

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

THEREZA TAYLANNE SOUZA LOUREIRO CAVALCANTI

**MOSAICISMO 45,X/46,XY: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, CITOGENÉTICAS E  
MOLECULARES DE PACIENTES**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2020



THEREZA TAYLANNE SOUZA LOUREIRO CAVALCANTI

**Mosaicismo 45,X/46,XY: características clínicas, citogenéticas e moleculares de  
pacientes**

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como requisito para obtenção do título do Mestre em Genética.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

**Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ester Silveira Ramos**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2020

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Cavalcanti, Thereza Taylanne Souza Loureiro  
Mosaicismo 45,X/46,XY: características clínicas, citogenéticas e moleculares de pacientes / São Paulo, 2020.

97 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Ester Silveira Ramos.

1. Alterações dos Cromossomos Sexuais. 2. Disgenesia Gonadal. 3. *TSPY*. 4. *SRY*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Thereza Taylanne Souza Loureiro Cavalcanti

Título: Mosaicismo 45,X/46,XY: características clínicas, citogenéticas e moleculares de pacientes

Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre, pelo curso de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Aprovado em: \_\_\_\_\_|\_\_\_\_\_|\_\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

A Deus,  
energia suprema que rege o Universo e tudo que nele há,  
que me concedeu a dádiva da vida:  
que seja luz para nossos passos.

A quem sonha, a quem planeja, a quem executa:  
Dedico a quem se importa em tornar o mundo melhor  
Às generosas pessoas que nos trouxeram até aqui  
E que nos impulsionam a prosseguir.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, CAPES, CNPq e ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pelo fomento à pesquisa e estrutura; sobretudo aos pacientes, sem os quais este projeto não existiria.

A Ester Ramos, querida orientadora, não tenho palavras para agradecer pela empatia, pela oportunidade e pelos ensinamentos: enorme gratidão!

A Sonir Antonini, Celso Mendes Júnior e Luciana Castelli, pela colaboração para o aprimoramento deste projeto.

A Victor Ferraz, docente, supervisor e amigo, pela paciência, pelo compromisso com o ensino, pela humildade que inspira: fundamentais! Aos docentes Lúcia Martelli e João Pina, médicos geneticistas Lisandra Mesquita, Jair Huber, Clarissa Picanço, Charles Marques e Carlos Henrique; aos residentes e ex-residentes que participaram desse processo; a Márcia, Fátima, Milena, Lucimar, Sarah, Rinaldo e demais. Gratidão por toda a ajuda.

A Susie e aos colegas pós-graduandos (Tatiana Mozer, Reginaldo Alves, Thalita Targino, Vanessa Ribeiro, Thiago Vidotto, Juliana Oliveira, Adriana Araújo, Lorena Teixeira e Perla Pizzi), por me estimularem a tentar e esclarecerem minhas dúvidas.

Agradeço especialmente a Reginaldo Vila (Regis), Anaíde Sousa, Jorge Petrolí e Carolina Verruma, aos que transformam o bloco C em minha segunda casa, que me acolheram, levaram-me a persistir, convenceram-me do êxito iminente e o tornaram possível.

À minha família, tios e primos, aos que estiveram presentes na minha ausência, como sou grata! Sobretudo a meus pais, Antônio e Maria do Socorro, pelo lar amoroso e pelo apoio incondicional; ao avô Francisco Cavalcanti (*in memoriam*) por me ensinar sobre dedicação e integridade; à avó Geralda (*in memoriam*) por me ensinar a valorizar as pessoas e a natureza; ao avô Francisco Miguel (*in memoriam*), por me ensinar a viver poesia; e à avó Maria Liosa, por me ensinar que firmeza, autenticidade e bom-humor coexistem.

A Rayana Maia, a dupla de sempre, de residência, do trabalho, do estudo e do lazer. A Paula Trovão, Aimeé Acioli, Raisal Cavalcanti, Michael Sweeney, Fabiana Neves, Cícero Faustino, Ramon Guerra e outros amigos, espalhados pelo Brasil e pelo mundo: a distância e o tempo só fortalecem e amadurecem nossa amizade.

A RafaelCardoso, pelo carinho e apoio diários, por caminhar ao meu lado e por segurar minha mão, na saúde e na doença, na alegria e na tristeza, enquanto sobrarmos um para o outro.

A todos que torceram pelo sucesso e estiveram direta ou indiretamente nesta jornada: o caminho é mais importante do que o próprio destino.

*“We pierce doors and windows to make a house; but it is on the spaces where there is nothing that the usefulness of the house depends. Therefore, just as we take advantage of what is, so we should recognize the usefulness of what is not.”*

*“To be soft and supple is the way of life.”*

(Lao-Tze)

## RESUMO

CAVALCANTI, T. T. S. L. **Mosaicismo 45,X/46,XY: características clínicas, citogenéticas e moleculares de pacientes.** 2020. 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo - Brasil.

