

PESQUISA DE SEQUÊNCIAS DO CROMOSSOMA Y EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROMA DE TURNER

LÉNIA FERRÃO, MARIA LURDES LOPES, CATARINA LIMBERT, BÁRBARA MARQUES, FILOMENA BOEIRO, MARISA SILVA, RAMIRA MARQUES, JOÃO LAVINHA, AMILCAR MOTA, JOÃO GONÇALVES
Centro de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge (INSA). Lisboa.
Unidade de Endocrinologia Pediátrica. Hospital D. Estefânia. Lisboa.

RESUMO/SUMMARY

O síndrome de Turner (TS) tem sido descrito em associação com diversas anomalias dos cromossomas sexuais. Embora a maioria dos indivíduos com TS não apresentem evidência citogenética de sequências do cromossoma Y, diferentes autores consideram que algumas doentes com TS podem possuir uma linha celular minoritária contendo material do cromossoma Y, que não é detectada pela análise citogenética convencional. A identificação de mosaicismos minoritários ou sub-representados contendo o cromossoma Y é de importância fundamental em termos clínicos devido ao risco aumentado que estas doentes possuem para o desenvolvimento de gonadoblastoma.

No presente estudo procedeu-se à análise citogenética convencional de linfócitos de sangue periférico obtidos de 22 doentes com TS. Destas doentes, doze possuíam cariotipo 45,X, em sete foram detectados mosaicos com ou sem anomalias estruturais do cromossoma X e nas restantes três foram identificados os seguintes cariotipos:

46,X,i(X)(q10); 46,X,+mar/47,X,idic(Y),+mar e 45,X/46,X,+r.

Os estudos moleculares foram realizados em DNA genómico obtido a partir de linfócitos de sangue periférico e de células de mucosa bucal, dois tecidos que derivam de folhetos embrionários diferentes, respectivamente, mesoderme e ectoderme. A pesquisa de mosaicismos minoritários envolvendo o cromossoma Y foi efectuada por

SCREENING FOR Y CHROMOSOME SEQUENCES IN PATIENTS WITH TURNER SYNDROME

The Turner syndrome (TS) has been described in association with different sex chromosome aberrations. Although most TS patients show no evidence of Y chromosome sequences, according to different authors some TS patients may have Y chromosome material present in a few cells that are not detected by standard cytogenetic analysis. The importance of identification of this low level Y mosaicism is of clinical relevance due to the patient's increased risk of developing gonadoblastoma.

In the present study, standard chromosome analysis performed on peripheral blood lymphocytes from 22 TS patients showed 12 patients with 45,X karyotype, 7 patients were mosaics with or without structural abnormalities in one X chromosome and, the remaining three patients had the following karyotypes: 46,X,i(X)(q10); 46,X,+mar/47,X,idic(Y),+mar and 45,X/46,X,+r. Molecular studies were performed on genomic DNA extracted from peripheral blood lymphocytes and mouth epithelial cells, which derive from two different embryonic germ layers, mesoderm and ectoderm, respectively. The screening for low level Y mosaicism was carried out by simplex PCR and by nested PCR of the following Y specific *loci*:

PCR simples e PCR *nested* para os seguintes *loci* específicos do cromossoma Y: *SRY* (*sex determining region Y*), *TSPY* (*testis specific protein Y encoded*), *DYZ3* (*locus centromérico*) e *DAZI* (*deleted in azoospermia*). O uso de um conjunto de STSs localizados nos braços curto e longo do cromossoma Y permitiu a caracterização de um *idic*(Y) e de um cromossoma em anel, detectados em duas das doentes estudadas.

A elevada sensibilidade da PCR *nested* (1 célula masculina/125 000 células femininas) permitiu excluir a presença de mosaicismos minoritários do Y em 20 das 22 doentes com TS. Na doente com um *idic*(Y) a análise por PCR simples foi positiva para todos os *loci* estudados, com excepção da região heterocromática. Este resultado permitiu identificar o ponto de quebra no braço longo entre sY158 e sY159, tendo-se confirmado, por hibridação *in situ* de fluorescência (FISH), a duplicação da eucromatina do braço longo, centrómero e braço curto do cromossoma Y. A caracterização do cromossoma em anel, detectado numa das doentes com TS, só foi possível por FISH e por PCR. Neste cromossoma, derivado do Y, foi detectada, no braço curto, a deleção da região pseudoautosómica 1 (PARY1) e, no braço longo, a deleção dos intervalos 6 e 7. Contudo, o referido cromossoma foi positivo para os *loci SRY, RPS4Y, AMGY, TSPY* localizados no braço curto, *DYZ3* (centrómero) e, sY85, *DFFRY, GY6, sY87, sY113, sY119, sY122, sY126* e *RBMX1* localizados no braço longo do cromossoma Y.

Este estudo permitiu, assim, excluir a presença de mosaicismos minoritários do cromossoma Y em dois tecidos obtidos de 20 doentes com TS e caracterizar, por FISH e análise molecular, um *idic*(Y) e um cromossoma em anel, em que a natureza deste último não tinha sido identificada por análise citogenética convencional. O risco elevado de desenvolvimento de gonadoblastoma nos indivíduos com TS que possuem sequências do cromossoma Y justifica a aplicação da FISH e PCR para a caracterização de cromossomas marcadores e a utilização da PCR *nested* para a detecção de mosaicismos minoritários do Y sempre que material deste cromossoma não seja detectado pela análise citogenética convencional em doentes com cariotipo 45,X e/ou com virilização.

SRY (*sex determining region Y*), *TSPY* (*testis specific protein Y encoded*), *DYZ3* (*centromeric locus*) and *DAZI* (*deleted in azoospermia*). In two TS patients a set of STSs of the Y long and short arms were used to characterize the *idic*(Y) and the ring chromosomes.

The high sensitivity of the nested PCR (1 male cell/125,000 female cells) allowed for exclusion of the presence of low level Y mosaicism in 20 out of 22 TS patients. In the patient with the *idic*(Y), PCR analysis was positive for all Y loci tested excluding the heterochromatic region. This result identified the breakpoint between sY158 and sY159 on the long arm and, by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) it was confirmed that the euchromatic part of the long arm, centromere and short arm of the Y chromosome were duplicated. The characterization of the ring chromosome, detected in one of the TS patients, was only possible to analyse by FISH and PCR. In this ring, derived from the Y chromosome, a deletion was identified including the pseudoautosomal region 1 (PARY1) and Y intervals 6 and 7. However, the ring Y was positive for *SRY, RPS4Y, AMGY, TSPY* loci on the short arm, *DYZ3* (centromere) and, sY85, *DFFRY, GY6, sY87, sY113, sY119, sY122, sY126* and *RBMX1* on the long arm.

This study excluded the presence of low level Y mosaicism in two tissues collected from 20 TS patients. FISH and molecular analysis allowed us to characterize, in 2 out of 22 patients, one *idic*(Y) and one ring chromosome. The nature of the latter had not been completely identified by standard cytogenetics.

The potential increased risk of gonadoblastoma in TS patients carrying Y chromosome sequences justifies the application of FISH and PCR for the characterization of marker chromosomes and the application of nested PCR for the detection of low level Y mosaicisms when Y chromosome material is not detected by standard cytogenetic analysis in patients with a 45,X karyotype and/or with virilization.

Key-words: Turner syndrome, Y chromosome, nested PCR, low level Y mosaicism, gonadoblastoma.

INTRODUÇÃO

O síndrome de Turner (TS) é uma anomalia cromossômica que afecta 1 em cada 2500-10000 nados vivos com fenótipo feminino¹. De entre as várias manifestações clínicas associadas ao síndrome, contam-se entre as mais frequentes a baixa estatura e os sinais e sintomas directamente relacionados com a disgenesia gonadal, nomeadamente a ausência de desenvolvimento pubertário, amenorreia primária e infertilidade². É ainda comum encontrar outras alterações fenotípicas, tais como linfedema das extremidades, *pterygium colli*, alargamento do diâmetro bi-acromial do tórax, implantação baixa do cabelo, rotação e dismorfias dos pavilhões auriculares de implantação baixa, *cubitus valgus* e encurtamento do quarto metacarpo².

