

Alexis Dourado Guedes

**Determinação do fenótipo sexual em uma criança com mosaicismo
45,X/46,X,ídico(Yp): importância da proporção relativa da linhagem
45,X no tecido gonadal.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Mestre em Endocrinologia

São Paulo

2006

Alexis Dourado Guedes

Determinação do fenótipo sexual em uma criança com mosaicismos

45,X/46,X,idi(Yp): importância da proporção relativa da linhagem

45,X no tecido gonadal.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do
Título de Mestre em Endocrinologia

Orientadora:

Profa. Dra. Ieda Therezinha do Nascimento Verreschi

Co-orientadora:

Profa. Dra. Mônica Vannucci Nunes Lipay

Coordenador:

Prof. Dr. Sérgio Atala Dib

São Paulo

2006

Guedes, Alexis Dourado Guedes

**Determinação do Fenótipo Sexual em uma Criança com Mosaicismo 45,X/46,X,Idic(Yp):
Importância da Proporção Relativa da Linhagem 45,X no Tecido Gonadal./ Alexis Dourado Guedes – São
Paulo, 2006.**

xlvi, 46p

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina –
Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia.

Título em inglês: Determination of the Sexual Phenotype in a Child with 45,X/46,X,Idic(Yp) Mosaicism:
Importance of the Relative Proportion of the 45,X Line In Gonadal Tissue

1-Mosaicismo; 2-Diferenciação Sexual; 3-Isocromossomos; 4-Cromossomo Y; 5- Hibridação *In Situ*
Fluorescente; 6- Reação de Cadeia de Polimerase.

Das Utopias

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos se não fora

A mágica presença das estrelas!

Mario Quintana

A Dirceu, Dinalva, Thaisa e Lorena,
por todo incentivo em meio
a tanta saudade.

Agradecimentos:

UNIFESP

À Dra. Ieda pela confiança, paciência e convivência enriquecedora.

À Dra. Mônica Lipay por todo cuidado e compreensão.

À Bianca Bianco pelo indispensável suporte e amizade.

À Sâmia Cavassâni pela amizade e auxílio incondicional.

À Lenira Stella pelo companheirismo e amizade.

À Ivonne, Lílian, Kelly, Eduardo, Luciane, pelo carinho, amizade e saudável convivência.

À Ângela, Hilda, Felipe e demais colegas do 12º por toda ajuda e disponibilidade.

À Amarillys por todo suporte e disposição em ajudar.

À Elizabete, Gabriela, e todos os pós-graduandos da endocrinologia pelo coleguismo e amizade.

Aos amigos residentes da disciplina de endocrinologia pelo estímulo e confiança.

Aos colegas da genética pelo respeito e tolerância.

HOSPITAL SANTA MARCELINA

À Dra. Ana Paula Normando pelo respeito, amizade e oportunidade.

À Dra. Jandimare Ruback pelo carinho e amizade indispensáveis.

À Michele, Ana Luiza e demais preceptores do HSM pela amizade e coleguismo.

Aos amigos residentes de endocrinologia do HSM pelo estímulo e confiança.

SALVADOR

A Dirceu e Dinalva Guedes por serem sempre exemplos motivadores e por todo amor.

À Thaisa e Fábio Trujilho pelo suporte e carinho.

À Lorena Arruda pela fé, confiança, companheirismo e amor.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro com a Bolsa para a pós-graduação.

À família da paciente pelo interesse e disponibilidade.

Sumário

1 – INTRODUÇÃO.....	08
Referências.....	20
2 – OBJETIVO.....	28
3 – ARTIGO.....	29
4 – CONCLUSÃO.....	42
5 – ANEXOS.....	43
Consentimento informado.....	43
Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa – UNIFESP.....	46

1 - Introdução

A fertilização humana de um óvulo por um espermatozóide, ambas as células com constituição habitual haplóide, dá origem a uma célula ovo com material genético diplóide específico para o desenvolvimento de um indivíduo. Caracteristicamente, o zigoto e as células filhas, que se originam e diferenciam-se a partir dele, têm um total de quarenta e quatro cromossomos autossômicos e dois cromossomos sexuais.

Aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais originadas durante a formação dos gametas ou mesmo após a fecundação, podem prejudicar o desenvolvimento embrionário, sendo na maioria das vezes letais ou, em algumas poucas situações, permitindo a formação de indivíduos com anormalidade no genótipo. (Robinson *et al.*, 1999).

Na vigência de uma anormalidade cromossômica em uma linhagem celular, é possível que coexistam num mesmo embrião outras linhagens inalteradas, ou outras com alterações distintas. Quando diferentes células de um mesmo indivíduo, originadas a partir de um único zigoto, apresentam constituições cromossômicas diferentes, ou seja, mais de uma linhagem celular, tem-se o fenômeno do mosaicismo cromossômico (Rieger *et al.*, 1991, Thompson *et al.*, 2002).

Mecanismos de formação do mosaicismo

O mosaicismo pode se apresentar em associação a anormalidades cromossômicas numéricas ou estruturais. As anomalias mais comumente encontradas no diagnóstico pré-natal envolvem trissomias nas quais as células anormais contêm 47 cromossomos (Bui *et al.*, 1984, Hahnemann & Vejerslev, 1997). Dois mecanismos foram associados à gênese do mosaicismo. Um mecanismo com origem meiótica, pré-zigótica, e outro com origem somática, pós zigótica (Thompson *et al.*, 2002).

A descrição do primeiro mecanismo pode ser facilitada pelo entendimento da formação das trissomias. Durante a gametogênese parental, um erro de segregação cromossômica, a não disjunção, pode ocorrer na meiose I ou II. No caso do distúrbio ocorrer na meiose I, dois cromossomos homólogos são carregados para uma mesma célula filha, dando origem a duas células dissômicas e duas nulissômicas. Caso o distúrbio ocorra na meiose II, as cromátides irmãs não se separam e são levadas para uma mesma célula filha. As células reprodutivas, formadas ao final do processo com o cromossomo excedente, após a fecundação, formam zigotos trissômicos. Na trissomia do cromossomo 21, responsável pela síndrome de Down, estudos com grande número de pacientes demonstraram que a fase da divisão na qual o distúrbio pré-zigótico ocorre difere em incidência a depender da origem na oogênese ou espermatogênese. Na gametogênese materna a não disjunção na meiose I é o principal mecanismo formador da trissomia enquanto que a não disjunção na meiose II é o principal mecanismo da paterna (Antonarakis *et al.*, 1993, Lamb *et al.*, 1996). A partir da formação de um zigoto trissômico, a perda anafásica do cromossomo

excedente nas divisões celulares subseqüentes, restaura uma linhagem dissômica desenvolvendo o mosaicismo (Zaragoza *et al.*, 1994)

O segundo mecanismo implicado na gênese do mosaicismo, o somático ou pós-zigótico, origina-se de um zigoto com número normal de cromossomos, logo após a fecundação sendo que, em uma das divisões subseqüentes, sofre uma não disjunção mitótica ou perda anafásica de um dos cromossomos dando origem a uma linhagem com número diferente de cromossomos. Por esse último mecanismo, quando uma não disjunção dá origem a uma trissomia, a linhagem que perdeu o cromossomo para a linhagem trissômica tende a não continuar se reproduzindo (Gardner & Sutherland, 1996). Um exemplo, que tem no processo principal de formação do mosaicismo embrionário, o distúrbio pós-zigótico, é a trissomia do cromossomo 8 (Robinson *et al.*, 1995, Karadima *et al.*, 1998).