O mosaicismo 45,X/46,XY e suas variantes são alterações cromossômicas do desenvolvimento sexual raras, com incidência estimada de 1,7/10.000 gestações. Representam a segunda maior causa de anomalias genitais, em um espectro que vai do completamente virilizado à genitália feminina, com gônadas histologicamente discordantes ou disgenéticas e estigmas da síndrome de Turner. Não estão bem estabelecidos os fatores determinantes para a perda parcial dos cromossomos sexuais. O objetivo deste estudo foi comparar o cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY* de 95 homens, com o de pessoas com mosaicismo 45,X/46,XY; e correlacionar características clínicas destes indivíduos mosaico ao percentual de células da linhagem 45,X detectado em cariótipo de sangue, ao percentual relativo de células com o gene *SRY* e ao número de cópias do gene *TSPY*. Realizou-se um estudo analítico transversal, a partir de dados de homens residentes na região (Cruz (2018)); e de prontuário hospitalar de 34 pacientes diagnosticados com mosaicismo 45,X/46,XY, atendidos entre os anos de 1973 e 2019 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, bem como de amostras de DNA extraídas do sangue de 21 destes. Os dados foram analisados por estatística descritiva e inferencial ( $p < 0,05$ ). As amostras foram testadas preliminarmente para presença dos genes *DAZ*, *SRY* e *TSPY*, e seus respectivos controles endógenos, por PCR convencional. A análise relativa do número de cópias do gene-alvo de múltiplas cópias (*TSPY*), do gene de cópia única (*SRY*), e do gene de dupla cópia autossômica (*GAPDH*) foi realizada em triplicata, por PCR quantitativa, utilizando Power SYBR® Green PCR Master Mix. A idade dos pacientes ao diagnóstico citogenético se relacionou fortemente à idade do estudo molecular. Registrou-se baixo peso ao nascer em 25% destes. A estatura final mediana foi abaixo do percentil 3 da população brasileira, inclusive quando avaliados separadamente por sexo de criação. Foram relatadas cardiopatias em 31,5% dos pacientes; e anomalias renais, em 21% destes. Metade dos pacientes foi submetida à análise histológica gonadal, 82,4% por gonadectomia, e 17,6% por biópsia gonadal; em 14,3% destes se detectou gonadoblastoma, um dos quais com seminoma coexistente. A idade mediana da gonadectomia foi de 13 anos; 16 anos para o fenótipo Turner; e 2 anos para os pacientes com subvirilização da genitália. Pacientes com fenótipo genital externo mais virilizado (score de masculinização externa, EMS > 7) não foram submetidos à gonadectomia, apenas a seguimento clínico. Os achados histológicos gonadais foram os seguintes, isolados ou combinados: gônada disgenética, estroma ovário-like sem foliculos ovarianos, aplasia de células germinativas (Sertoli-only), testículo disgenético e testículo diferenciado. A categoria do EMS se relacionou fortemente com a dos órgãos genitais internos ( $p < 0,01$ ), e com o sexo de criação ( $p < 0,01$ ); e moderadamente com a realização de gonadectomia ( $p < 0,01$ ). A idade mediana à coleta do cariótipo foi de 24 anos, entre os que não foram gonadectomizados; e de 9 anos, entre os que foram; neste grupo, ambas as idades se relacionaram fortemente ( $p < 0,01$ ). O percentual de células da linhagem 45,X se relacionou positivamente com o fenótipo Turner ( $p = 0,02$ ). A idade média à coleta do DNA dos pacientes foi semelhante à do grupo controle. O grupo de pacientes apresentou percentual relativo de *SRY* estatisticamente menor que o do grupo controle ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença entre o  $nTSPY$  de ambos os grupos ( $p = 0,99$ ). Entre os pacientes, o %*SRY* se relacionou fortemente à proporção de células da linhagem 45,X ( $p = 0,78$ ;  $p < 0,01$ ). Não houve relação significativa entre o %*SRY* com o  $nTSPY$  nem com outras variáveis estudadas. A demonstração da relação entre %*SRY* e o percentual de células da

linhagem 45,X é inédita. O estudo do *SRY* por PCR quantitativo poderia ser considerado como complemento ao estudo citogenético.

**Palavras-chave:** 1. Alterações dos Cromossomos Sexuais. 2. Disgenesia Gonadal. 3. *TSPY*. 4. *SRY*.

## ABSTRACT

CAVALCANTI, T. T. S. L. **45,X/46,XY Mosaicism: clinical, cytogenetic and molecular features of patients.** 2020. 97 s. Dissertation (Master's degree in Genetics), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo - Brazil.

45,X/46,XY Mosaics and their variants are chromosomal changes in sexual development with an estimated incidence of 1.7/10,000 pregnancies. Although rare, they represent the second leading cause of genital anomalies, on a spectrum ranging from completely virilized to female genitalia, with histologically discordant or dysgenetic gonads and stigmas of Turner syndrome. The determining factors for the partial loss of sex chromosomes are not well established. The aim of this study was to compare the relative number of copies of the *TSPY* gene of local men with that of people with 45,X/46,XY Mosaicism; and to correlate clinical features of these mosaic individuals to the percentage of cells of 45,X lineage detected in a blood karyotype, to the relative percentage of cells with the *SRY* gene and to the number of copies of the *TSPY* gene. A cross-sectional analytical study was carried out using data from 95 men (Cruz, 2018); and data from hospital records of 34 patients diagnosed with 45,X/46,XY Mosaicism, seen between 1973 and 2019 at the Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School - USP, as well as DNA samples extracted from the blood of 21 of them. The data were analyzed using descriptive and inferential statistics ( $p < 0.05$ ). The samples were preliminarily tested for the presence of the *DAZ*, *SRY* and *TSPY* genes, and their respective endogenous controls, by conventional PCR. The relative analysis of the number of copies of the multiple-copy target gene (*TSPY*), of the single-copy gene (*SRY*), and of the autosomal double-copy gene (*GAPDH*) was performed in triplicate, by quantitative PCR using Power SYBR® Green PCR Master Mix. The age of the patients at the cytogenetic diagnosis was strongly related to the age of the molecular study. Low weight was registered in 25% of the participants. The median final height was below 3rd percentile for the Brazilian population, even when assessed separately by sex of creation. Cardiac abnormalities were reported in 31.5% of patients; and renal anomalies, in 21% of them. Half of the patients underwent gonadal histological analysis, 82.4% by gonadectomy, and 17.6% by gonadal biopsy; in 14.3% of them, gonadoblastoma was detected, one of which had a coexisting seminoma. The median age of gonadectomy was 13 years; 16 years for the Turner phenotype; and 2 years for patients with subvirilization of the genitalia. Patients with more virilized external genital phenotype ( $EMS > 7$ ) were not submitted to gonadectomy. The gonadal histological findings were varied, including combinations: dysgenetic gonad, ovarian-like stroma without ovarian follicles, germ cell aplasia (Sertoli-only), dysgenetic testis and differentiated testis. The EMS category was strongly related to the internal genital organs ( $p < 0.01$ ), and to the sex of creation ( $p < 0.01$ ); and moderately with gonadectomy ( $p < 0.01$ ). The median age at the collection of the karyotype was 24 years old, among those who were not gonadectomized; and 9 years old, among those who went; in this group, both ages were strongly related ( $p < 0.01$ ). The percentage of cells of the 45,X lineage was positively related to the Turner phenotype ( $p = 0.02$ ). The mean age at which the patients' DNA was collected was similar to that of the control group. The group of patients presented a relative percentage of *SRY* statistically lower than these men ( $p < 0.01$ ). There was no difference between the *nTSPY* of both groups ( $p = 0.99$ ). Among the patients, the %*SRY* was strongly related to the proportion of cells from the 45,X line ( $p = 0.78$ ;  $p < 0.01$ ). There was no significant relationship between %*SRY* with *nTSPY* or with other variables studied. The relationship between %*SRY* and the 45,X cell lineage is unprecedented. The *SRY* study by quantitative PCR could be considered as a complement to the cytogenetic study.