A anomalia cromossômica mais frequentemente associada ao síndrome é a monossomia do cromossoma X (45,X), detectada em 40-60% das doentes³. Esta anomalia cromossômica pode surgir devido à não disjunção dos cromossomas sexuais durante a gametogénese de um dos progenitores ou resultar da perda de um dos cromossomas sexuais nas primeiras divisões mitóticas do zigoto. Em cerca de 75% dos casos 45,X, o cromossoma X é de origem materna, pelo que o erro de segregação cromossômico ocorre durante a meiose masculina ou já após fertilização⁴. Alterações estruturais nos cromossomas sexuais também têm sido detectadas com alguma frequência (podendo atingir os 25%) em doentes com TS. Os restantes indivíduos com TS possuem cariotipos em mosaico, em que para além da linha 45,X, existem uma ou mais linhas celulares com os dois cromossomas sexuais normais ou com um destes estruturalmente anómalo³.

Considerando que a frequência das alterações cromossômicas detectadas nas doentes com TS foi determinada tendo por base a análise citogenética convencional realizada em sangue periférico, a complementação destes estudos com técnicas de maior sensibilidade (hibridação *in situ*, *Southern blotting* e amplificação enzimática de DNA por PCR) que incluiu também a análise de vários tecidos dos indivíduos afectados, revelou uma frequência de mosaicos de 11-81% em indivíduos sem suspeita citogenética de mosaicismo⁵⁻¹³. Estes resultados, complementarmente com a observação de que cerca de 98% dos zigotos 45,X são perdidos durante o primeiro trimestre de gravidez, apoiam a hipótese de que os zigotos que sobrevivem possuem uma segunda linha celular, pelo menos em algum período do desenvolvimento embrionário ou em alguns tecidos ou órgãos^{5, 14-15}. Se, por um lado, não foi possível a diversos autores demonstrar a existência de mosaicismo em todos

os indivíduos com cariotipo 45,X, por outro, ficou provada a limitação das técnicas citogenéticas na detecção de linhas celulares minoritárias (mosaicos ocultos) e demonstrada a necessidade de realizar estudos complementares por recurso a métodos de análise molecular que possuam maior sensibilidade⁵⁻¹³.

Esta nova abordagem metodológica é clinicamente relevante na pesquisa de sequências do cromossoma Y em indivíduos 45,X, os quais podem possuir uma segunda linha celular minoritária com um cromossoma Y normal ou estruturalmente alterado. Como é sabido, a presença de material do Y em indivíduos com disgenesia gonadal está associada a um risco aumentado (15-20%) de desenvolvimento de malignidade gonadal¹⁶. Com base em diversos estudos foi proposta a existência, nos intervalos 4A-5A do cromossoma Y, de um *locus GBY* (*Gonadoblastoma Y Gene*) que se julga estar implicado no desenvolvimento de gonadoblastomas ou disgerminomas em doentes com gónadas disgenéticas¹⁷⁻²⁰. Dado que as diversas cópias da família de genes *TSPY* se localizam nos intervalos 3-4A, e considerando que a proteína *TSPY* foi detectada em células tumorais de um gonadoblastoma presente numa doente com TS, a qual possuía um cromossoma marcador com material do Y, os genes *TSPY* foram propostos como candidatos a *GBY*¹⁷⁻²¹. Pelo exposto, é clinicamente importante a pesquisa de sequências do cromossoma Y em indivíduos com TS, uma vez que, quando presentes, é aconselhada a realização de uma gonadectomia profilática.

Tendo como objectivo a pesquisa de sequências do Y em doentes com TS procedeu-se à optimização e à realização de ensaios de sensibilidade por PCR simples e *nested*, para pesquisa dos seguintes *loci* específicos do cromossoma Y: gene *SRY* (*Sex determining region on the Y chromosome*²²), gene *TSPY* (*Testis specific protein Y-encoded*²³), *locus DYZ3* (*Y specific centromeric alpha satellite DNA*²⁴) e gene *DAZ1* (*Deleted in azoospermia*²⁵). A inclusão destes marcadores nesta pesquisa deve-se, por um lado, à sua importância funcional e estrutural no cromossoma Y e, por outro, à possibilidade de caracterizar o eventual material que se venha a detectar, quer esteja na forma de um cromossoma Y livre ou translocado com outro cromossoma. O *locus DYZ3*, específico do centrómero do Y, é incluído no presente estudo com o objectivo de detectar qualquer cromossoma Y ou segmento cromossômico estável, que segregue correctamente, tanto em divisões mitóticas como meióticas. Na ausência de sequências *DYZ3* não é possível que um segmento cromossômico livre do Y possa ser perpetuado nas sucessivas divisões celulares.

A pesquisa dos *loci* referidos foi realizada em DNA

genómico obtido de sangue periférico e mucosa bucal (tecidos estes derivados, respectivamente, da mesoderme e da ectoderme) obtidos de 22 indivíduos com TS cuja constituição cromossómica era conhecida. Complementarmente, efectuou-se a caracterização molecular dos cromossomas Y estruturalmente anormais detectados em duas das doentes referidas. Esta caracterização compreendeu a utilização da hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e a pesquisa por amplificação enzimática (PCR) simples e múltipla de diversos *loci* do cromossoma Y.

DOENTES E MÉTODOS

Neste estudo foram incluídos 22 indivíduos com TS com cariotipo conhecido, seguidos regularmente em consulta na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital D. Estefânia de Lisboa (HDE). A análise do fenótipo clínico incluiu a pesquisa das dismorfias mais comuns associadas ao síndrome (Quadro I).

Este estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética do HDE, tendo sido igualmente obtido o consentimento

informado dos doentes (quando adultos) ou dos seus progenitores.

ANÁLISE CITOGÉNÉTICA E FISH

A análise citogenética foi efectuada em bandas GTL de alta resolução, obtidas a partir de culturas sincronizadas de linfócitos de sangue periférico²⁶.

A identificação de cromossomas marcadores ou de cromossomas derivados foi efectuada por recurso à FISH, utilizando sondas genómicas específicas para diferentes regiões do cromossoma Y: pDP230 (Yp11.32), GMGY 10 (Yp11.1), pDP97 (Y10) e 49f (Yq11.23), marcadas por *nick translation* com biotina-14-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP. A hibridação, lavagens de pós-hibridação e detecção foram efectuadas segundo método previamente descrito²⁷.

ANÁLISE MOLECULAR

Extracção de DNA

A extracção de DNA genómico foi realizada a partir de sangue periférico e mucosa bucal, tendo-se utilizado um kit comercial de purificação de DNA.

Quadro I – Resumo das dismorfias encontradas nas 22 doentes com síndrome de Turner

Doentes* (idade em anos)	Dismorfias															
	Facies triangular	Pavilhões auriculares de implantação baixa	Epicantus	Palato em ogiva	Má implantação dentária	Retrógnaísmo / Micrognatismo	Comissuras labiais orientadas para baixo	Pescoço curto / longo	<i>Pterigium colli</i>	Cabelos de implantação baixa	Tórax em escudo / Mamilos afastados	<i>Cubitus valgus</i>	Encurtamento metacárpico / metáfalangeo	Linfedema das mãos / pés	Unhas hipoplásicas e triangulares	Nevus
TS1 (22)	-	+	+	+	-	-/-	-	-/-	-	na	-/+	+	-/-	+/+	+	na
TS2 (17)	-	+	+	+	+	-/+	+	+/+	+	+	+/+	+	+/+	na/+	na	+
TS3 (26)	na	+	+	+	-	-/+	-	+/+	+	+	-/+	+	+/+	-/+	+	+
TS4 (18)	+	na	na	+	+	-/+	+	+/+	+	+	+/+	+	+/+	-/-	na	na
TS5 (7)	+	+	+	+	-	-/+	+	+/+	-	+	+/+	+	-/+	+/+	+	na
TS6 (5)	+	+	+	+	+	-/+	+	+/+	+	+	+/+	+	-/-	+/na	na	na
TS7 (6)	+	-	-	+	-	-/+	+	+/+	-	+	-/-	+	+/+	-/-	+	-
TS8 (14)	-	-	-	+	-	-/+	-	-/-	-	+	+/+	+	-/-	-/-	na	+
TS9** (12)	+	+	-	+	-	-/-	-	+/+	-	+	+/+	+	-/-	-/-	+	+
TS10 (12)	+	+	+	+	na	-/-	-	-/+	-	na	+/+	+	+/+	+/+	+	+
TS11 (15)	-	+	+	+	-	-/-	-	+/+	-	+	+/+	+	+/+	-/-	+	+
TS12 (16)	+	+	+	+	-	-/+	+	+/+	-	+	+/+	-	-/-	-/-	+	+
TS13** (15)	+	+	-	+	+	-/-	+	+/+	+	+	+/+	+	+/+	-/-	na	+
TS14 (5)	+	+	+	+	-	-/-	na	-/-	-	-	+/+	+	+/+	+/+	+	+
TS15 (6)	+	-	+	+	na	+/+	-	+/+	-	na	+/+	+	+/+	+/+	+	+
TS16 (2)	+	+	-	+	-	na/+	+	+/+	+	+	+/+	+	+/+	-/-	+	na
TS17 (4)	+	+	+	+	+	-/+	+	+/+	+	na	+/+	+	+/+	-/-	+	+
TS18 (18)	+	+	+	+	-	na/+	-	+/+	+	+	+/+	+	+/+	+/+	+	+
TS19 (3)	+	-	+	+	na	+/+	-	+/+	-	na	+/+	+	+/+	+/+	+	+
TS20 (8)	-	-	-	-	-	-/-	-	-/-	-	-	na/na	-	-/-	-/-	+	+
TS21 (9)	+	+	-	+	-	-/-	+	-/-	+	+	+/+	na	+/+	-/-	+	+
TS22 (25)	-	+	-	+	-	-/-	+	+/+	-	+	-/+	-	-/-	+/+	+	+