Considerando as anormalidades estruturais cromossômicas, essas podem também originar mosaicismo pela instabilidade que estes cromossomos podem ter na divisão celular. Hsu (1994), revisando séries com alterações estruturais do cromossomo sexual Y, encontrou presença freqüente de mosaicismo com uma linhagem 45,X. Provavelmente, as diversas aberrações estudadas favoreceram a fragmentação e ou perda do cromossomo sexual alterado.

Significância clínica do mosaicismo cromossômico

A influência do mosaicismo cromossômico no fenótipo depende de diversos fatores. Dentre os principais, tem-se o momento do desenvolvimento que o

mosaicismo aparece, a distribuição quantitativa entre as linhagens, a pressão seletiva sobre as linhagens em mosaico e os tipos celulares envolvidos (Youssoufian & Pyeritz, 2002). Esses fatores devem sempre ser considerados em conjunto, devido à completa inter-relação entre eles.

A interação entre esses fatores pode ser ilustrada considerando o exemplo da descoberta de mosaicismo cromossômico por meio de uma biópsia de vilos coriônicos, realizada durante a gestação. O risco de mosaicismo fetal associado nesta situação é da ordem de 10,7 % (Phillips *et al.*, 1996). Sendo assim, em quase 90% das vezes o mosaicismo no vilos não é confirmado no feto. Uma das explicações para este fato é que o momento do surgimento do mosaicismo pode determinar o envolvimento de linhagens celulares trofoblásticas sem, contudo, acometer linhagens embrionárias. Este fenômeno chamado de mosaicismo confinado à placenta foi inicialmente descrito por Kalousek & Dill (1983).

Quando, durante o desenvolvimento, surge uma célula com constituição cromossômica anormal, pressões seletivas podem levar a propagação ou restrição reprodutiva da linhagem modificada em relação às células normais. A manutenção e distribuição do mosaicismo dependerão da estabilidade e capacidade reprodutiva das células alteradas. Gravholt *et al.* (1991) avaliando prospectivamente um grupo de pacientes com mosaicismo cromossômico estabelecido, demonstrou modificações nas proporções entre as linhagens nas cariotipagens subseqüentes. Tanto o aumento quanto redução na relação entre as células normais e anormais foram detectadas nos diferentes mosaicos estudados.

O tipo celular envolvido no mosaicismos cromossômico pode trazer implicações clínicas importantes. A restrição do mosaicismos cromossômico à linhagem germinativa sem acometimento somático pode determinar consequências para prole sem afetar o genitor portador. Tseng *et al.* (1994) descreveram uma família onde ambos os pais eram normais e três dos quatro filhos tinha síndrome de Down. A biopsia do ovário materno revelou trissomia do cromossomo 21 no tecido gonadal e análise de polimorfismos do DNA sugeriram segregação da oogônia com trissomia como a causa para a recorrência da síndrome.

Poucas aneuploidias cromossômicas, como as trissomias do cromossomo 21, 18 e 13, apresentam-se em nascidos vivos em frequência suficiente para se determinar uma incidência populacional significativa (Goldstein & Nielsen, 1988, Devlin & Morrison, 2004b). A grande maioria das aneuploidias é incompatível com desenvolvimento fetal completo, resultando, usualmente, em abortos espontâneos. Em algumas situações, onde a forma pura das aneuploidias tem um prognóstico usualmente letal, a associação com uma linhagem normal em mosaico pode permitir, a manutenção da gestação (Youssofian & Pyeritz, 2002). A Síndrome de Warkany, trissomia do cromossomo 8, e a trissomia do cromossomo 16 com expressão clínica extremamente variável, exemplificam a influência do mosaicismos possibilitando o nascimento de nativos (Benn, 1998, Devi *et al.*, 1993, Pletcher *et al.*, 1994, Riccardi, 1977).

A presença do mosaicismos celular de linhagens celulares normais com outras com aneuploidias ou anormalidades estruturais cromossômicas pode atenuar os achados esperados para apresentação clínica sindrômica completa. Este motivo foi

sugerido por Devlin & Morrison (2004a) como justificativa para as diferentes incidências encontradas entre descrições clássicas da frequência populacional da síndrome de Down e seu estudo, onde a identificação do portador com mosaïcismo foi maior que a habitualmente descrita (Devlin & Morrison, 2004a, Devlin & Morrison, 2004b).

Considerando o aspecto do desenvolvimento mental de indivíduos com síndrome de Down, a comparação entre portadores de mosaïcismo e indivíduos com trissomia completa do cromossomo 21 demonstrou diferenças significativas favorecendo os primeiros em pelo menos duas avaliações subseqüentes (Fishler *et al.*, 1976, Fishler & Koch, 1991). Nesta situação, não só a presença do mosaïcismo como também a proporção das células trissômicas e normais pode influenciar o fenótipo. Uma distribuição quantitativa favorecendo amplamente a linhagem normal pode até permitir o desenvolvimento intelectual normal (Moreira *et al.*, 2000).

Diagnóstico de mosaïcismo cromossômico

O diagnóstico do mosaïcismo cromossômico tradicionalmente é realizado por meio de um cariótipo, com análise de células em metáfases, obtidas de uma cultura de uma amostra tecidual. Ele pode ser realizado no período pré-natal com biópsia do vilo coriônico e por aminocentese ou após o nascimento, com a coleta de sangue, biópsia de pele ou qualquer outro tecido. Quanto maior o número de células analisadas maior será a chance de sua detecção (Hook, 1977).

Importância do mosaicismo celular na expressão clínico-fenotípica da síndrome de Turner.

A síndrome de Turner, descrita clinicamente em 1938 (Turner, 1938) é uma condição genética na qual a ausência parcial ou completa de um dos cromossomos sexuais determina um fenótipo feminino com estigmas físicos e características clínicas peculiares. Além da baixa estatura e da disgenesia gonadal, características mais frequentes da síndrome, o envolvimento clínico pode ocorrer em múltiplos órgãos e sistemas (Gravholt *et al.*, 1998).