**Keywords:** 1. Sex Chromosome Abnormalities. 2. Gonadal Dysgenesis. 3. *TSPY*. 4. *SRY*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Ideograma do cromossomo humano Y com destaque para os genes *SRY*, *TSPY* e *DAZ*, regiões AZF e região “específica do macho” (MSY).....20
- Figura 2 – Modelo de alça de feedback positivo entre o TSPY e o AR, na regulação de genes. A expressão do gene *TSPY* é regulada por ações de AR em seu promotor (esquerda, superior). A proteína TSPY sintetizada, por sua vez, interage com a AR (variantes da AR) e exacerba a transativação global dos genes-alvo (esquerda, inferior), incluindo sua própria expressão (esquerda, superior), estabelecendo assim uma alça de feedback positivo no sexo masculino. TSPX, por outro lado, inibe a transativação da variante AR/AR do TSPY e sua regulação global de genes. Os receptores de hormônios sexuais masculinos e o TSPY promovem sinergicamente a proliferação celular, enquanto o TSPX, como supressor tumoral, neutraliza essas ações oncogênicas (à direita). .....22
- Figura 3 – O desenvolvimento das estruturas genitais. A presença do gene *SRY* no cromossomo Y desencadeia o desenvolvimento de testículos, que secretam testosterona e hormônio anti-Mülleriano (AMH), levando ao desenvolvimento das estruturas genitais masculinas típicas. ....23
- Figura 4 – Distribuição geográfica da cidade de procedência do grupo de pacientes 45,X/46,XY atendidos por centro hospitalar de referência em Distúrbios do Desenvolvimento Sexual em Ribeirão Preto, Brasil.....47
- Figura 5 – Diagrama de caixas com a distribuição da estatura final dos pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY, segundo sexo social. Destaque para a estatura média das pacientes com síndrome de Turner (142 cm)<sup>1</sup>, e da população brasileira (167 cm)<sup>2</sup>. A área rosada delimita os pacientes com baixa estatura; e a área em verde claro discrimina os que estão dentro da normalidade para o sexo social, ambos discriminados por sexo social. A diferença entre média das idades dos pacientes agrupados por sexo de criação foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ , teste-t para igualdade de médias; teste de Levene para variâncias). Dos 22 pacientes cuja estatura final foi registrada, 60% receberam tratamento com rec-hGH.....49
- Figura 6 – Correlação entre a idade à coleta do cariótipo em função da idade à gonadectomia, segundo o fenótipo genital ambíguo ou feminino ( $\rho = 0,99$ ,  $p < 0,01$ ). .....53
- Figura 7 – Distribuição da idade à gonadectomia de indivíduos 45,X/46,XY, e à coleta do cariótipo destes, em função da virilização da genitália externa (respectivamente,  $p = 0,04$ ; e  $p' = 0,02$ , teste Mann-Whitney). Ambas as idades se relacionaram positivamente com o fenótipo genital ( $\rho = 0,69$ ,  $p = 0,03$ ; e  $\rho' = 0,66$ ,  $p' = 0,04$ ; correlação de Spearman, teste exato de Fisher). .....54

- Figura 8 – Distribuição do percentual do gene *SRY* por célula em relação ao cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY* de pacientes 45,X/46,XY e do grupo controle ( $p=0,38$ ). Valores calculados em relação ao gene de referência *GAPDH*. ..... 59
- Figura 9 – Correlação entre a razão de células de linhagem celular 46,XY e suas variantes, em relação à razão calculada da presença do gene *SRY* ( $\rho$  0,78;  $p<0,01$ ). Em verde, destaque para pacientes que apresentaram mais de 50% das células da linhagem 45,X; e, em azul, os que apresentaram até 50% dessa linhagem, ao estudo citogenético de sangue periférico..... 60
- Figura 10 – Distribuição de pacientes 45,X/46,XY e de grupo masculino controle, em função da faixa etária à coleta do DNA (nível de significância  $p=0,04$ , teste Mann-Whitney). ..... 78
- Figura 11 – Distribuição das idades à coleta do DNA de pacientes 45,X/46,XY ( $n=25$ ) e de grupo masculino controle ( $n=95$ ). Nível de significância  $p=0,04$ , teste Mann-Whitney..... 78
- Figura 12 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Reação de PCR multiplex para sequências do gene *TSPY* (176 pb); e do gene de referência, *GAPDH* (104 pb). M: marcador de peso molecular 100 pb Invitrogen®; C+1, C+2 e C-: respectivamente, controles positivos e negativo obtidos a partir de amostras de homens e de mulher da população de Ribeirão Preto; algarismos romanos: amostras de pacientes; B: branco (água ultrapura)..... 79
- Figura 13 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Reação de PCR multiplex para sequências do gene *SRY* (174 pb); e do gene de referência, *HBE* (619 pb). M: marcador de peso molecular 100pb Invitrogen®; C+1, C+2 e C-: respectivamente, controles positivos e negativo obtidos a partir de amostras de homens e de mulher da população de Ribeirão Preto; algarismos romanos: amostras de pacientes; B: branco (água ultrapura). ..... 80
- Figura 14 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Reação de PCR multiplex para sequências do gene *DAZ* (210 pb); e do gene de referência, *HBE* (619 pb). M: marcador de peso molecular 100pb Invitrogen®; C+1, C+2 e C-: respectivamente, controles positivos e negativo obtidos a partir de amostras de homens e de mulher da população de Ribeirão Preto; algarismos romanos: amostras de pacientes; B: branco (água ultrapura). ..... 81
- Figura 15 – Gráfico de amplificação dos genes *GAPDH*, *SRY* e *TSPY*, obtida pela técnica de qPCR – paciente XIII. No gráfico, as curvas verdes correspondem à amplificação do gene *TSPY*; as curvas magenta, centrais, correspondem à amplificação do gene autossômico de referência, *GAPDH*; e as curvas azuis, à direita, ao gene de cópia única *SRY*. A linha lilás abaixo corresponde ao branco da reação. As curvas referentes ao gene *TSPY* estão mais proximais do que as demais, indicando maior número relativo de cópias (cópias múltiplas); as curvas referentes ao *SRY* estão à direita das demais, indicando menor número relativo de cópias (gene de cópia única)..... 82

- Figura 16 – Curvas de amplificação dos genes *GAPDH*, *SRY* e *TSPY*, técnica de qPCR:.....83
- Figura 17 – Curvas de melting dos primers usados nas reações de quantificação relativa dos genes *GAPDH*, *SRY* e *TSPY*, respectivamente, obtida pela técnica de qPCR. ....84
- Figura 18 – Distribuição relativa: a) de células nas quais se detectou o gene *SRY* em relação ao par de alelos do gene autossômico *GAPDH*; e b) do cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY*, em pacientes 45,X/46,XY e em grupo masculino controle. ( $p < 0,001$ , teste de Mann-Whitney). .....85
- Figura 19 – Diferentes graus de virilização, de acordo com a escala desenvolvida por Prader, para pacientes femininos com Hiperplasia Adrenal Congênita: Estágio I: clitoromegalia sem fusão labial; Estágio II: clitoromegalia e fusão labial posterior; Estágio III: maior grau de clitoromegalia, orifício urogenital perineal único e fusão labial quase completa; Estágio IV: clitóris cada vez mais fálico, seio urogenital semelhante à uretra, na base do clitóris, e fusão labial completa; Estágio V: falus com meato uretral na extremidade, e proeminências labioescrotais semelhantes ao escroto (aparência de homens sem gônadas palpáveis). .....91