* Todas as doentes apresentavam baixa estatura quando da avaliação clínica. A puberdade foi induzida em todas as doentes (quando aplicável) com excepção de TS11 e TS18, nas quais ocorreu puberdade espontânea.

**Efectuou-se gonadectomia em idade pré-púbere. A análise histológica revelou a presença de gónadas femininas sem evidência de neoplasias.

(+) -presente; (-) -ausente; (na)-não analisado

Ensaio de sensibilidade de PCRs simples e *nested* e pesquisa de sequências do cromossoma Y

Para a pesquisa dos *loci* do cromossoma Y referidos anteriormente, utilizaram-se oligonucleótidos específicos (quadro II) cujas condições de amplificação se descrevem resumidamente abaixo. Para demonstrar a funcionalidade das condições reacionais em todas as amostras biológicas estudadas, o gene *SRY* e o *locus DYZ3* foram coamplificados, respectivamente, com sequências específicas do gene receptor de androgénios-AR (localizado em Xq11-q12) e do gene da β-globina (localizado em 1p15.5), tanto em PCR simples como em PCR *nested*.

Os ensaios para determinação da sensibilidade das reacções de PCR simples e *nested* na detecção de sequências do Y foram realizados nas seguintes condições reacionais: 67 μM Tris-HCl (pH 8,8), 6,7 mM MgCl₂, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 500 μM de cada dNTP, 3 a 11 pmol de cada oligonucleótido iniciador e 0,03 U *Taq* DNA polimerase (Perkin Elmer), num volume final de 25 μL. A algumas misturas reacionais foi ainda adicionado dimetilsulfóxido numa concentração final de 2% (*SRY*: PCR *nested* e *TSPY*: PCR simples), 3% (*DYZ3*: PCR simples e *nested* e *DAZI*: PCR simples) ou 6% (*DAZI*: PCR *nested*). A cada reacção foram adicionados 100 ng de DNA genómico de um indivíduo do sexo feminino (46,XX) misturados com 100 a

1x10⁻⁶ ng de DNA genómico de um indivíduo do sexo masculino (46,XY). As diversas reacções de PCR *nested* foram realizadas a partir de 1 μL (ou 1μL de uma diluição 1/10) das respectivas soluções de PCR simples. As reacções de PCR obedeceram à seguinte programação: desnaturação a 94°C-3 min seguindo-se 25 a 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min à temperatura de emparelhamento (T_e) (Quadro II); 1 min a 72°C, e uma extensão final de 72°C durante 3 min. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (2%) em TBE 1x.

As condições experimentais estabelecidas nos ensaios de sensibilidade para cada *loci* foram aplicadas na pesquisa das respectivas sequências do cromossoma Y nas doentes com TS em estudo. Nas reacções de PCR simples, de cada controlo e de cada doente, utilizaram-se cerca de 100 ng de DNA genómico obtido de sangue periférico e de mucosa bucal. Cada reacção de PCR *nested* foi realizada utilizando 1 μL da respectiva solução de PCR simples.

Caracterização molecular de cromossomas Y estruturalmente anómalos

As condições reacionais das PCRs simples e múltiplas dos *loci* indicados no quadro III são as referidas anteriormente para as PCRs simples e *nested*, exceptuando as temperaturas de emparelhamento (quadro III), a

Quadro II – *Loci* específicos do cromossoma Y pesquisados por PCR simples e *nested*.

Gene ou <i>locus</i> (Referência bibliográfica)	Sequência dos oligonucleótidos	Oligonucleótidos usados na PCR	Fragmento (pb)	Temperatura de emparelhamento (°C)
<i>SRY</i> (Behlke <i>et al.</i> ²⁸)	SRY1: 5'-AGAATTGCAATATCCCGCTCTCCGG-3'	simples {	365	58
	EB: 5'-GCAAAGTCAATCTTCGGC-3'			
	EBR: 5'-AACGCATTCATCGTGTGGTC-3'		456	
	EAR: 5'-ATTTCTGTGCCTCCTGGAAG-3'			
AR (Lubahn <i>et al.</i> ²⁹)	D1: 5'-GGAGTTTAGAGTCTGTGACCAGG-3'	<i>nested</i> {	153	60
	D2: 5'-GATCCCCCTTATCTCATGC-3'			
	Da: 5'-GTTGCATTGTGTGTTTTGACC-3'		240	
	Da1: 5'-CAGCACACACTACACCTGG-3'			
<i>TSPY</i> (Binder <i>et al.</i> ³⁰)	JA56: 5'-GATGACATAATGGCGGAG-3'	simples	1300	59
	JA52: 5'-CGATAGGCCTCCACTTCATA-3'			
	JA35: 5'-CCCCACCTAGACCGCAGAGG-3'	<i>nested</i>	608	
	JA30: 5'-GGGAAGAAGGCCTAAGAGCACC-3'			
<i>DYZ3</i> (Binder <i>et al.</i> ³⁰)	DYZ3A: 5'-TGAAAACACTACAGAAGCTG-3'	simples {	1100	60
	DYZ3B: 5'-ACACATCACAAGAAGACTATG-3'			
	DYZ3G: 5'-AGCCTTTTGTGGCTACG-3'		755	
	DYZ3H: 5'-ATCCTCCTGGAGATACCA-3'			
β-globina (Lavinha <i>et al.</i> ³¹)	L5'β: 5'-TAAGCCAGTGCCAGAAAGAG-3'	<i>nested</i> {	330	61
	R5'β: 5'-TCCATTCTAAACTGTACC-3'			
	L5'βFi: 5'-ATCACTTAGACCTCACCT-3'		619	
	L5'βRi: 5'-ACTCACCTGAAGTTCTCA-3'			
<i>DAZI</i> (Reijo <i>et al.</i> ²⁵)	sY254L: 5'-GGGTGTTACCAGAAGGCAAA-3'	simples	405	61
	sY254R: 5'-GAACCGTATCTACCAAAGCAGC-3'			
	sY254i: 5'-GACACACCAGTTCGATTTCG-3'	<i>nested</i>	380	

Quadro III – Loci usados em PCR simples e múltipla para caracterização dos cromossomas Y estruturalmente anómalos.

	STS ou gene	Tamanho do fragmento (pb)	Referência		
PCRs múltiplas	M1	sY122	201	Vollrath <i>et al.</i> ³²	
	Te: 60°C	sY126	323	"	
		sY231	149	"	
		sY157	285	"	
		M2	sY85	369	"
	Te: 60°C	GY6	1100	Jones <i>et al.</i> ³³	
		sY87	252	Vollrath <i>et al.</i> ³²	
		sY149	132	"	
		SPGY	460	Vogt <i>et al.</i> ³⁴	
	M3	SRY	422	Behlke <i>et al.</i> ²⁸	
		Te: 58°C	sY274 (RPS4Y)	350	Reijo <i>et al.</i> ²⁵
			ZFY	735	Barbosa <i>et al.</i> ³⁵
		AMGX	950 (X) e 735 (Y)	Nakahori <i>et al.</i> ³⁶	
	M4	DFFRY	1100	Brown <i>et al.</i> ³⁷	
		Te: 58°C	sY119	191	Vollrath <i>et al.</i> ³²
			sY254 (DAZI)	380	Reijo <i>et al.</i> ²⁵
sY158		231	Vollrath <i>et al.</i> ³²		
PCRs simples	Te: 58°C	PABX1/PABY1	968 (X) e 1271 (Y)	Ellis <i>et al.</i> ³⁸	
	Te: 58°C	sY113	290	Reijo <i>et al.</i> ²⁵	
	Te: 55°C	RBM1	1000	Vogt <i>et al.</i> ³⁴	
	Te: 60°C	sY208	140	Reijo <i>et al.</i> ²⁵	
	Te: 58°C	sY255 (DAZI)	231	Vollrath <i>et al.</i> ³²	
	Te: 59°C	sY159	550	"	
	Te: 52°C	SY160	236	"	

Te: temperatura de emparelhamento
 STS: *sequence-tagged site*

quantidade de DNA genómico por amostra que variou entre 100 e 600 ng e o volume reaccional (25 a 40 µL).