À apresentação clínica, estigmas físicos e alterações dismórficas detectadas ao exame como sombrancelhas espessas, ptose palpebral, pregas epicânticas, fendas palpebrais oblíquas para baixo, estrabismo, micrognatia, palato em ogiva, pescoço curto, baixa implantação de cabelos e orelhas, pescoço alado, tórax em escudo, aumento da distância intermamilar, geno e cúbito valgo, quarto metacarpo curto, displasias ungueais e nevos pigmentados podem estar presentes (Frias & Davenport, 2003, Stratakis & Rennert, 2005).

Juntamente com os achados físicos externos, a síndrome pode determinar ou favorecer a disfunção cardiovascular, com anormalidades aórticas e valvulares, endócrinas, com alterações tireoideanas auto-imunes, a presença de distúrbios no metabolismo glicídico e a insuficiência gonadal além de alterações ortopédicas, urinárias, auditivas e oftalmológicas, exigindo uma conduta multidisciplinar sistematizada (Frias & Davenport, 2003, Lippe, 1991, Saenger *et al.*, 2001, Stratakis & Rennert, 2005, Sybert & McCauley, 2004).

Diversos Levantamentos realizados com dados obtidos a partir da suspeita clínica confirmada por cariótipo, definiram a prevalência clássica de 1:2000 a 1:5000 mulheres nascidas vivas (Lippe, 1991). Dessa forma, infere-se que o fenótipo e sintomas associados foram critérios determinantes para a suspeita e o conseqüente diagnóstico.

O advento da triagem materna, realizado em gestantes com idade avançada, por meio de dosagens séricas maternas e achados ultrassonográficos fetoplacentários, associados à utilização da amniocentese e da biópsia de vilo coriônico, o diagnóstico de anomalias no cariótipo ainda no período pré-natal (Bronshtein *et al.*, 2003, Haak *et al.*, 2002, Phillips *et al.*, 1996, Ruiz *et al.*, 1999). Ainda que a idade materna não tenha sido estabelecida como fator de risco para o desenvolvimento da síndrome de Turner (Warburton *et al.*, 1980), tais procedimentos levaram ao seu diagnóstico incidental e sugeriram uma incidência subestimada no diagnóstico pós-natal em relação ao pré-natal (Gravholt *et al.*, 1996, Hook & Warburton, 1983, Nielsen & Wohler, 1991). A principal causa sugerida para esta diferença é a presença do cariótipo 45,X/46,XX. Assim como mencionado anteriormente em outras aneuploidias, alguns trabalhos demonstraram que as características e estigmas da síndrome são menos freqüentes quando uma linhagem normal apresenta-se em mosaicismo.

Pasquino *et al.* (1997) pesquisaram o desenvolvimento da puberdade e menarca espontâneas em pacientes com síndrome de Turner, num grande estudo multicêntrico retrospectivo. Ainda que sejam encontrados, na maioria das pacientes

com síndrome de Turner, ovários em fita não funcionantes, uma taxa de 40,6% de puberdade espontânea nas pacientes 45,X/46,XX foi observada, diferindo dos 9,2% encontrados nas pacientes 45,X.

Gunther *et al.* (2004) compararam num grupo com ST e idades entre nove meses e quatro anos, as crianças com alterações cariotípicas de ST diagnosticadas no período pré-natal, incidentalmente, com as diagnosticadas pela apresentação clínica no período pós-natal, diagnóstico tradicional. Enquanto no grupo com diagnóstico incidental o cariótipo 45,X/46,XX foi o mais prevalente (56%), nas crianças diagnosticadas após o nascimento o cariótipo mais prevalente foi o 45,X não mosaico (74%). Ainda no trabalho referido, as crianças com diagnóstico incidental tiveram menos estigmas, e também menos complicações cardiovasculares quando comparadas com as diagnosticadas tradicionalmente.

O mosaicismo celular na síndrome de Turner pode ter implicações ainda mais importantes do que o efeito atenuante descrito nas características e estigmas da síndrome. Da mesma forma que mencionado anteriormente para outras alterações cromossômicas letais, a presença de uma segunda linhagem celular além da 45,X pode ser um fator necessário para a viabilização do feto (Held *et al.*, 1992). Foi descrito que 99% das gestações com cariótipo 45,X não chegam ao término com o conceito vivo, sendo que a maioria sofre aborto espontâneo precocemente (Hook, 1978).

Ainda que o cariótipo 45,X seja o mais comumente descrito no diagnóstico pós-natal, esta informação deve ser interpretada de forma cautelosa, considerando

um aspecto fundamental: o resultado do cariótipo depende do número de células analisadas. Quanto maior o número de células em metáfase avaliadas numa cultura, maior a chance de se identificar o mosaicismo (Hook, 1977). Este fato foi adequadamente demonstrado por Fernandez-Garcia *et al.* (2000) por meio de técnicas moleculares em pacientes com diagnóstico de síndrome de Turner no cariótipo de sangue periférico. Após a avaliação por FISH (hibridação *in situ* fluorescente) no mesmo tecido do cariótipo, o sangue periférico, e aumento importante do número de células analisadas, dos dezesseis casos originalmente 45,X, apenas em quatro não foi detectado mosaicismo oculto.

Outro importante aspecto em relação à presença de mosaicismo é que este pode variar de forma significativa entre os diversos tecidos corporais num mesmo indivíduo (Hanson *et al.*, 2001, Hanson *et al.*, 2002).

Mosaicismo 45,X com seqüência específicas do cromossomo Y

A distribuição variável do mosaicismo a e sua ocorrência oculta têm importância adicional, quando consideramos o envolvimento de cromossomos Y no mosaicismo. A presença desse cromossomo ou de seus fragmentos no material genético de indivíduos com gônadas disgenéticas associa-se à possibilidade de desenvolvimento de gonadoblastoma (Scully, 1970, Verp & Simpson, 1987, Mendes *et al.*, 1999, Lipay *et al.*, 2005).

Classicamente, tem sido sugerido que a detecção de um cromossomo marcador à citogenética clássica ou a presença de sinais clínicos de virilização em

indivíduos com síndrome de Turner determina a avaliação com estudos moleculares para pesquisa seqüências específicas do cromossomo Y (Frias & Davenport, 2003). Porém a restrição dessa avaliação apenas a essas condições é uma conduta questionável. É conceito recente que a não visualização, por cariótipo, de fragmentos do cromossomo Y, não impede que seqüências ocultas deste cromossomo possam estar presentes, nem também as suas implicações na tumorigênese (Canto *et al.*, 2004). Alguns genes tem sido mais frequentemente utilizados nesta avaliação. Dentre eles destaca-se o SRY devido a sua função desencadeadora na diferenciação testicular (Harley *et al.*, 2003).

Além do desenvolvimento tumoral o mosaicismo com o cromossomo Y pode definir o fenótipo sexual. Os diversos mecanismos envolvidos no processo de determinação sexual masculina na presença do mosaicismo 45,X com linhagens contendo Y, ainda não estão completamente elucidados. Nessa situação podem ser esperados desde fenótipos femininos e masculinos completos ou com ambigüidade sexual (Telvi *et al.*, 1999). Aberrações do cromossomo Y favorecem a formação de mosaicismo com linhagens 45,X. A fragmentação e, em alguns casos, duplicação do material cromossômico não são incomuns nesta situação(Hsu, 1994).

