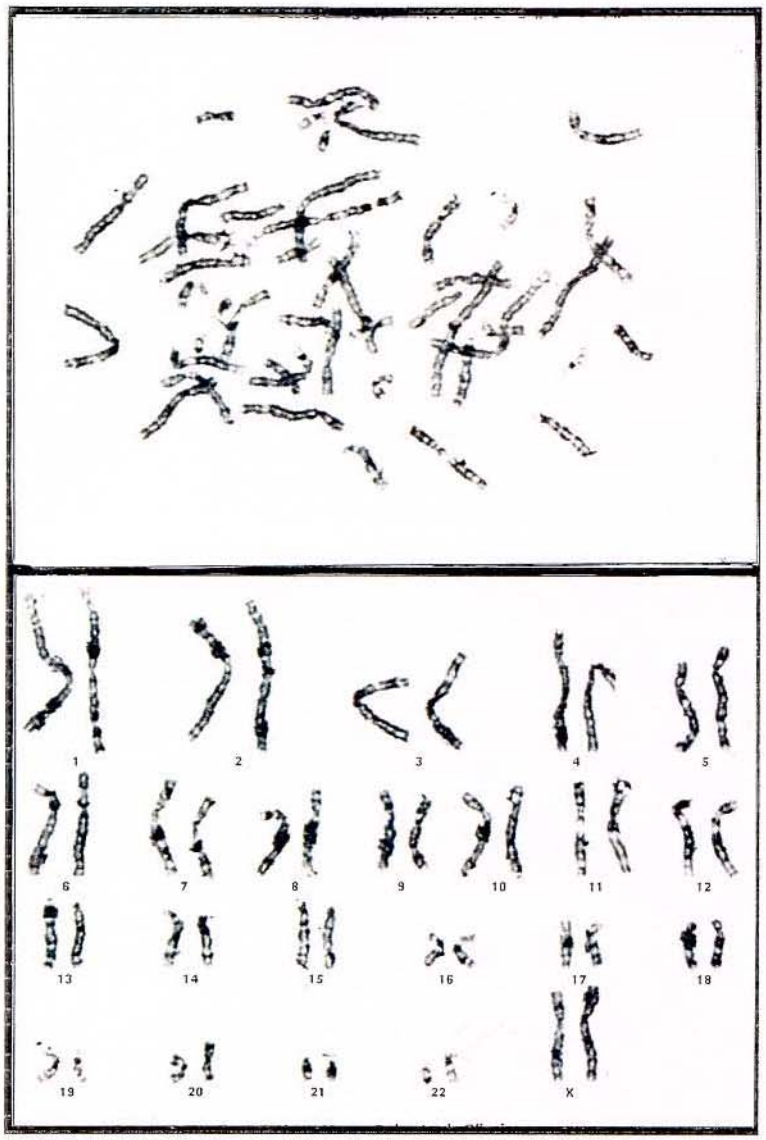


Paciente: SK-14
Cariótipo: 46,XY

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 400 bandas por complemento haplóide.

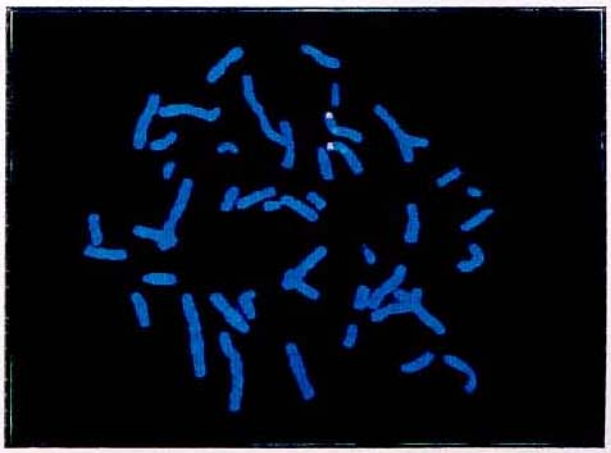


Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).



Paciente: SK-15
Cariótipo: 46,XX

Metafáse e cariótipo (acima) de uma célula com cromossomos bandados pela técnica GTG (banda G-tripsina-Giemsa). A resolução da preparação cromossômica é de aproximadamente 575 bandas por complemento haplóide.



Análise em FISH (ao lado) do *locus KAL-1* utilizando sonda LSI Kallmann (sinal vermelho) e sonda controle CEP X (sinal verde).