RESULTADOS

Ensaio de sensibilidade

Os limites de detecção de sequências do cromossoma Y para cada locus seleccionado foram determinados através da realização de reacções de PCR, utilizando uma série de diluições de DNA de um indivíduo 46,XY em DNA de um indivíduo 46,XX, por forma a mimetizar mosaicismos do tipo 45,X/46,XY que podem existir em doentes com TS. Os limites de detecção das sequências do Y para os loci seleccionados foram de 0,1-0,05 ng de DNA genómico de um indivíduo 46,XY em 100 ng de DNA genómico de um indivíduo 46,XX para as reacções de PCR simples e de 0,005-0,0008 ng para as reacções de PCR *nested*, sendo a reacção de maior sensibilidade a PCR *nested* para DAZ1, que detecta 1 célula 46,XY em 125 000 células 46,XX (quadro IV). Na figura 1, a título ilustrativo, apresentam-se os resultados dos ensaios de sensibilidade das reacções de

PCR simples e *nested* para DYZ3. O limite de sensibilidade da PCR *nested* para o referido locus foi de 0,002 ng de DNA genómico 46,XY em 100 ng de DNA genómico de um indivíduo 46,XX. Embora se tenha detectado amplificação de fraca intensidade para diluições inferiores a 0,002 ng (figura 1), este resultado foi interpretado como sendo devido a possíveis erros de diluição ou de pipetagem, tendo-se

Quadro IV - Resultados dos ensaios de sensibilidade obtidos por PCR simples e *nested*, para os loci do cromossoma Y seleccionados

Gene ou Locus	Sensibilidade para PCR simples*	Sensibilidade para PCR <i>nested</i> *
SRY	0,1 ng (1 000 cel.)	0,005 ng (20 000 cel.)
TSPY	0,5 ng (200 cel.)	0,005 ng (20 000 cel.)
DYZ3	0,3 ng (334 cel.)	0,002 ng (50 000 cel.)
DAZI	0,05 ng (2 000 cel.)	0,0008 ng (125 000 cel.)

* Quantidade de DNA genómico (ng) de um indivíduo do sexo masculino (46,XY) que foi detectada nas reacções de PCR simples e *nested*, na presença de 100 ng de DNA genómico de um indivíduo do sexo feminino (46,XX). Entre parêntesis indica-se a sensibilidade expressa em número máximo de células de um indivíduo do sexo feminino (46,XX) no qual foi possível detectar 1 célula de um indivíduo do sexo masculino (46,XY); admite-se que uma célula diploide humana possui cerca de 0.01 ng de DNA genómico*.

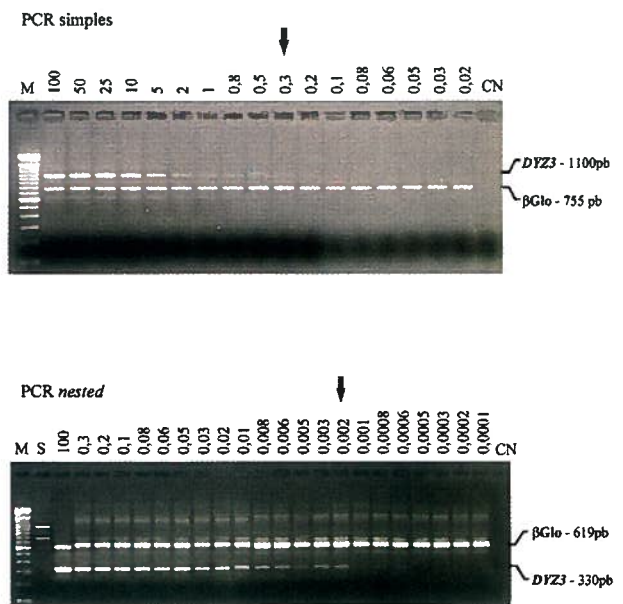


Fig. 1 – Electroforeses em gel de agarose ilustrativas dos ensaios de sensibilidade para DYZ3. PCR simples – No topo de cada canal indica-se a quantidade de DNA (ng) genómico de um indivíduo do sexo masculino usada por reacção, à qual foram adicionados 100 ng de DNA genómico de um indivíduo do sexo feminino. PCR *nested* – Reamplificação do produto de cada reacção obtido na PCR simples. As setas indicam os limites de sensibilidade considerados. betaGlo - beta globina. Canais: M - marcador de peso molecular ("Escada" de 100 pb); S - produto da reacção de PCR simples; CN - controlo negativo (sem adição de DNA na PCR simples enquanto que ao CN da PCR *nested* foi adicionado 1 µL da solução obtida na PCR simples).

confirmado a ausência de amplificação para estas diluições em ensaios posteriores.

Pesquisa de sequências do cromossoma Y por PCR simples e nested em doentes com síndrome de Turner

Os resultados da análise cromossômica realizada nos 22 indivíduos com TS constam do quadro V. Nesta estão também incluídos os resultados da pesquisa dos loci *SRY*, *TSPY*, *DYZ3* e *DAZ1* por PCR simples e *nested*, realizada a partir de DNA genômico obtido de sangue periférico e de mucosa bucal dos referidos indivíduos. Esta pesquisa detectou a presença de sequências do cromossoma Y apenas nas doentes TS9 e TS13 (figura 2). Nestas duas doentes a pesquisa molecular de sequências do cromossoma Y confirmou os resultados da análise citogenética clássica e da FISH, que tinham identificado

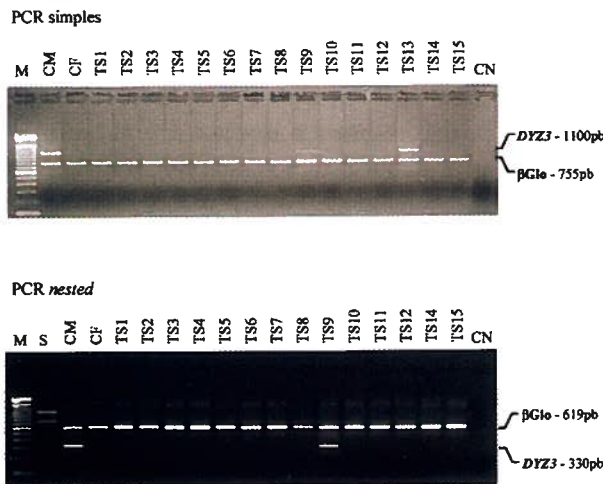


Fig. 2 – Electroforeses em gel de agarose ilustrativas da pesquisa do locus *DYZ3*, coamplificado com uma sequência específica do gene da β globina (β Glo), em DNA genômico de sangue periférico de 15 indivíduos com síndrome de Turner (TS1-TS15). **PCR simples** – Notar a presença de amplificação para *DYZ3* nas doentes TS9 e TS13. **PCR nested** – Reamplificação do produto de cada reação de PCR simples correspondente a cada doente. Confirma-se a amplificação de *DYZ3* na doente TS9. Canais M, S e CN – ver legenda da figura 1. Canais CM e CF – Controlo Masculino e Feminino, respectivamente.

no sangue periférico da doente TS9 uma linha celular minoritária contendo um cromossoma em anel com sequências do cromossoma Y e na doente TS13 um cromossoma Y isodicêntrico (figura 3). Para o indivíduo TS13 obteve-se forte amplificação dos loci *SRY*, *TSPY*, *DYZ3* e *DAZ1* por PCR simples, pelo que não se efectuaram as reacções subsequentes de PCR *nested*. Contrariamente, para o indivíduo TS9 observou-se uma banda de fraca intensidade para *SRY*, *TSPY* e *DYZ3* (figura 2) na PCR simples, pelo que se prosseguiu com as reacções de PCR *nested*. A pesquisa de *DAZ1* revelou-se negativa para a doente TS9, tanto por PCR simples como por PCR *nested* e