A presença de seqüências do cromossomo Y e, em particular do SRY, além da variabilidade do fenótipo genital externo, implica no desenvolvimento de fenótipos gonadais diversos. Gônadas em fita, testículos disgenéticos e com formação completa podem estar presentes definindo a estruturas genitais internas e externas. (Harley *et al.*, 2003) O estudo molecular destas seqüências tem colaborado para o

entendimento de aspectos interferentes no complexo fenômeno da diferenciação sexual.

A importância do mosaicismo na expressão clínica da síndrome de Turner é cada vez mais valorizada e o estudo dos seus múltiplos aspectos colabora com a compreensão da influência dos cromossomos sexuais no desenvolvimento humano.

Referências

- Antonarakis, S. E., Avramopoulos, D., Blouin, J. L., Talbot, C. C., Jr., & Schinzel, A. A. (1993). Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age. *Nat. Genet.* 3, 146-150.
- Benn, P. (1998). Trisomy 16 and trisomy 16 Mosaicism: a review. *Am. J. Med. Genet.* 79, 121-133.
- Bronshtein, M., Zimmer, E. Z., & Blazer, S. (2003). A characteristic cluster of fetal sonographic markers that are predictive of fetal Turner syndrome in early pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188, 1016-1020.
- Bui, T. H., Iselius, L., & Lindsten, J. (1984). European collaborative study on prenatal diagnosis: mosaicism, pseudomosaicism and single abnormal cells in amniotic fluid cell cultures. *Prenat. Diagn. 4 Spec No*, 145-162.
- Canto, P., Kofman-Alfaro, S., Jimenez, A. L., Soderlund, D., Barron, C., Reyes, E., Mendez, J. P., & Zenteno, J. C. (2004). Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences. *Cancer Genet. Cytogenet.* 150, 70-72.
- Devi, A. S., Velinov, M., Kamath, M. V., Eisenfeld, L., Neu, R., Ciarleglio, L., Greenstein, R., & Benn, P. (1993). Variable clinical expression of mosaic trisomy 16 in the newborn infant. *Am. J. Med. Genet.* 47, 294-298.
- Devlin, L. & Morrison, P. J. (2004a). Accuracy of the clinical diagnosis of Down syndrome. *Ulster Med. J.* 73, 4-12.

- Devlin, L. & Morrison, P. J. (2004b). Mosaic Down's syndrome prevalence in a complete population study. *Arch. Dis. Child* 89, 1177-1178.
- Fernandez-Garcia, R., Garcia-Doval, S., Costoya, S., & Pasaro, E. (2000). Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of 'hidden' mosaicism. *Clin. Genet.* 58, 201-208.
- Fishler, K. & Koch, R. (1991). Mental development in Down syndrome mosaicism. *Am. J. Ment. Retard.* 96, 345-351.
- Fishler, K., Koch, R., & Donnell, G. N. (1976). Comparison of mental development in individuals with mosaic and trisomy 21 Down's syndrome. *Pediatrics* 58, 744-748.
- Frias, J. L. & Davenport, M. L. (2003). Health supervision for children with Turner syndrome. *Pediatrics* 111, 692-702.
- Gardner, R. J. M. & Sutherland, G. R. (1996). *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* New York: Oxford University Press.
- Goldstein, H. & Nielsen, K. G. (1988). Rates and survival of individuals with trisomy 13 and 18. Data from a 10-year period in Denmark. *Clin. Genet.* 34, 366-372.
- Gravholt, C. H., Friedrich, U., & Nielsen, J. (1991). Chromosomal mosaicism: a follow-up study of 39 unselected children found at birth. *Hum. Genet.* 88, 49-52.
- Gravholt, C. H., Juul, S., Naeraa, R. W., & Hansen, J. (1996). Prenatal and postnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study. *BMJ* 312, 16-21.

- Gravholt, C. H., Juul, S., Naeraa, R. W., & Hansen, J. (1998). Morbidity in Turner syndrome. *J. Clin. Epidemiol.* 51, 147-158.
- Gunther, D. F., Eugster, E., Zagar, A. J., Bryant, C. G., Davenport, M. L., & Quigley, C. A. (2004). Ascertainment bias in Turner syndrome: new insights from girls who were diagnosed incidentally in prenatal life. *Pediatrics* 114, 640-644.
- Haak, M. C., Bartelings, M. M., Gittenberger-De Groot, A. C., & Van Vugt, J. M. (2002). Cardiac malformations in first-trimester fetuses with increased nuchal translucency: ultrasound diagnosis and postmortem morphology. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 20, 14-21.
- Hahnemann, J. M. & Vejerslev, L. O. (1997). Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)--diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat. Diagn.* 17, 801-820.
- Hanson, L., Bryman, I., Barrenas, M. L., Janson, P. O., Wahlstrom, J., bertsson-Wikland, K., & Hanson, C. (2001). Genetic analysis of mosaicism in 53 women with Turner syndrome. *Hereditas* 134, 153-159.
- Hanson, L., Bryman, I., Janson, P. O., Jakobsen, A. M., & Hanson, C. (2002). Fluorescence in situ hybridisation analysis and ovarian histology of women with Turner syndrome presenting with Y-chromosomal material: a correlation between oral epithelial cells, lymphocytes and ovarian tissue. *Hereditas* 137, 1-6.
- Harley, V. R., Clarkson, M. J., & Argentaro, A. (2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the

Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9].
Endocr Rev. 24, 466-487.

Held, K. R., Kerber, S., Kaminsky, E., Singh, S., Goetz, P., Seemanova, E., & Goedde, H. W. (1992). Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? Hum. Genet. 88, 288-294.

Hook, E. B. (1977). Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. Am. J. Hum. Genet. 29, 94-97.

Hook, E. B. (1978). Spontaneous deaths of fetuses with chromosomal abnormalities diagnosed prenatally. N. Engl. J. Med. 299, 1036-1038.

Hook, E. B. & Warburton, D. (1983). 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. 64, 24-27.

Hsu, L. Y. (1994). Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. Am. J. Med. Genet. 53, 108-140.

Kalousek, D. K. & Dill, F. J. (1983). Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. Science 221, 665-667.

Karadima, G., Bugge, M., Nicolaidis, P., Vassilopoulos, D., Avramopoulos, D., Grigoriadou, M., Albrecht, B., Passarge, E., Anneren, G., Blennow, E., Clausen, N., Galla-Voumvouraki, A., Tsezou, A., Kitsiou-Tzeli, S., Hahnemann, J. M.,

Hertz, J. M., Houge, G., Kuklik, M., Macek, M., Lacombe, D., Miller, K., Moncla, A., Lopez, P., I, Patsalis, P. C., Petersen, M. B., & . (1998). Origin of nondisjunction in trisomy 8 and trisomy 8 mosaicism. *Eur. J. Hum. Genet.* 6, 432-438.