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Primers utilizados para amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR)..39
- Tabela 2 – Condições de temperatura e ciclos das PCRs multiplex..... 40
- Tabela 3 – Distribuição das variáveis contínuas de pacientes 45,X/46,XY, segundo registro em prontuário hospitalar de centro de referência em distúrbios do desenvolvimento sexual; e de grupo controle composto por homens residentes em Ribeirão Preto-SP. .... 50
- Tabela 4 – Distribuição absoluta (e), percentual (e%) e relativa ao número amostral (n=34) de características clínicas de pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY, segundo prontuário médico..... 51
- Tabela 5 – Visão global do fenótipo da genitália de pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY em relação à avaliação histopatológica gonadal e ao sexo de criação, segundo registro em prontuário hospitalar em centro de referência em Distúrbios do Desenvolvimento Sexual. .... 53
- Tabela 6 – Idade ao diagnóstico; cariótipo; análise do DNA para os genes *SRY*, *TSPY* e *DAZ*; e achados histopatológicos de pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY..... 56
- Tabela 7 – Distribuição de pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY por faixa etária, de acordo com a idade à coleta do sangue para análise citogenética e para a molecular, segundo registro em prontuário hospitalar em que conste ambas as informações. Observa-se uma relação positiva e forte entre ambas as categorias (correlação  $\rho$  de Spearman). .... 86
- Tabela 9 – Distribuição do percentual de células da linhagem 45,X ao estudo citogenético de linfócitos (%45,X); da proporção de células com o gene *SRY* (%*SRY*) e do número relativo de cópias do gene *TSPY* (*nTSPY*), em função da faixa etária à coleta do DNA, em pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY, segundo registro em prontuário hospitalar..... 87
- Tabela 10 – Frequência absoluta (F, f, F' e f') e prevalência (%) da proporção de células da linhagem 45,X no cariótipo de sangue, e do cálculo relativo do número de células com cópia do gene *SRY*, em relação a variáveis clínicas categóricas do grupo de pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY, segundo registros em prontuário hospitalar..... 88
- Tabela 11 – Frequência absoluta (F e f) e prevalência (%) de pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY com até 50% células com monossomia do X (45,X) ou mais de 50% de células dessa linhagem, ao estudo citogenético, de acordo com o cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY* (*nTSPY*) e com a proporção de células com gene *SRY* (%*SRY*), em relação ao controle endógeno *GAPDH*. .... 90

Tabela 12 – Escore de virilização baseado em pontuação atribuída a características anatômicas. O EMS (do inglês, External Masculinization Score) é baseado em características dos órgãos genitais externos; enquanto o IMS (do inglês, Internal Masculinization Score) nos órgãos genitais internos.....92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% <i>SRY</i>	Percentual relativo de células com <i>SRY</i> .....	25
% <i>Y</i>	Percentual de linhagens com <i>Y</i> em estudo citogenético.....	25
3'-UTR	<i>Three prime untranslated region</i> .....	15
<i>BPY2</i>	Gene <i>basic protein Y2</i> .....	14
<i>CDY</i>	Gene <i>chromodomain Y</i> .....	14
CNV	Varição no número de cópias.....	14
<i>DAZ</i>	Gene <i>deleted in azoospermia</i> .....	14
DDS	Distúrbios do Desenvolvimento Sexual.....	17
DNA	Ácido desoxirribonucleico.....	12
DP	Desvio-padrão.....	30
<i>GAPDH</i>	Gene <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> .....	28
<i>HBE</i>	Gene <i>epsilon-globin</i> .....	28
HCRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto .....	23
<i>HSFY</i>	Gene <i>heat-shock transcription factor Y</i> .....	14
IR	Repetições invertidas .....	14
mRNA	Messenger RNA.....	15
MSY	Região macho específica .....	13
<i>nTSPY</i>	Cálculo relativo do número de cópias do gene <i>TSPY</i> .....	25
ORF	Quadros de leitura abertos .....	14
<i>PRY</i>	Gene <i>PTP-BL related Y</i> .....	14
<i>RBMY</i>	Gene <i>RNA-binding motif Y</i> .....	14
rec-hGH	Hormônio do crescimento humano recombinante .....	25
RRM	Domínio de reconhecimento de ácido ribonucleico .....	15
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i> .....	30
<i>TSPY</i>	Gene <i>testis specific protein Y</i> .....	14
USP	Universidade de São Paulo .....	23

<i>VCY</i>	Gene <i>variable charge</i> .....	14
<i>XKRY</i>	Gene <i>X Kell bloodrelated Y</i> .....	14

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1	OS CROMOSSOMOS SEXUAIS .....	18
1.2	O DESENVOLVIMENTO SEXUAL NORMAL.....	23
1.3	O MOSAICISMO 45,X/46,XY .....	24
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
5.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	34
5.2	DESENHO E METODOLOGIA DO ESTUDO .....	34
5.3	LOCAL DO ESTUDO .....	34
5.4	UNIVERSO DO ESTUDO .....	34
5.5	DESENHO E SELEÇÃO DA CASUÍSTICA.....	35
5.6	DADOS CLÍNICOS .....	36
5.7	ESTUDO MOLECULAR .....	37
<b>5.7.2</b>	<b>Coleta do material biológico</b> .....	<b>37</b>
<b>5.7.3</b>	<b>Extração e quantificação do DNA</b> .....	<b>37</b>
<b>5.7.4</b>	<b>Construção dos <i>primers</i></b> .....	<b>38</b>
<b>5.7.5</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	<b>39</b>
<b>5.7.6</b>	<b>Cálculo do número de cópias dos genes <i>TSPY</i> e <i>SRY</i></b> .....	<b>40</b>
5.8	CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	42
5.9	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA .....	44
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES .....	46

6.2	AVALIAÇÃO CITOGÊNÉTICA E MOLECULAR.....	55
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
7.1	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	62
7.2	AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PESQUISA DO CROMOSSOMO Y .....	65
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>
	<b>APÊNDICE A – ILUSTRAÇÕES COMPLEMENTARES .....</b>	<b>78</b>
	<b>APÊNDICE B – TABELAS COMPLEMENTARES.....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>89</b>

# 1. INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OS CROMOSSOMOS SEXUAIS

O material genético dos eucariotos está organizado em moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) as quais estão compactadas em cromossomos. Cada célula somática, componente dos órgãos e tecidos humanos, normalmente possui 46 cromossomos, sendo 22 pares autossômicos e um par sexual, que pode ser heterogamético 46,XY; ou homogamético, 46,XX, em pessoas com sexo genético masculino ou feminino, respectivamente (LEWONTIN; WESSLER; GRIFFITHS, 2007).