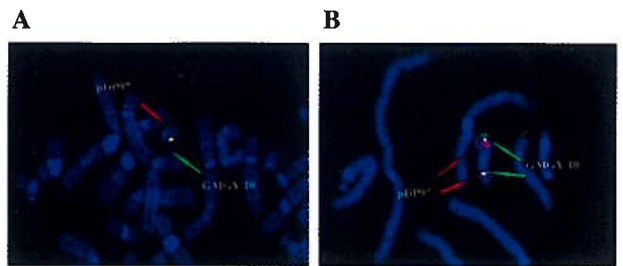


Fig. 3 – FISH. A – Identificação do cromossoma em anel detectado na doente TS9 com as sondas pDP97 (centromérica) e GMGY 10 (Yp11.1). B – Identificação do cromossoma isodicêntrico detectado na doente TS13 com as sondas pDP97 e GMGY 10. Notar que os sinais verdes (GMGY 10) se localizam em posição distal relativamente aos dois sinais centroméricos (pDP97).

em ambos os tecidos. Nas restantes 20 doentes, e em ambos os tecidos analisados, não se detectaram, tanto por PCR simples como por PCR *nested*, sequências específicas dos 4 loci do cromossoma Y pesquisados.

A coamplificação de *SRY* e *DYZ3* com controlos internos (sequências específicas respectivamente dos genes do receptor dos androgénios e β globina,) e a inclusão em todos

Quadro V – Resultados da análise cromossômica (sangue periférico) e da pesquisa de loci do cromossoma Y por PCR simples e *nested* (sangue periférico e mucosa bucal) nos 22 indivíduos com síndrome de Turner

Indivíduos com síndrome de Turner	Cariotipo	Análise molecular (<i>SRY</i> , <i>TSPY</i> , <i>DYZ3</i> e <i>DAZ1</i>)	
		PCR simples	PCR <i>nested</i>
TS1	mos 45,X[11]/46,X,i(Xq)[44]	ausente	ausente
TS2	45,X	ausente	ausente
TS3	45,X	ausente	ausente
TS4	45,X	ausente	ausente
TS5	46,X,i(X)(q10)	ausente	ausente
TS6	45,X	ausente	ausente
TS7	45,X	ausente	ausente
TS8	mos 45,X[6]/46,X,i(Xq)[44]	ausente	ausente
TS9	mos 45,X[98]/46,X,+r[2] ish r(Y)(wcpY+)	presente*	presente*
TS10	45,X	ausente	ausente
TS11	mos 45,X[18]/46,XX[32]	ausente	ausente
TS12	mos 45,X[11]/46,XX[39]	ausente	ausente
TS13	mos 46,X,+mar[50]/47,X,idel(Y),+mar[10]**	presente	NA
TS14	mos 45,X[57]/46,X,del(X)(p11.22)[28]	ausente	ausente
TS15	mos 45,X[38]/46,X,i(Xq)[12]	ausente	ausente
TS16	45,X	ausente	ausente
TS17	45,X	ausente	ausente
TS18	45,X	ausente	ausente
TS19	45,X	ausente	ausente
TS20	45,X	ausente	ausente
TS21	mos 45,X[29]/46,XX[21]	ausente	ausente
TS22	45,X	ausente	ausente

* Com excepção do gene *DAZ1*, para o qual não foi obtida amplificação nos dois tecidos analisados.
 ** A hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) revelou que o cromossoma marcador é derivado do cromossoma 15: ish.der(15)(pMC15+).
 NA: não analisado; a amplificação dos 4 loci por PCR simples originou bandas de forte intensidade, pelo que se entendeu não ser necessário efectuar PCR *nested*

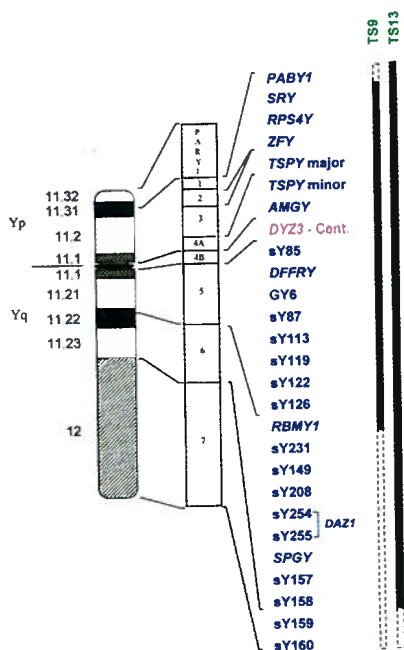


Fig. 4 – Diagrama representativo dos loci específicos do cromossoma Y pesquisados nos indivíduos TS9 e TS13 com síndrome de Turner: ■ loci presentes; --- loci ausentes. As barras não são representativas da estrutura dos der(Y) detectados nas duas doentes.

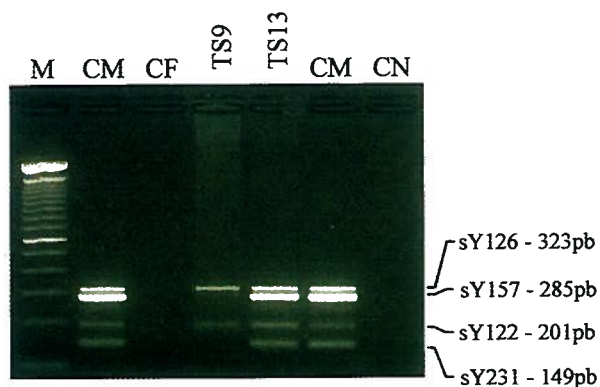


Fig. 5 – Electroforese em gel de agarose do produto da PCR múltipla 1 (M1) realizada em DNA genômico de sangue periférico das doentes TS9 e TS13. Nota a ausência de amplificação dos STSs sY157 e sY231 na doente TS9, e a amplificação de todos os STSs na doente TS13. Canais M, CM, CF e CN – ver legenda da figura 2.

os ensaios de amostras controlo com DNA genômico obtido de indivíduos 46,XY e 46,XX assim como de reacções controlo sem DNA genômico (CN), permitiu despistar tanto resultados falsos negativos, como eventuais contaminações de qualquer um dos reagentes com DNA (falsos positivos).

Caracterização de cromossomas Y estruturalmente anómalos em indivíduos com síndrome de Turner por PCR simples e múltipla.

Os cromossomas Y estruturalmente anómalos

detectados nos indivíduos TS9 e TS13 foram caracterizados por reacções de PCR simples e múltipla em DNA genômico obtido de sangue periférico e mucosa bucal, nas quais foram pesquisados vários loci específicos do cromossoma Y (quadro III). A ausência de amplificação para alguns dos loci permitiu identificar com grande exactidão as sequências deleccionadas e respectivos pontos de quebra, assim como definir as regiões do cromossoma Y presentes nas doentes em causa (figura 4). Ilustra-se, na figura 5, a electroforese relativa a uma reacção de PCR múltipla e na figura 6, a coelectroforese dos produtos de duas PCRs. Evidencia-se a ausência de amplificação dos STSs sY157 e sY231 (figura 5) e do locus *PABY1* (figura 6) para a doente TS9. As duas deleções detectadas na doente TS9, uma em Yp11.31 (com ponto de quebra entre *SRY* e *PABY1*) e a outra em Yq11.23 (com ponto de quebra entre *RBMY1* e sY231) (figura 4), justificam-se pelo facto do cromossoma identificado nesta doente ser um cromossoma em anel. Os resultados da análise molecular permitem concluir que a formação deste cromossoma em anel envolveu a fusão entre Yp11.31 e Yq11.23, de que resultou a perda das sequências do cromossoma Y de localização distal relativamente aos pontos de quebra referidos. Por sua vez, no cromossoma isodidcêntrico (TS13) só foi detectada a ausência de sequências específicas da heterocromatina (sY159 e sY160). Este cromossoma isodidcêntrico formou-se por fusão das sequências Yq11.23, tendo o material do braço longo (duplicado) ficado localizado entre os dois centrómeros. As sequências do braço curto (Yp11), também duplicadas, ficaram localizadas em posição distal (figura 3).