Lamb, N. E., Freeman, S. B., Savage-Austin, A., Pettay, D., Taft, L., Hersey, J., Gu, Y., Shen, J., Saker, D., May, K. M., Avramopoulos, D., Petersen, M. B., Hallberg, A., Mikkelsen, M., Hassold, T. J., & Sherman, S. L. (1996). Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat. Genet.* 14, 400-405.

Lipay, M. V., Bianco, B., & Verreschi, I. T. (2005). [Gonadal dysgenesis and tumors: genetic and clinical features]. *Arq Bras. Endocrinol. Metabol.* 49, 60-70.

Lippe, B. (1991). Turner syndrome. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 20, 121-152.

Mendes, J. R., Strufaldi, M. W., Delcelo, R., Moises, R. C., Vieira, J. G., Kasamatsu, T. S., Galera, M. F., Andrade, J. A., & Verreschi, I. T. (1999). Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 50, 19-26.

Moreira, A. M., San, J. A., Pereira, P. S., & de Souza, C. S. (2000). A case of mosaic trisomy 21 with Down's syndrome signs and normal intellectual development. *J. Intellect. Disabil. Res.* 44 (Pt 1), 91-96.

Nielsen, J. & Wohlert, M. (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum. Genet.* 87, 81-83.

- Pasquino, A. M., Passeri, F., Pucarelli, I., Segni, M., & Municchi, G. (1997). Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner's Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 82, 1810-1813.
- Phillips, O. P., Tharapel, A. T., Lerner, J. L., Park, V. M., Wachtel, S. S., & Shulman, L. P. (1996). Risk of fetal mosaicism when placental mosaicism is diagnosed by chorionic villus sampling. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174, 850-855.
- Pletcher, B. A., Sanz, M. M., Schlessel, J. S., Kunaporn, S., McKenna, C., Bialer, M. G., Alonso, M. L., Zaslav, A. L., Brown, W. T., & Ray, J. H. (1994). Postnatal confirmation of prenatally diagnosed trisomy 16 mosaicism in two phenotypically abnormal liveborns. *Prenat. Diagn.* 14, 933-940.
- Riccardi, V. M. (1977). Trisomy 8: an international study of 70 patients. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 13, 171-184.
- Rieger, R., Michaelis, A., & Green, M. M. (1991). *Glossary of Genetics*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Robinson, W. P., Bernasconi, F., Lau, A., & McFadden, D. E. (1999). Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment. *Am. J. Med. Genet.* 84, 34-42.
- Robinson, W. P., Binkert, F., Bernasconi, F., Lorda-Sanchez, I., Werder, E. A., & Schinzel, A. A. (1995). Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 444-451.

- Ruiz, C., Lamm, F., & Hart, P. S. (1999). Turner syndrome and multiple-marker screening. *Clin. Chem.* 45, 2259-2261.
- Saenger, P., Wikland, K. A., Conway, G. S., Davenport, M., Gravholt, C. H., Hintz, R., Hovatta, O., Hultcrantz, M., Landin-Wilhelmsen, K., Lin, A., Lippe, B., Pasquino, A. M., Ranke, M. B., Rosenfeld, R., & Silberbach, M. (2001). Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 3061-3069.
- Scully, R. E. (1970). Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 25, 1340-1356.
- Stratakis, C. A. & Rennert, O. M. (2005). Turner Syndrome: An Update. *Endocrinologist* 15, 27-36.
- Sybert, V. P. & McCauley, E. (2004). Turner's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 351, 1227-1238.
- Telvi, L., Lebbar, A., Del, P. O., Barbet, J. P., & Chaussain, J. L. (1999). 45,X/46,XY mosaicism: report of 27 cases. *Pediatrics* 104, 304-308.
- Thompson, M. W., Mcinnes, M. D., & Willard, H. F. (2002). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 6^a edition ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Tseng, L. H., Chuang, S. M., Lee, T. Y., & Ko, T. M. (1994). Recurrent Down's syndrome due to maternal ovarian trisomy 21 mosaicism. *Arch. Gynecol. Obstet.* 255, 213-216.
- Turner, H. H. (1938). A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology* 23, 566.

- Verp, M. S. & Simpson, J. L. (1987). Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 25, 191-218.
- Warburton, D., Kline, J., Stein, Z., & Susser, M. (1980). Monosomy X: a chromosomal anomaly associated with young maternal age. *Lancet* 1, 167-169.
- Yousoufian, H. & Pyeritz, R. E. (2002). Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat. Rev. Genet.* 3, 748-758.
- Zaragoza, M. V., Jacobs, P. A., James, R. S., Rogan, P., Sherman, S., & Hassold, T. (1994). Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum. Genet.* 94, 411-417.

2 - Objetivo

Avaliar um caso clínico de uma paciente feminina com baixa velocidade de crescimento, disgenesia gonadal e cariótipo inicial com mosaicismo 45,X/46,X,der(Y), por meio de técnicas de biologia molecular, de modo a esclarecer o cariótipo e sua influência na apresentação fenotípica. Por meio dessa avaliação, fornecer dados para uma melhor compreensão de mecanismos interferentes na determinação sexual.

3 – Artigo (aceito para publicação no American Journal of Medical Genetics)

Determination of the Sexual Phenotype in a Child with 45,X/46,X,Idic(Yp)

Mosaicism: Importance of the Relative Proportion of the 45,X Line in Gonadal Tissue

Alexis D. Guedes¹, Bianca Bianco¹, Mônica V.N. Lipay², Décio Brunoni², Maria de Lourdes Chauffaille^{3,4}, Ieda TN Verreschi¹.

¹*Discipline of Endocrinology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.*

²*Discipline of Genetics, Department of Morphology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.*

³*Discipline of Hematology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.*

⁴*Fleury – Center for Diagnostic Medicine, São Paulo, Brazil.*

45,X/46,X,Idic(Yp) Mosaicism in Gonads

Correspondence to: Ieda TN Verreschi, Edifício Horácio Kneese de Melo,

Rua Pedro de Toledo, 781 / 13º and. – 04039-032 São Paulo, SP - Brazil

Tel.: (55 -11) 5574.6502

ieda@endocrino.epm.br

ABSTRACT

We report here on a girl who, despite her 45,X/46,X,der(Y) karyotype, showed no signs of virilization or physical signs of the Ullrich-Turner syndrome [UTS], except for a reduced growth rate. After prophylactic gonadectomy due to the risk of developing gonadoblastoma, the gonads and peripheral blood samples were analyzed by fluorescence *in situ* hybridization [FISH] and polymerase chain reaction [PCR] to detect Y-specific sequences. These analyses allowed us to characterize the Y-derived chromosome as being an isodicentric Yp chromosome [idic(Yp)] and showed a pronounced difference in the distribution of the 45,X/46,X,idic(Yp) mosaicism between the two analyzed tissues. It was shown that, although in peripheral blood almost all cells (97.5%) belonged to the idic(Yp) line with a duplicated *SRY* gene, this did not determine any degree of male sexual differentiation in the patient, as in the gonads the predominant cell line was 45,X (60%).