O cromossomo X representa cerca de 5% do total de DNA nas células, e abrange genes que codificam proteínas com funções variadas no corpo. O cromossomo Y, por sua vez, representa cerca de 2% do DNA total nas células humanas, e abriga genes predominantemente codificadores de proteínas relacionadas ao desenvolvimento sexual (BICHILE et al., 2014; DHANOA; MUKHOPADHYAY; ARORA, 2016; YEN, 1999).

Em mulheres 46,XX, um dos cromossomos X é permanentemente inativado em cada célula entre o quinto e o oitavo dias de idade gestacional, exceto nas oogônias. Devido à inativação aleatória do cromossomo X em mulheres normais, o cromossomo X herdado da mãe está ativo em algumas células; e o herdado do pai, em outras (MELLO et al, 2017).

Alguns genes escapam da inativação do cromossomo X, em humanos, muitos dos quais localizados nas regiões pseudoautossômicas (PARs, do inglês, *Pseudo Autosomal Regions*) dos cromossomos sexuais. Tais regiões, presentes em ambos os cromossomos sexuais, devem ser funcionais nos dois alelos, tanto em homens quanto em mulheres para que se desenvolvam normalmente (HELENA MANGS; MORRIS, 2007).

No cromossomo Y (Figura 1), as PARs são sequências que flanqueiam a região macho específica (MSY, do inglês, *Male-Specific region of the human Y chromosome*) e que possuem homologia com o cromossomo X (COLACO; MODI, 2018). As PARs dos cromossomos X e Y formam um complexo sinaptonêmico durante a meiose e sofrem recombinação obrigatória, o que mantém a homologia dessas regiões em humanos e permite o pareamento e a segregação adequada do par de cromossomos sexuais (SOLARI, 1999; BHOWMICK; SATTA; TAKAHATA, 2007; BACHTROG, 2013).

A MSY consiste em diferentes classes de sequências de eucromatina (BHOWMICK; SATTA; TAKAHATA, 2007):

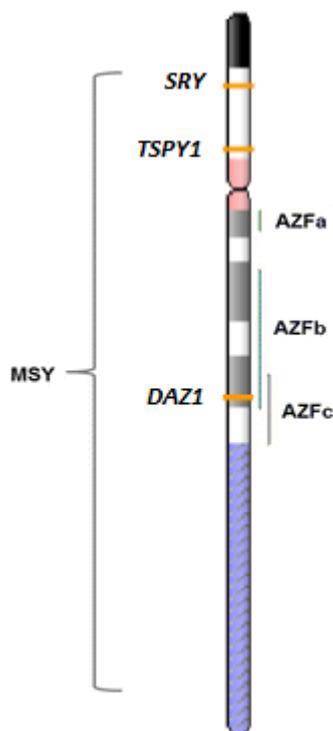
- a) A região X-transposta (3,4 Mb) é resultante de uma transposição do X para o Y há cerca de 5 milhões de anos, e possui apenas dois genes;
- b) A região X-degenerada, derivada do autossomo ancestral que originou os cromossomos sexuais em mamíferos, possui 16 genes de cópia única, e 13 pseudogenes com homologia no cromossomo X;
- c) A região *amplicon* (10,2 Mb) com cerca de 60 genes, que são compostos por oito palíndromos (P1-P8), três repetições invertidas (IR1-IR3, do inglês, *Inverted Repeats*) e longos quadros de leitura abertos (ORF, do inglês, *Open Reading Frames*) (BACHTROG, 2013; BHOWMICK; SATTA; TAKAHATA, 2007).

Os genes localizados nas regiões X-transposta e X-degenerada do cromossomo Y são muito semelhantes aos homólogos localizados no cromossomo X (JANGRAVI et al, 2012). A região *amplicon*, por sua vez, codifica nove famílias de genes, sete das quais envolvidas na espermatogênese: *X cell bloodrelated Y (XKRY)*, *chromodomain Y (CDY)*, *variable charge (VCY)*, *deleted in azoospermia (DAZ)*, *heat-shock transcription factor Y (HSFY)*, *RNA-binding motif Y (RBMV)*, *testis specific protein Y (TSPY)*, *basic protein Y2 (BPY2)* e *PTP-BL related Y (PRY)* (BACHTROG, 2013; BHOWMICK; SATTA; TAKAHATA, 2007; SKALETSKY et al., 2003).

Dentro da região *amplicon* se encontram variações no número de cópias (CNVs, do inglês, *Copy Number Variation*), que são ganhos e perdas genômicas de 1 Kb ou mais de extensão, em relação ao genoma de referência (CARDOSO et al., 2016). As CNVs são categorizadas como polimorfismos, quando existem múltiplos estados alélicos na população; ou como variantes raras do número de cópias (ITSARA et al., 2009), capazes de alterar elementos de regulação, outros genes ou os níveis de expressão gênica, conduzindo a uma variação fenotípica que pode estar associada a uma doença ou característica específica (COLAIANNI; MAZZEI; CAVALLARO, 2016).

O locus do Fator de Azoospermia (AZF, do inglês, *Azoospermia Factor*) consiste em três domínios genéticos no braço longo do cromossomo Y humano (Yq), referidos como AZFa, AZFb e AZFc, compostos por múltiplos trechos de sequências de *amplicons*. O gene *DAZ*, do inglês, *deleted in azoospermia*, está localizado na região AZFc, na posição Yq11.223 (Figura 1). As deleções dessa região de AZFc são a causa genética conhecida mais comum da infertilidade masculina humana (MONDARINI et al, 2017).

Figura 1 – Ideograma do cromossomo humano Y com destaque para os genes *SRY*, *TSPY* e *DAZ*, regiões AZF e região “específica do macho” (MSY).



Legenda: cor de rosa=centrômero; branco=banda G negativa; cinza ou preto=banda G positiva; e lilás=heterocromatina.

Fonte: construída com a ferramenta *Genome Decoration* (NCBI)<sup>1</sup>, adaptada de Colaco-Modi, (2018)<sup>2</sup>, modificado pela autora.

O cromossomo Y contém quatro cópias do *DAZ* (*DAZ1*, *DAZ2*, *DAZ3*, *DAZ4*), em duplicações palindrômicas, com número de repetições e sequências variáveis. O *DAZ* codifica um domínio de reconhecimento de ácido ribonucleico (RRM, do inglês, *RNA Recognition Motif*) (O'LEARY et al, 2016), uma proteína de ligação ao RNA capaz de se ligar à região não-traduzida 3' de RNAs mensageiros (3'-UTR-mRNAs – 3'-UTR, do inglês, *three prime untranslated region*; mRNAs, do inglês, *messenger RNA*), regulando sua tradução. Ela promove a progressão das células germinativas para a meiose e a formação de células germinativas haploides (KEE et al, 2009).

O gene *TSPY*, por sua vez, também está localizado na região *amplicon*. É um gene de múltiplas cópias repetitivas de 20Kb em tandem, cujo número varia amplamente na

<sup>1</sup> Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>>. Acesso em mai. 2019.