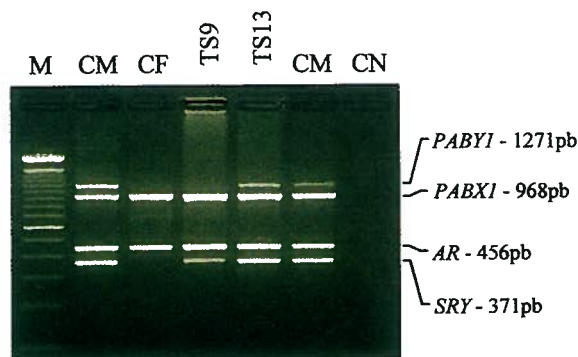


Fig.6 – Co-electroforese em gel de agarose dos produtos das PCRs relativas à pesquisa dos loci *PABY1* e *SRY* em DNA genômico de sangue periférico das doentes TS9 e TS13. O locus *SRY* foi coamplificado com uma sequência específica do gene receptor de androgénios (*AR*), enquanto que para *PABY1* se usou como controlo de amplificação a região homóloga no cromossoma X (*PABX1*). Evidencia-se a amplificação dos 4 loci na doente TS13 e a ausência de amplificação do locus *PABY1* na doente TS9. Canais M, CM, CF e CN – ver legenda da figura 2.

DISCUSSÃO

Considerando os resultados obtidos nos testes de sensibilidade verifica-se que as reacções de PCR *nested* apresentam uma sensibilidade 20-370 vezes superior à PCR simples (quadro IV). Assim, a caracterização estrutural dos cromossomas Y poderá ser efectuada só por recurso à PCR simples, se o material do Y existir numa percentagem de células no mosaico passível de ser detectada com esta metodologia (1/200-1/2 000 células), mas requer reacções de PCR *nested* se a linha minoritária estiver fracamente representada (1/20 000-1/125 000 células). No caso de doentes negativas para sequências centroméricas (*DYZ3*), a detecção de outras sequências específicas do cromossoma Y, presentes num autossoma ou num dos cromossomas X, bastará ser efectuada por PCR simples.

O estudo das 22 doentes com TS iniciou-se com a análise do fenótipo clínico (quadro I) que revelou as dismorfias mais frequentemente associadas ao síndrome. Contudo, não foi possível estabelecer uma correlação entre o número de dismorfias por doente e o respectivo cariotipo.

Os resultados da pesquisa de sequências do cromossoma Y para os loci *SRY*, *TSPY*, *DYZ3* e *DAZI* nas 22 doentes com TS permitem evidenciar:

- i) a presença de material do cromossoma Y em duas doentes: TS9 e TS13. A doente TS13 revelou-se positiva para os 4 loci pesquisados, enquanto que na doente TS9 não se detectou a presença de sequência do gene *DAZI*, em nenhum dos ensaios realizados por PCR simples (quadro V, figura 4). Nesta doente, a presença de material do cromossoma Y (loci *SRY*, *TSPY* e *DYZ3*) e a ausência de *DAZI* também foi confirmada por PCR *nested* tanto em DNA genómico obtido de sangue periférico como de mucosa bucal.
- ii) que as 20 doentes negativas para os 4 loci referidos, pesquisados numa primeira fase por PCR simples, continuaram a revelar-se negativas após PCR *nested*, tanto em DNA obtido de sangue periférico como de mucosa bucal.

Os ensaios de sensibilidade deste e de outros estudos, demonstraram que a capacidade de detecção de mosaicos sub-representados está dependente da sensibilidade da metodologia usada. Contudo, vários autores referem que a capacidade de detecção de uma linha celular minoritária também está dependente do tipo e número de tecidos analisados^{6,9,11,13}. Bisat *et al*⁶ identificaram por PCR simples material do Y nas gónadas de um indivíduo 45,X com genitais externos virilizados, para o qual a pesquisa de mosaicismo no sangue periférico se tinha revelado negativa. Em outro estudo, a análise cromossómica de fibroblastos

em cultura, obtidos de quatro indivíduos com suspeita de TS e cariotipo normal no sangue periférico, permitiu identificar em todas as doentes uma linha minoritária 45,X ou 45,X,del(X) e confirmar o diagnóstico de TS¹¹. Petrussevska *et al*⁹ detectaram uma distribuição variável da linha celular contendo um cromossoma marcador derivado do Y em tecido gonadal, pele e linfócitos de uma doente com TS. Da mesma forma Nazarenko *et al*¹³ reportaram que em 92% das doentes estudadas com TS e cariotipo em mosaico, a representatividade da linha minoritária é função do tipo de tecido analisado. No presente estudo, embora a pesquisa de sequências do Y em dois tecidos com origem embrionária diferente não tenha contribuído para aumentar a percentagem de indivíduos positivos para sequências do cromossoma Y, permitiu excluir, com elevada probabilidade, a presença de sequências do referido cromossoma em 20 das 22 doentes com TS analisadas. A elevada probabilidade de exclusão de sequências do cromossoma Y nas 20 doentes referidas, tem por base: i) a elevada sensibilidade da metodologia usada (PCR *nested*); ii) a inclusão de controlos negativos e positivos em todas as reacções; iii) a coamplificação de um locus não ligado ao cromossoma Y que permitiu demonstrar, nas condições experimentais ensaiadas, o funcionamento de PCRs simples e *nested* e iv) a pesquisa de sequências do cromossoma Y em dois tecidos (sangue periférico e mucosa bucal) com origem embrionária diferente.

No âmbito do presente trabalho, detectou-se uma frequência de 9% (2/22) de indivíduos com material do cromossoma Y presente em linhas celulares minoritárias. Esta frequência enquadra-se nos resultados obtidos por diversos autores, os quais reportaram que 0-61% das doentes com TS possuíam material do Y (quadro VI). Esta variabilidade de resultados deve-se principalmente à selecção da amostra. Enquanto diversos autores só incluem doentes com cariotipo 45,X, outros seleccionam também doentes com cariotipo em mosaico e/ou virilização, das quais algumas apresentam evidência ou suspeita citogenética da presença de material do cromossoma Y. Este tipo de selecção da amostra contribui para enriquecer o grupo em doentes positivas para sequências do cromossoma Y. Tal é evidenciado quando se dividem os dados presentes no quadro VI em dois grupos: doentes 45,X (525 doentes) e doentes com outro cariotipo (não 45,X; 228 doentes). A frequência de doentes 45,X nas quais foram detectadas sequências do cromossoma Y é de 5,7% (30/525), mas atinge os 17% (39/228) quando se consideram os indivíduos com outros cariotipos. Quanto ao presente estudo, o facto de não se terem detectado sequências do Y em nenhum dos 12 indivíduos 45,X está de acordo com os

Quadro VI: Sinopse dos resultados obtidos por diferentes autores relativos à pesquisa de seqüências do cromossoma Y em indivíduos com síndrome de Turner