KEY WORDS: mosaicism; sex differentiation; isochromosomes; Y chromosome; fluorescence *in situ* hybridization; polymerase chain reaction; Ullrich-Turner syndrome.

INTRODUCTION

Until 7-8 weeks of gestation, the genitalia of an embryo are undifferentiated and have the potential of developing towards either sex. Localized expression of the gene *SRY* (Yp11.3) in the primordial gonadal tissue determines male differentiation with the formation of testes. Inactivating mutations in the sequence of this gene prevent the formation of the male gonad, leading to a female phenotype, as in 46,XY pure gonadal dysgenesis [Pontiggia et al., 1994; Poulat et al., 1994; Veitia et al., 1997].

Absence in the karyotype of a second sex chromosome, whether X or Y, determines the female phenotype in UTS. Yet, the loss of the Y chromosome, and consequently of the *SRY* gene, only in part of an individual's cells, forming a 45,X/46,XY mosaic karyotype, can influence the shaping of the phenotype in a less predictable manner, to such an extent that cases with UTS, sexual ambiguity and complete male development have been described [Telvi et al., 1999].

Dicentric chromosomes are the most frequent structural abnormalities of the human Y chromosome [Davis, 1981], giving rise to a variety of anomalies in sex determination and fertility. Because of its mitotic instability, this structural abnormality of the Y chromosome almost always results in mosaicism with a 45,X cell line. In 45,X/46,X,idic(Y) patients, besides the mosaicism, the loss of Y chromosome genetic material during the formation of the dicentric chromosome may involve loci which are critical for sex determination, thus influencing the phenotype formation [Kelly et al., 1998]. In the presence of an idic(Yp) cell line in 45,X/46,X,idic(Yp) mosaicism, a great variety of sex phenotypes is observed. In a classical survey, 80 patients were described, whose phenotypes ranged from male (26%) to ambiguous (21%) and female (54%) [Hsu, 1994]. The reason for such a diversity is not completely clear.

The relative importance of the presence or absence in the idic(Y) chromosome of certain genes, particularly *SRY*, and of the proportion of 45,X cells distributed over the different tissues, mainly in the gonads, has been discussed for at least two decades [Daniel, 1985; Morava et al., 2000; Teraoka et al., 1998]. Careful evaluation of such cases has contributed to a better understanding of the sex determination process.

We report here on a child with gonadal dysgenesis and short stature, without UTS manifestations or virilization, in whom a great difference in the proportion of the 45,X/46,X,idic(Yp) mosaic cell lines was found in peripheral blood lymphocytes and in gonadal fibroblasts, investigated by FISH and PCR amplification of specific Y-chromosome gene sequences.

MATERIALS AND METHODS

Clinical report

A 4-year-old girl was referred for shortness of stature; her karyotype in peripheral blood cells was 45,X/46,X,der(Y).

She was the only child of a nonconsanguineous couple, born at term by Caesarian section, weighing 2,392 g and measuring 45 cm. Her psychomotor development was compatible with her age, but her weight-height development was insufficient. Upon admission, her height was 92.5 cm (-2.01 SD) and her weight 12.5 kg (-2.51 SD). Physical examination showed absence of UTS findings, normal female genitalia, no clitoromegaly, Tanner stage M1 P1 (compatible with her age). At that moment, her bone age was one year delayed with regard to her chronological age.

A pelvic ultrasound evaluation showed a normal infantile uterus without evidence of ovaries, confirmed by a magnetic resonance genitogram.

Prophylactic gonadectomy was offered in view of the possibility of developing gonadoblastoma, and bilateral streak gonads were found. The patient was referred for treatment with growth hormone, as she showed insufficient stature gain (2 cm) at a one-year follow-up.

Cytogenetic study and FISH

Cytogenetic analysis using G-banding was performed on metaphase chromosomes obtained from 200 peripheral blood lymphocytes and from 50 gonadal fibroblasts. FISH analysis was carried out, using Yp telomere probes, *SRY* (Vysis Inc), and AneuVysion (X/ Y/ 18)(Vysis Inc), in order to detect alpha-satellite sequences in the centromeric regions of chromosomes X,Y, and 18, as described previously [Chauffaille et al., 2000].

PCR amplification of Y-chromosome specific sequences

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes of the patient by saline precipitation, according to the method of Lahiri & Nurnberger [1991]. Six different sets of oligonucleotides were used for amplification by PCR (Table I). *SRY* and *DYZ3* were used to confirm the presence of the Y-chromosome short arm and centromeric region, respectively. Primers *DYS218*, *DYF49S1*, *RBM* and *DYZ1* were used to detail the breakpoint of *idic(Yp)* in the Yq region (Table 1). Primers and conditions for the PCR amplification were described previously [Mendes et al., 1999]. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and counterstained with ethidium bromide.

DNA sequencing

In order to rule out the occurrence of mutations, the *SRY* amplification product was directly sequenced, using a GFX PCR DNA purification kit (Amersham Biosciences).

Informed consent was obtained from the patient's parents to participate in this study, and the work was approved by the local ethics committee.

RESULTS

Karyotype analysis of the lymphocytes by G banding confirmed the presence of a Y-derived chromosome, and its characterization by FISH led to the detection of a duplication of the hybridization signal of both the centromere and the *SRY* gene, defining the marker chromosome of the mosaic cell line as *idic(Yp)* (Fig. 1). The ratio between the two mosaic cell lines in this tissue was 45,X[5]/46,X,*idic(Yp)*[195], i. e., only 2.5% of the analyzed cells had the 45,X karyotype. In the gonadal fibroblasts, the G-band and FISH study of the metaphases disclosed the same karyotype, but with a different proportion between the cell lines: 45,X[30]/46,X,*idic(Yp)*[20].

PCR amplification of Y-specific sequences confirmed the presence of the studied genes, except for *DYZ1*, located at Yq12, a predominantly heterochromatic region, which determined the final karyotype 45,X/46,X,*idic(Y)(q11.22)* (Fig. 2).

Sequencing of the conserved domain of the *SRY* gene (HMG box), performed on both sense and antisense strands, showed no point mutations.

DISCUSSION

The combination of cytogenetic and molecular techniques to study sex chromosome abnormalities is an important tool for the evaluation of structural alterations [Cervantes et al., 2001]. In the present study, FISH evaluation allowed identification of two centromeric regions and also a duplication of the *SRY* gene in the Y-derived chromosome, characterizing it as an isodicentric Yp. PCR using specific oligonucleotides for Y-chromosome sequences made it possible to identify the most likely chromosome break region, once the entire chromosome – except for

the distal loci of the long arm, besides Yq11.22 –was duplicated, including the gene *SRY*. Sequencing of the latter confirmed its integrity.