<sup>2</sup> COLACO, Stacy; MODI, Deepak. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 2, 2018.

população, de 21 a 64 cópias, incluindo os pseudogenes (GIACHINI et al 2009; REPPING et al., 2006 MASSAIA; XUE, 2017). A maioria das cópias são mapeadas no braço curto do cromossomo Y (Yp11.2), conforme representado na Figura 1, e algumas unidades no braço longo (Yq11.23), além de pseudogenes nos cromossomos 2p22.2, 6q22.1, 8q22.1, 20q11.21 e Xp11.22 (MANZ et al., 1993; SCHEMPP et al., 1995).

As cópias do gene *TSPY* parecem ter sido seletivamente mantidas no cromossomo Y de mamíferos há 80 milhões de anos. Enquanto genes de cópia única costumam apresentar alta identidade entre as sequências, as cópias funcionais desse gene podem diferir entre si em até 1% (Vogel and Schmidtke, 1998). A diferença entre estas e seus pseudogenes, por sua vez, é de cerca de 10% (MANZ et al., 1993; SKAWRAN et al., 2005; SVACINOVA et al., 2011; VOGEL, SCHMIDTKE, 1998).

O número de cópias do *TSPY* varia de 9 a 101 entre indivíduos (NICKKHOLGH et al., 2010; GIACHINI et al., 2009; SHEN et al., 2013). Essas repetitivas em tandem funcionam como hotspot para recombinação intracromossômica – conversão gênica, que levam a essas diferenças interpessoais, e entre tecidos de um mesmo organismo (SKALETSKY et al., 2003). Acredita-se que a recombinação previna a deterioração genética em populações sexuadas, por permitir a conservação de genótipos funcionais através da remoção de mutações deletérias (MAZEYRAT; MITCHELL, 1998).

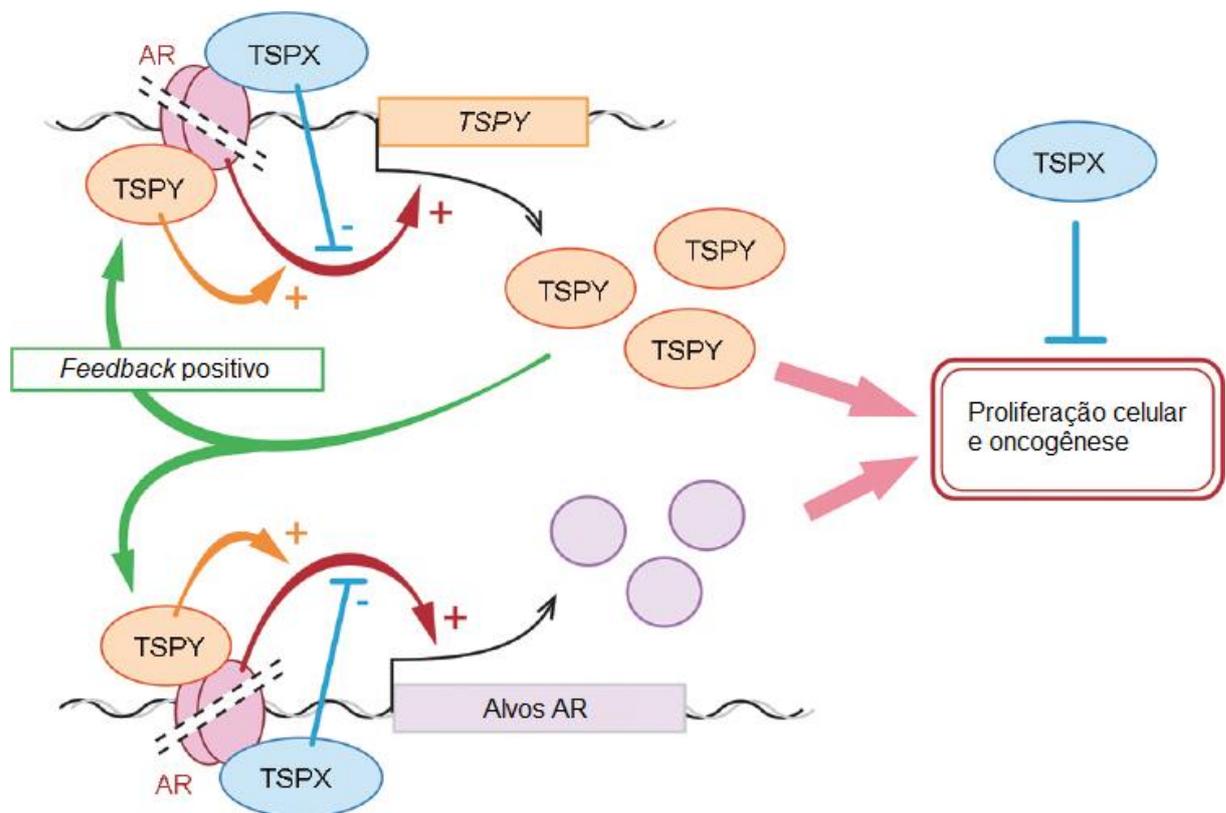
O protótipo do gene *TSPY* humano é composto por uma região promotora, 6 éxons e 5 íntrons. São conhecidas onze isoformas do transcrito desse gene, as quais podem ser detectadas tanto em tecidos normais quanto neoplásicos (ZHANG et al., 1992; DECHEND et al., 2000; SCHNIEDERS et al., 1996; LAU et al., 2003; LI et al., 2007)

A proteína *TSPY* pertence à família de proteínas com domínio SET/NAP conservado, que inclui a oncoproteína SET (OZBUN et al., 2003, 2005), o autoantígeno-1 da divisão celular (CDA-1) (CHAI et al., 2001) e a *TSPX* (DELBRIDGE et al., 2004). A proteína *TSPY* se liga a ciclinas tipo B, intensifica a atividade de ciclinas B-CDK-1, e acelera a transição G2/M no ciclo celular. Além de regular o processo de espermatogênese, esse gene interfere na atividade do gene homólogo ao *TSPY* no cromossomo X, o *TSPX* (LAU, 1999; SCHNIEDERS et al., 1996; SVACINOVA et al., 2011; LAU; LI; KIDO, 2009).

Segundo Lau (2009), o *TSPY* atua na embriogênese, na proliferação de células-tronco pluripotentes do sistema reprodutor masculino e de espermatogônias adultas. No adulto, o *TSPY* se expressa nos testículos e, em níveis mais baixos, em células epiteliais da próstata (LAU et al., 2003); mas pode se expressar anormalmente em neoplasias (gonadoblastoma,

seminoma, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular) (VOGEL et al.,1998; LAU, 1999; LAU et al., 2003; KERSEMAEKERS et al., 2005; YIN et al., 2005).