Referência	Medlej et al. ⁴⁰	Kocova et al. ⁴¹	Witt et al. ⁴²	Yankowitz et al. ⁴³	Binder et al. ³⁰	Chu et al. ⁴⁴	Coto et al. ⁴⁵	Larsen et al. ⁷	Fernández et al. ⁸	Jacobs et al. ⁴⁶	Yorifuji et al. ¹⁰	López et al. ³	Otipova et al. ⁴⁷	Patsalis et al. ⁴⁸	Quilter et al. ⁴⁹	Martínez-Passarell et al. ⁵⁰	Mendes et al. ⁵¹	Damiani et al. ⁵²	Presente estudo	Total
Metodologia	PCR	PCR e SB	PCR	PCR	PCR nested	PCR e SB	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR/ SB	PCR	PCR nested e SB	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR nested
(loci analisados)	(SRY)	(SRY, DY23)	(SRY, DY23)	(SRY, Yq)	(SRY, DY23)	(9 loci) ^{d)}	(4 loci) ^{f)}	(5 loci) ^{h)}	(SRY; DY23)	(5 loci) ⁱ⁾	(SRY; DY23)	(4 loci) ^{j)}	(SRY; AMGLY)	(12 loci) ^{k)}	(8 loci) ^{m)}	(SRY; DY23)	(SRY; ZFY, DY23)	(7 loci) ⁿ⁾	(4 loci)	
Nº indivíduos estudados / Nº indivíduos com seq. do Y	40 / 1	18 / 6 ^{a)}	28 / 8	43 / 0 ^{b)}	53 / 2	100 / 9 ^{c)}	18 / 11 ^{c)}	40 / 0	25 / 1	97 / 0	18 / 0	50 / 6	13 / 4	50 / 12 ^{l)}	50 / 2	14 / 1	36 / 2	40 / 2	22 / 2	753 / 69
1) 45,X	37 / 1	10 / 4	15 / 0	27 / 0	30 / 1	48 / 2	15 / 8	40 / 0	10 / 0	97 / 0	18 / 0	36 / 4	8 / 1	21 / 5	50 / 2	14 / 1	15 / 1	22 / 0	12 / 0	525 / 50
2) 46,X,i(X); 46,X,r(X); 46,X,del(X)					3 / 1				1 / 1								2 / 0	5 / 0	1 / 0	
3) 46,X,+mar												2 / 2	2 / 2							
4) 45,X/46,XX; 45,X/46,X,i(X); 45,X/46,X,r(X); 45,X/46,X,del(X); 45,X/47,XXX; 45,X/46,X,del(X); 45,X/46,X,psudie(X)	3 / 0	7 / 2	3 / 0		16 / 0	31 / 1			12 / 0			9 / 0	1 / 1	15 / 1			11 / 0	11 / 0	7 / 0	
5) 45,X/46,XY; 45,X/46,X,i(Y); 45,X/46,X,r(Y)			3 / 3			4 / 4					1 / 1								2 / 2	
6) 45,X/46,X,+mar		1 / 0	5 / 5			9 / 2	3 / 3		1 / 0		4 / 1	2 / 0	3 / 3				7 / 1	2 / 2		
7) outros					4 / 0	8 / 0			1 / 0					5 / 1			1 / 0			
Percentagem dos indivíduos estudados com seqüências do Y (%)	2.5	33	31	0	4	9	61	0	4	0	0	12	31	24	4	7	6	5	9	9
Percentagem dos indivíduos 45,X com seqüências do Y (%)	2.7	40	0	0	3	4	53	0	0	0	0	11	12	24	4	7	7	0	0	5.7
Percentagem dos indivíduos não 45,X com seqüências do Y (%)	0	25	73	-	4	13	100	-	6	-	-	14	60	24	-	-	48	11	20	17

SB: Southern blotting

a) Nenhum dos indivíduos estudados foi positivo para DY23; b) Não é indicado o cariotipo de 16 dos indivíduos; c) Resultados positivos apenas para SRY em PCR nested; d) PABY, SRY, AMEL, DY23, sY85, sY117, sY146, sY160, Y1; e) Em 2 indivíduos foram apenas detectadas seqüências distais do braço longo do cromossoma Y; f) PABY, SRY, DY23, DY21; g) Foram detectadas seqüências do cromossoma Y em 5 indivíduos 45,X, negativos para DY23; h) SRY, ZFY, DY23, DY21, DY132; i) AMGLY, SRY, PABY, DY23, DY21; j) PCR: DY23, ZFY, SRY, DY21; SB: Y97, ZFY, ZFX; k) SRY, TSPY, RBM, DYS264, DY23, DYS272, DYS275, KALY-151; DY2318, DYF4951; DY2348, DY21; l) Resultados positivos (que não incluem as seqüências centroméricas DY23) apenas em PCR nested para 2 dos 12 indivíduos; m) SRY, DYS251, DYS268, DY23, DYS272, DYS219, DYS240; n) SRY, sY57, sY59, sY85, sY94, sY124, sY157.

resultados que sugerem uma menor frequência de indivíduos com seqüências do cromossoma Y em linhas celulares minoritárias.

Na segunda fase do presente estudo procedeu-se à caracterização molecular (PCR simples e múltipla) dos cromossomas Y estruturalmente anómalos detectados nas doentes TS9 e TS13 (figura 4). A ausência de amplificação das seqüências distais específicas dos braços curto e longo do cromossoma Y, respectivamente PABY1, sY231-sY160, em ambos os tecidos analisados da doente TS9, está de acordo com os resultados da análise citogenética e FISH, que identificaram um cromossoma em anel derivado do cromossoma Y. Contudo, o estudo molecular permitiu demonstrar, ainda, que o cromossoma referido possui as seqüências compreendidas entre os genes SRY (intervalo 1A) e RBMY1 (intervalo 6B). Dada a existência de duas deleções, uma em Yp11.32 e outra em Yq11.23, o referido cromossoma em anel foi formado pela fusão das seqüências do braço curto e longo, tendo sido seleccionada a região pseudoautossômica 1 do cromossoma Y, todas as cópias da família de genes DAZ presentes no intervalo 6 (Yq11.23) e toda a região heterocromática (Yq12). Do mesmo modo, demonstrou-se por biologia molecular e por FISH, que o cromossoma Y isodicêntrico detectado no indivíduo TS13 é compatível com a presença de sY157 e sY158 e com a ausência de sY159 e sY160, confirmando-se que o cromossoma isodicêntrico se originou após deleção da heterocromatina e por fusão das seqüências distais do intervalo 6. Assim, esta doente possui numa percentagem minoritária de células um cromossoma Y isodicêntrico que contém todas as seqüências da eucromatina duplicadas e

dois centrómeros, um dos quais possivelmente inativado para que a segregação mitótica seja correcta.

Perante os resultados obtidos, considerando que nos indivíduos TS9 e TS13 não foram detectados sinais de virilização e tendo a análise histológica das gónadas (após gonadectomia profiláctica realizada anteriormente ao presente estudo) revelado a ausência de tecido testicular e de neoplasias, é difícil prever se a presença de material do cromossoma Y, detectado numa percentagem minoritária de células (2% para TS9 e 17% para TS13), viria a contribuir para a virilização destes indivíduos. De facto, a presença de linhas celulares maioritárias com material do cromossoma Y, incluindo SRY, nem sempre está associada à virilização⁵³. Contudo, dado que o estudo molecular realizado nas doentes TS9 e TS13 demonstrou a presença dos intervalos 4A-5A do cromossoma Y, onde tem sido proposta a existência de genes implicados no desenvolvimento de gonadoblastomas, e tal como foi realizado nestas doentes, é sempre preconizada uma gonadectomia profiláctica.

Considerando que a análise citogenética clássica possui baixa sensibilidade para a detecção de mosaicismos sub-representados, a pesquisa de seqüências do cromossoma Y em indivíduos com TS não deverá ser feita exclusivamente através da determinação do cariotipo, mas complementada com metodologias que possuem elevada sensibilidade e especificidade, tais como a FISH, a PCR simples e a PCR nested. Sugere-se, assim, que a pesquisa de seqüências específicas do cromossoma Y seja efectuada por rotina em indivíduos 45,X em que a análise citogenética não revele a presença de mosaicismo, e ainda nas doentes

TS em que seja identificado um cromossoma marcador ou que apresentem sinais de virilização. Propõe-se igualmente a pesquisa de *loci* do Y do braço curto e longo, nomeadamente intervalos 4A a 5A e em dois ou mais tecidos de origem embrionária diferente. É também importante a confirmação dos resultados positivos por metodologias diferentes, por exemplo PCR e FISH. Sempre que se identifiquem cromossomas marcadores ou cromossomas estruturalmente anómalos derivados do Y, deve proceder-se à sua caracterização molecular detalhada por forma a detectar com maior precisão as sequências presentes e ausentes, nomeadamente as que têm sido associadas ao desenvolvimento de malignidade gonadal (*GBY* – intervalos 4A-5A). Os estudos moleculares contribuirão, assim, para i) confirmar com elevada probabilidade a existência, ou não, de sequências do cromossoma Y em linhas celulares minoritárias; ii) identificar, com precisão, os intervalos e *loci* do cromossoma Y presentes e ausentes, permitindo estabelecer correlações com a presença ou ausência de distúrbios característicos do TS; iii) esclarecer a formação de cromossomas Y estruturalmente anómalos, com identificação mais precisa dos pontos de quebra. Justifica-se, assim, que este tipo de estudo constitua um método complementar de diagnóstico que contribui, indispensavelmente, para a confirmação do diagnóstico clínico, para a decisão de proceder, ou não, a uma gonadectomia profilática e para o estabelecimento de uma melhor correlação genótipo / fenótipo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem empenhadamente a colaboração das doentes e seus familiares no presente estudo.