The issue concerning the variability of sexual phenotypes due to mosaicism with the presence of Y-chromosome anomalies remains obscure. The evaluation by Alvarez-Nava et al. [2003] of three phenotypically distinct 45,X/46X,idic(Yp) cases provided evidence for the understanding of the relative importance of tissue mosaicism in sex determination. Karyotype studies of blood lymphocytes and gonadal fibroblasts demonstrated the preponderance of the idic(Yp) cell line in both gonads of a male infertile patient, in the testis of a patient with mixed gonadal dysgenesis and in the blood of both patients. In the streak gonad of the patient with mixed gonadal dysgenesis, in both gonads and in the peripheral blood of a patient with UTS, the predominant cell line was 45,X. These cases illustrate the importance of the cell line with a predominant percentage in sex determination and, in the mixed gonadal dysgenesis case in particular, the discordance between the predominant cell lines in the mosaicism found in blood and in the streak gonad suggests that this characteristic is even more important in the gonad.

Absence of virilization in spite of *SRY* duplication in most peripheral blood lymphocytes was been demonstrated previously [Godoy et al., 2000; Morava et al., 2000]. Significant proportions of the 46,X,idic(Yp) cell line over the 45,X cell line were demonstrated by Morava et al. [2000] who found 70%, by Godoy et al. [2000] who found 80%, and in this study where the proportion was 97.5%. In our case, the indication for gonadectomy to prevent gonadoblastoma from developing in dysgenetic gonads with Y material [Mendes et al., 1999; Verp et al., 1987] made it possible to compare the relationship between the mosaic cell lines in gonads and in the peripheral blood. As the gonads are the primary action site of the *SRY* gene,

triggering testicular differentiation [Harley et al., 2003], a predominant proportion of 45,X cells at this site will compromise male differentiation. As in the second case described by Mizota et al. [2003], in which the gonadal karyotype was evaluated, a preponderant proportion of 45,X cells (60%) was found in this tissue.

We think that the evidence reported here, along with previous observations, suggests that, in the presence of an undamaged *SRY* gene, the relative distribution of the 45,X cell line in the gonads is the mainly responsible for the determination of the sexual phenotype in 45,X/46,X,idic(Yp) patients.

References

Alvarez-Nava F, Soto M, Martinez MC, Prieto M, Alvarez Z. 2003. FISH and PCR analyses in three patients with 45,X/46,X,idic(Y) karyotype: clinical and pathologic spectrum. *Ann Genet* 46:443-448.

Cervantes A, Guevara-Yanez R, Lopez M, Monroy N, Aguinaga M, Valdez H, Sierra C, Canun S, Guizar J, Navarrete C, Zafra G, Salamanca F, Kofman-Alfaro S. 2001. PCR-PRINS-FISH analysis of structurally abnormal sex chromosomes in eight patients with Turner phenotype. *Clin Genet* 60:385-392.

Chauffaille ML, Marques EA, Oliveira JS, Rodrigues MM, Figueiredo MS, Romeo M, Yamamoto M, Kerbauy J. 2000. Detection of trisomy 12 by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in chronic lymphocytic leukemia. *Genet Mol Biol* 23:531-533.

- Daniel, A. 1985. Y isochromosomes and rings. Sandberg AA, editor. The Y chromosome, part B: clinical aspects of Y chromosome abnormalities. New York: Alan R Liss, Inc. p 105-135.
- Davis RM. 1981. Localization of male determining factors in man: a thorough review of structural anomalies of the Y chromosome. J Med Genet 18:161-195.
- Godoy AJ, Hackel C, Marques-De-Faria AP, Palandi de MM. 2000. Molecular mapping of an idic(Yp) chromosome in an Ullrich-Turner patient. Am J Med Genet 91:95-98.
- Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. 2003. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, *SRY* (sex-determining region on the Y chromosome) and *SOX9* [*SRY*-related high-mobility group (HMG) box 9]. Endocr Rev 24:466-487.
- Hsu LY. 1994. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. Am J Med Genet 53:108-140.
- Kelly TE, Franko JB, Rogol A, Golden WL. 1998. Discordant phenotypes and 45,X/46,X,idic(Y). J Med Genet 35:862-864.
- Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res 19:5444.
- Mendes JR, Strufaldi MW, Delcelo R, Moises RC, Vieira JG, Kasamatsu TS, Galera MF, Andrade JA, Verreschi IT. 1999. Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism. Clin Endocrinol (Oxf) 50:19-26.
- Mizota M, Morita S, Tamada I, Otsubo K, Arima S. 2003. Phenotypic difference between two cases with 45, X/46, X, idic (Y). Clin Pediatr Endocrinol 12:1-5.

- Morava E, Hermann R, Czako M, Soltesz G, Kosztolanyi G. 2000. Isodicentric Y chromosome in an Ullrich-Turner patient without virilization. *Am J Med Genet* 91:99-101.
- Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. 1994. Sex-reversing mutations affect the architecture of *SRY*-DNA complexes. *EMBO J* 13:6115-6124.
- Poulat F, Soullier S, Goze C, Heitz F, Calas B, Berta P. 1994. Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene *SRY*. *Hum Mutat* 3:200-204.
- Telvi L, Lebbar A, Del PO, Barbet JP, Chaussain JL. 1999. 45,X/46,XY mosaicism: report of 27 cases. *Pediatrics* 104:304-308.
- Teraoka M, Narahara K, Yokoyama Y, Tsuji K, Kikkawa K, Ito S, Koyama K, Seino Y. 1998. 45,X/46,X,idic(Yq) mosaicism: clinical, cytogenetic, and molecular studies in four individuals. *Am J Med Genet* 78:424-428.
- Veitia R, Ion A, Barboux S, Jobling MA, Souleyreau N, Ennis K, Ostrer H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellous M, McElreavey K. 1997. Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet* 99:648-652.
- Verp MS, Simpson JL. 1987. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 25:191-218.