Figura 2 – Modelo de alça de *feedback* positivo entre o *TSPY* e o AR, na regulação de genes. A expressão do gene *TSPY* é regulada por ações de AR em seu promotor (esquerda, superior). A proteína *TSPY* sintetizada, por sua vez, interage com a AR (variantes da AR) e exacerba a transativação global dos genes-alvo (esquerda, inferior), incluindo sua própria expressão (esquerda, superior), estabelecendo assim uma alça de *feedback* positivo no sexo masculino. *TSPX*, por outro lado, inibe a transativação da variante AR/AR do *TSPY* e sua regulação global de genes. Os receptores de hormônios sexuais masculinos e o *TSPY* promovem sinergicamente a proliferação celular, enquanto o *TSPX*, como supressor tumoral, neutraliza essas ações oncogênicas (à direita).



Legenda: AR: receptor de andrógeno; *TSPX*: homólogo do *TSPY* no cromossomo X; *TSPY*: proteína Y específica do testículo codificada.

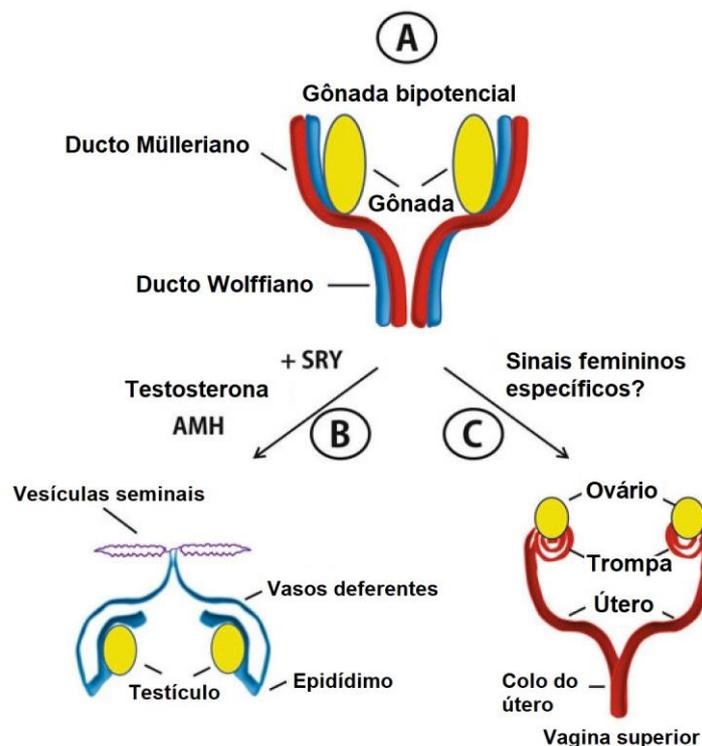
Fonte: Adaptado de FENG, Ninghan; HUANG, Jiaoti. Prostate cancer: molecular and cellular mechanisms and their implications in therapy resistance and disease progression. **Asian journal of andrology**, v. 21, n. 3, p. 213, 2019.

## 1.2 O DESENVOLVIMENTO SEXUAL NORMAL

Enquanto as células somáticas normais são diploides, as células germinativas são haploides – apresentam metade do material cromossômico daquelas: oócitos 23,X; e espermatozoides 23,X ou 23,Y. O sexo genético do zigoto é **determinado**, no momento da fertilização de um oócito normal, pelo cromossomo sexual presente no espermatozoide (DANON; SACHS, 1957; ARNOLD; CHEN, 2009).

O embrião humano é inicialmente equipado com primórdios gonadais e genitais idênticos em ambos os sexos. A partir da sexta semana de idade gestacional, a presença do gene *SRY* desencadeia a **diferenciação gonadal** (Figura 3). O *SRY* é um pequeno gene de exon único, encontrado praticamente em todos os mamíferos, o qual codifica um fator de transcrição que é membro da família do grupo de alta mobilidade (do inglês, *High Mobility Group-family*), de proteínas de ligação ao DNA (SU; LAU, 1993).

Figura 3 – O desenvolvimento das estruturas genitais. A presença do gene *SRY* no cromossomo Y desencadeia o desenvolvimento de testículos, que secretam testosterona e hormônio anti-Mülleriano (AMH), levando ao desenvolvimento das estruturas genitais masculinas típicas.



Legenda: AMH: hormônio anti-mülleriano.

Fonte: Adaptado de BAKKER, Julie. Sex differentiation: Organizing effects of sex hormones. In: **Gender Dysphoria and Disorders of Sex Development**. Springer, Boston, MA, 2014. p. 3-23.

O *SRY* se expressa inicialmente nas células precursoras das células de Sertoli (células pré-Sertoli), durante a transformação das gônadas indiferenciadas em testículos (ARNOLD, 2009). As células de Sertoli passam a produzir hormônio anti-Mülleriano (AMH, do inglês, *anti-Müllerian hormone*), levando à formação de epidídimo, ducto deferente e vesículas seminais, derivados dos ductos de Wolff. As células de Leydig produzem andrógenos que atuam na **diferenciação da genitália** externa: posição gonadal, comprimento do fálus, fusão escrotal e posição do meato uretral (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

Na ausência do *SRY*, os cordões sexuais se degeneram na região medular; desenvolve-se o córtex da gônada, e depois se formam os folículos primordiais (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016). O controle da gonadogênese, em ambos os sexos, é um processo complexo, dependente de genes dos cromossomos sexuais e dos autossomos (BASHAMBOO; EOZENOU; ROJO, 2017).

### 1.3 O MOSAICISMO 45,X/46,XY

Durante a divisão celular, podem ocorrer erros de disjunção envolvendo os cromossomos sexuais. Caso o processo seja pós-zigótico, resultará na coexistência de diferentes linhagens celulares. Variações no número de cópias dos cromossomos sexuais estão entre as aneuploidias mais comuns, e podem se apresentar como alterações do desenvolvimento sexual, se ocorrerem precocemente no desenvolvimento embrionário.

As alterações do desenvolvimento sexual são conjuntamente designadas como DDS, devido ao termo de língua inglesa “*Disorders of sexual development*”. Os DDS são “condições congênitas nas quais há discordância entre o sexo genético, gonadal ou genital”, com apresentação variável, que ocorrem na presença ou na ausência de anomalias cromossômicas (LEE et al., 2006). A incidência dos DDS é estimada em cerca de 1:5000, mas apenas uma parcela destes apresenta ambiguidade genital, situação que compromete a avaliação do sexo fenotípico (SAX, 2002).

De acordo com o Consenso no Manejo de Distúrbios da Intersexualidade (LEE, 2006), os DDSs podem ser classificados segundo o cariótipo: 46,XX; 46,XY ou com alterações nos cromossomos sexuais. Este último grupo é representado pela síndrome de Turner; síndrome de Klinefelter; Disgenesia Gonadal Mista e pelo DDS ovotesticular.