BIBLIOGRAFIA

1. ROBINSON A: Demography and prevalence of Turner syndrome. In: Rosenfeld RG, Grumbach MM, editors. Turner syndrome. New York, Basel: Dekker, 1990: 93-100
2. OGATA T, MATSUO N: Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. Hum Genet 1995; 95: 607-29
3. LÓPEZ M, CANTO P, AGUINAGA M et al: Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. Am J Med Genet 1998; 76: 120-4
4. MANGUE AP, MANGUE EJ: Genetics: Human aspects. 2nd Ed. Massachusetts: Sinauer Associates INC, 1990
5. HELD KR, KERBER S, KAMINSKY E et al: Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? Hum Genet 1992; 88: 288-94
6. BISAT T, MAY K, LITWER S, BROECKER B: Y chromosome mosaicism in the gonads, but not in the blood, of a girl with the Turner phenotype and virilized external genitalia. Clin Genet 1993; 44: 142-5

7. LARSEN T, GRAVHOLT CH, TILLEBECK A et al: Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening for "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. Clin Genet 1995; 48: 6-11
8. FERNÁNDEZ R, MÉNDEZ J, PÁSARO E: Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. Hum Genet 1996; 98: 29-35
9. PETRUSEVSKA R, BEUDT U, SCHÄFER D et al: Distribution of marker-Y chromosome containing cells in different tissues of a Turner mosaic patient with mixed gonadal dysgenesis. Clin Genet 1996; 49: 261-6
10. YORIFUJI T, MUROI J, KAWAI M, SASAKI H, MOMOI T, FURUSHO K: PCR-based detection of mosaicism in Turner syndrome patients. Hum Genet 1997; 99: 62-5
11. AZCONA C, BAREILLE P, STANHOPE R: Turner's syndrome mosaicism in patients with a normal blood lymphocyte karyotype. Br Med J 1999; 318: 856-7
12. ABULHASAN SJ, TAYEL SM, AL-AWADI SA: Mosaic Turner syndrome: cytogenetics versus FISH. Ann Hum Genet 1999; 63: 199-206
13. NAZARENKO SA, TIMOSHEVSKY VA, SUKHANOVA NN: High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients. Clin Genet 1999; 56: 59-65
14. HOOK EB, WARBURTON D: The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. Hum Genet 1983; 64: 24-7
15. HASSOLD T, BENHAM F, LEPPERT M: Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. Am J Hum Genet 1988; 42: 534-41
16. VERP MS, SIMPSON JL: Abnormal sexual differentiation and neoplasia. Cancer Genet Cytogenet 1987; 25: 191-218
17. SALO P, KAARIAINEN H, PETROVIC V, PELTOMAKI P, PAGE DC, DE LA CHAPPELLE A: Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome. Genes Chromosomes Cancer 1995; 14: 210-4
18. TSUCHIYA K, REIJO R, PAGE DC, DISTECHE C: Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. Am J Hum Genet 1995; 57: 1400-7
19. LAU YFC: Sex chromosome genetics '99: Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the *TSPY* gene. Am J Hum Genet 1999; 64: 921-7
20. MUROYA K, ISHII T, NAKAHORI Y et al: Gonadoblastoma, mixed germ cell tumor, and Y chromosomal genotype: molecular analysis in four patients. Genes Chromosomes Cancer 1999; 25: 40-45
21. HILDEBRAND R, SCHRODER W, BRUDE E et al: Detection of *TSPY* protein in a unilateral microscopic gonadoblastoma of a Turner mosaic patient with a Y-derived marker chromosome. J Pathol 1999; 189:623-626
22. SINCLAIR AH, BERTA P, PALMER MS et al: A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 1990;346:240-4
23. ARNEMANN J, EPPLEN JT, COOKE HJ, SAUERMANN U, ENGEL W, SCHMIDTKE J: A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. Nucleic Acids Res 1987;15:8713-24
24. WOLFE J, DARLING SM, ERICKSON RP et al: Isolation and characterization of an aliphoid centromeric repeat family from the

- human Y chromosome. *J Mol Biol* 1985;182:477-85
25. REIJO R, LEE TY, SALO P et al: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995;10:383-93
 26. YUNIS JJ: High resolution of human chromosomes. *Science* 1976;19:1268-70
 27. VIEIRA L, ALVES AC, MARQUES B et al: Insertion of the 5' part of BCR within the ABL gene at 9q34 in a Philadelphia-negative chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 114: 17-21
 28. BEHLKE MA, BOGAN JS, BEER-ROMERO P, PAGE DC: Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics* 1993; 17: 736-9
 29. LUBAHN DB, BROWN TR, SIMENTAL JA et al: Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9534-8
 30. BINDER G, KOCH A, WAJS E, RANKE M: Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: Is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3532-6.
 31. LAVINHA J, GONÇALVES J, FAUSTINO P et al: Importation route of the sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology. *Hum Biol* 1992; 64: 891-909
 32. VOLLRATH D, FOOTE S, HILTON A et al: The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258: 52-59
 33. JONES MH, KHWAJA OSA, BRIGGS H et al: A set of ninety-seven overlapping yeast artificial chromosome clones spanning the human Y chromosome euchromatin. *Genomics* 1994;24:266-75
 34. VOGT PH, EDELMANN A, KIRSCH S et al: Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5:933-43
 35. BARBOSA AS, FERRAZ-COSTA T, SEMER M, LIBERMAN B, MOREIRA-FILHO CA: XY gonadal dysgenesis and gonadoblastoma: a study in two sisters with a cryptic deletion of the Y chromosome involving the SRY gene. *Hum Genet* 1995;95:63-66
 36. NAKAHORI Y, HAMANO K, IWAYA M, NAKAGOME Y: Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *Am J Med Genet* 1991;39:472-3
 37. BROWN GM, FURLONG RA, SARGENT CA et al: Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human *DFFRY* gene and comparative expression analysis and mapping to the *Sxr^b* interval of the mouse Y chromosome of *Dffry* gene. *Hum Mol Genet* 1998;7:97-107
 38. ELLIS N, KIDD J, GOODFELLOW PJ, KIDD K, GOODFELLOW PN: Strong linkage disequilibrium between the XY274 polymorphism and the pseudoautosomal boundary. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 950-5
 39. BIANCHI DW, ZICKWOLF GK, WEIL GJ, SYLVESTER S, DEMARIA MA: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 705-8
 40. MEDLEJ R, LOBACCARO JM, BERTA P et al: Screening for Y derived sex determining gene SRY in 40 patients with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1289-92
 41. KOCOVA M, SIEGEL SF, WENGER SL, LEE PA, TRUCCO M: Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet* 1993; 342: 140-3
 42. WITT M, MICHALCZAK K, LATOS-BIELENSKA A, JARUZELSKA J, KUCZORA I, LOPEZ M: An improved, non-isotopic method of screening cells from patients with abnormalities of sexual differentiation for Y chromosomal DNA content. *J Med Genet* 1993; 30: 304-7
 43. YANKOWITZ J, NEELY EK, HAJDU K, NORTON ME, ROSENFELD RG, GOLBUS MS: Screening of Turner subjects by PCR for occult Y-chromosomal DNA. *Am J Hum Genet* 1993; 53 suppl: 1766
 44. CHU CE, CONNOR JM, DONALDSON MDC, KELNAR CJH, SMAIL PJ, GREENE SA: Detection of Y mosaicism in patients with Turner's syndrome. *J Med Genet* 1995;32:578-80
 45. COTO E, TORAL JF, MENÉNDEZ MJ et al: PCR-based study of the presence of Y-chromosome sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1995;57:393-6
 46. JACOBS P, DALTON P, JAMES R et al: Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 1997;61:471-83
 47. OSIPOVA GR, KARMANOV ME, KOZLOVA SI, EVGRAFOV OV: PCR detection of Y-specific sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome: clinical implications and limitations. *Am J Med Genet* 1998;76:283-7
 48. PATSALIS PC, SISMANI C, HADJIMARCOU MI et al: Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clin Genet* 1998;53:249-57
 49. QUILTER CR, TAYLOR K, CONWAY GS, NATHWANI N, DELHANTY JDA: Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome. *Ann Hum Genet* 1998;62:99-106
 50. MARTÍNEZ-PASARELL O, TEMPLADO C, EGNOZCUE J, VICENS-CALVET E, NOGUÉS C: PCR protocol to detect parental origin and hidden mosaicism in sex chromosome aneuploidies. *Horm Res* 1999;51:248-52
 51. MENDES JRT, STRUFALDI MWL, DELCELO R et al: Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism. *Clin Endocrinol* 1999;50:19-26
 52. DAMIANI D, GUEDES DR, FELLOUS M et al: Ullrich-Turner syndrome: relevance of searching for Y chromosome fragments. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12:827-831
 53. MOROVA E, HERMANN R., CZAKÓ M, SOLTÉSZ G, KOSZTOLÁNYI G: Isodicentric Y chromosome in an Ullrich-Turner patient without virilization. *Am J Med Genet* 2000; 91:99-101