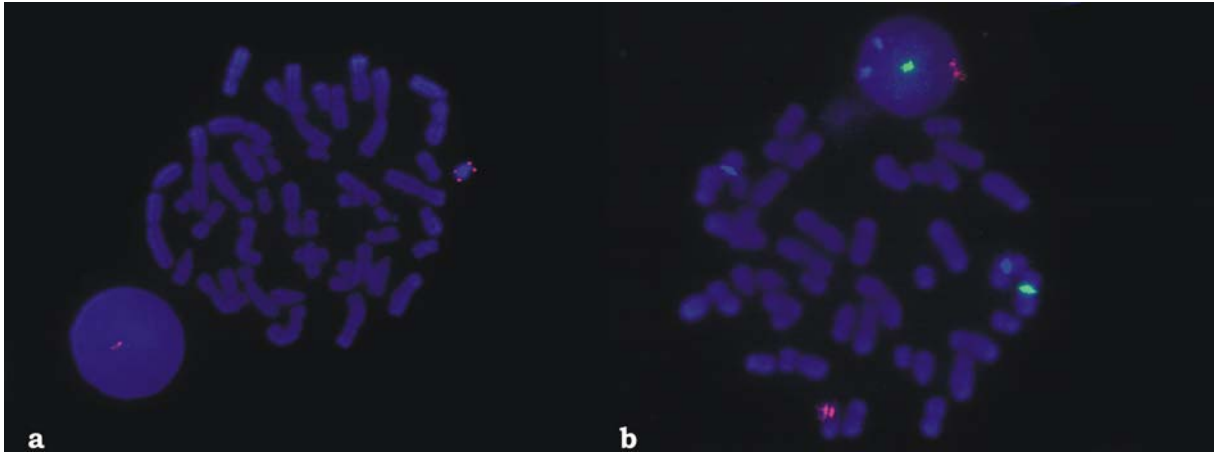


Fig. 1. FISH analysis of peripheral lymphocytes showing *SRY* probe duplication in red (a), X centromere in green (b), Y centromere in red (b), chromosome 18 centromere in blue (b).

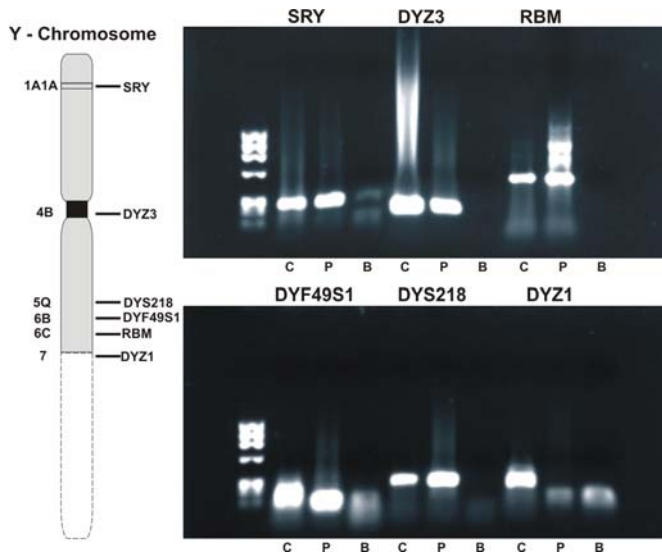


Fig. 2. PCR amplification products of Y-chromosome sequences. C: positive control; P: patient; B: blank (negative control).

Table 1. Primer pairs used for amplifying Y-chromosome regions.

Y interval	Primers	Oligonucleotídeos	PCR bp
1	SRY	5'-TGCAAGAGAATATTCCTCCGCTCTCC; 5'-CAACCTGTTGTCCAGTTGCACTTC	428
4B	DYZ3	5'-TGAAAACACTACACAGAAGCTG; 5'-ACACATCACAAAGAAGCTATG	170
5Q	DYS218	5'-GGCTCACAAACGAAAAGAAA; 5'-CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	274
6B	DYF49S1	5'-CAGATGAAGCACTGGAAGCTG; 5'-AGGGCCTGAGTCTCCAGG	170
6C	RBM	5'-CTCGGATGTCTTATGGTGGAA; 5'-GCATCAACAAGTATGAAATTACT	474
7	DYZ1	5'-TACGGGTCTCGAATGGAATA; 5'-TCATTGCATTCTTTCCATT	236

5- Conclusão

A presença de uma linhagem celular predominante 45,X em mosaicismo no tecido gonadal com uma linhagem 46,X,idi(Yp) pode interferir com o processo de diferenciação sexual masculina até mesmo na presença do gene SRY duplicado e íntegro, contribuindo para a formação de um fenótipo feminino completo com disgenesia gonadal.

5 - Anexos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Cromossomo Isodicêntrico de Y e fenótipo de baixa estatura com disgenesia gonadal: Estudo de caso com abordagem molecular.

Este é um estudo individual elaborado para a sua filha. Como é do seu conhecimento, ela apresenta alteração em um dos cromossomos sexuais, possivelmente relacionados com aspectos do seu desenvolvimento que motivaram a sua consulta inicial. Neste momento, as condutas médicas urgentes e pertinentes para o caso dela já foram tomadas.

O esclarecimento de tais alterações cromossômicas por métodos laboratoriais especializados (técnicas moleculares) possibilitará a melhor compreensão dos mecanismos determinantes do desenvolvimento gonadal e crescimento apresentado por ela. Para este estudo será necessária a coleta de amostra de sangue periférico. Este procedimento será realizado através de punção em veia do braço utilizando material estéril e descartável e será colhido um volume de 10 ml.

Está garantido o anonimato no estudo, e a sua não concordância em participar desta investigação ou a desistência durante o seu curso não trará prejuízo ao tratamento nesta instituição.

Não haverá despesas pessoais e nem compensação financeira pela participação.

Como investigadores responsáveis pelo estudo, o médico Alexis Dourado Guedes e a Prof. Dra. Ieda Verreschi da Disciplina de Endocrinologia, estão a disposição para esclarecimento de dúvidas ou intercorrências que surgirem a qualquer momento no Laboratório de Esteróides da Disciplina de Endocrinologia –

Departamento de Medicina da UNIFESP situado na Rua Pedro de Toledo, 781, 13º andar, telefone (11)5574-6502.

O projeto foi submetido a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP e, portanto, se surgirem dúvidas ou considerações sobre a ética da pesquisa, entrem em contato com este Comitê na Rua Botucatu, 572, 1º andar, cj 14 – telefone: 5571-1062, FAX: 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido/a sobre as informações que li a respeito do estudo: Cromossomo Isodicêntrico de Y e fenótipo de baixa estatura com disgenesia gonadal: Estudo de caso com abordagem molecular.

Declaro que discuti com os investigadores citados neste documento a decisão de permitir a participação de minha filha neste estudo. Está claro o propósito do estudo, o procedimento a ser realizado, seu desconforto, risco e também a garantia de confidencialidade e esclarecimentos permanentes. Compreendo também que a participação de nossa filha é isenta de despesas e que teremos garantia de acesso ao tratamento ambulatorial e hospitalar no Hospital São Paulo, UNIFESP/EPM, quando necessário.

Concordo voluntariamente com a participação de minha filha neste estudo e estou ciente que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que posso ter adquirido.

Assinatura do representante legal

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo



São Paulo, 6 de agosto de 2004.
CEP 0852/04

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ALEXIS DOURADO GUEDES
Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Cromossomos isodicêntrico de Y e fenótipo feminino com baixa estatura e disgenesia gonadal: estudo de caso com abordagem molecular**".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **02/fevereiro/2005**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **01/agosto/2005**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."