A síndrome de Turner, por sua vez, caracteriza-se pela completa feminilização da genitália externa e interna, associada a gônadas disgenéticas e a fenótipo característico. A apresentação clínica é variável, podendo abranger baixa estatura, malformações

cardiovasculares e renais, e dismorfias tais como *cubitus valgus*, encurtamento do quarto metacarpo/metatarso, implantação baixa de cabelos em nuca, *nevi* pigmentados numerosos, palato ogival, orelhas rodadas posteriormente e baixo implantadas, face triangular, pescoço curto e tórax em escudo (CARVALHO et al., 2018).

A síndrome de Turner é causada pela monossomia total ou parcial do cromossomo X, na presença detectada ou não de outras linhagens celulares. Considerando a proposição de que a monossomia real dos cromossomos sexuais, 45,X ou 45,Y, seria letal, o rastreamento para material de cromossomo Y é recomendável para todas as pessoas com essa síndrome, dado o risco para desenvolvimento de gonadoblastoma (BERGERON et al., 2011; KWON et al., 2017; ROJEK et al., 2017).

Gonadoblastoma é uma neoplasia composta por elementos gonadais, tais como células germinativas primordiais, células de Sertoli imaturas ou células da granulosa do cordão sexual e células estromais gonadais. Os gonadoblastomas são, por definição, benignos, por não metastatazarem, todavia as formas secretoras se relacionam à puberdade precoce; mais de 50% têm um disgerminoma coexistente, que é maligno; e outros 10% têm outras neoplasias mais agressivas. Por seu comportamento, são frequentemente tratados como malignos. (EHDAIVAND; GUPTA, 2014)

O *TSPY* é o principal candidato ao *gonadoblastoma locus on Y* (GBY, do inglês), região específica do cromossomo Y, presente em pacientes que desenvolvem gonadoblastoma (PAGE, 1987; KAPROVA-PLESKACOVA et al., 2013). Trata-se de um gene expresso em testículos normais, cujo estímulo à proliferação celular em gônadas disgenéticas se relacionaria à ocorrência de gonadoblastoma. Excepcionalmente, há relatos de casos de pacientes com síndrome de Turner sem sequências detectáveis do *TSPY* no sangue, mas com *SRY*, que desenvolveram gonadoblastoma (BIANCO, 2006).

O DDS ovotesticular se caracteriza pela coexistência de tecido ovariano contendo folículos, e tecido testicular contendo túbulos seminíferos, ambos confirmados histologicamente, seja em decorrência de translocações de genes entre os cromossomos sexuais, de variantes patogênicas em genes do desenvolvimento sexual ou do mosaicismos XX/XY (VAN NIEKERK et al, 1981). Quando as gônadas são histologicamente discordantes, na ausência de folículos ovarianos, por sua vez, designa-se “disgenesia gonadal mista” (SOHVAL, 1963; SIMPSON, 1982).

O mosaicismos cromossômico 45,X/46,XY e suas variantes têm incidência estimada em 1,7/10.000 gestações (SKAKKEBAEK, 2003), mas o diagnóstico é dificultado pela apresentação clínica variável. O fenótipo pode ser parte de um espectro do masculino com ou

sem criptorquidia, que é ausência das gônadas na bolsa escrotal, ou hipospádia, que é a implantação anômala do meato uretral na porção ventral do pênis; ao feminino com gônadas disgenéticas, como descrito na síndrome de Turner (LEE et al., 2006).

No caso do mosaicismo 45,X/46,XY, não é possível prever quais linhagens celulares estão ativas nas gônadas: se a euploide ou aneuploide, mas se sabe que células primordiais cromossomicamente anormais resultam em gônadas histologicamente anormais – disgenéticas.

## 2. JUSTIFICATIVA

## 2 JUSTIFICATIVA

DDS podem ocorrer na presença ou na ausência de anomalias cromossômicas. A aneuploidia não detectada pode aumentar o risco de perda de gravidez no primeiro trimestre. Alguns casos de aneuploidia são compatíveis com a vida, principalmente quando se apresentam em mosaico, ou seja, quando são detectadas duas ou mais linhagens celulares, sobretudo se uma delas for normal (MAXWELL et al., 2016).

O cromossomo Y é frequentemente perdido em células somáticas humanas (FORSBERG et al., 2014). A frequência aumentada de mosaicismos envolvendo cromossomos sexuais pode estar relacionada à falta de homólogo para reparo das quebras de dupla-fita, mesmo nas linhagens 46,XX, dada a replicação tardia do cromossomo X inativado (KOREN et al., 2014)

Determinados pontos de variações de número de cópias coincidiram com os sítios de instabilidade cromossômica frequentemente observada nas quebras, correspondendo às unidades de alta atividade de transcrição em humanos, por serem regiões ricas em cromatina aberta, mais expostas à exposição ambiental e a eventos relacionados à transcrição genica, com aumento da densidade gênica e altas taxas de recombinação meiótica, na proximidade a elementos repetitivos (MACHIELA et al., 2017; WILSON et al., 2014).

Não foram publicados estudos que correlacionem o número de cópias do gene *TSPY* à perda deste cromossomo; nem que correlacionem o percentual de detecção do gene *SRY*, a proporção de células da linhagem 45,X, e as características clínicas destes pacientes. O estudo do mosaicismo 45,X/46,XY aprofunda a caracterização deste distúrbio na nossa população e contribui para a melhor compreensão do papel dos cromossomos sexuais para um desenvolvimento sexual normal.

### 3. HIPÓTESE

### 3 HIPÓTESE

Há diferença no número de cópias do gene *TSPY* em indivíduos diagnosticados com mosaïcismo 45,X/46,XY, comparados a grupo masculino controle. O percentual de células da linhagem 45,X, o percentual relativo de células com o gene *SRY* e o número de cópias do gene *TSPY* se relacionam à apresentação clínica do mosaïcismo 45,X/46,XY.

## 4. OBJETIVOS

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar aspectos clínicos, citogenéticos e moleculares de pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY; e os comparar a dados de grupo controle.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar clinicamente o grupo de pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY.
- b) Investigar associação do percentual de células da linhagem 45,X, da presença relativa do gene *SRY* e do número de cópias do gene *TSPY*, com as características clínicas do grupo de pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY.
- c) Quantificar e comparar o número de cópias do gene *TSPY* de pacientes diagnosticados com mosaicismo 45,X/46,XY com o grupo controle.
- d) Correlacionar o número de cópias do gene *TSPY* ao percentual de células da linhagem 45,X, em indivíduos com mosaicismo 45,X/46,XY.
- e) Correlacionar o cálculo relativo de cópias do gene *SRY* ao percentual de células da linhagem 45,X, em indivíduos com mosaicismo 45,X/46,XY.

## 5. METODOLOGIA

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo atende aos requisitos da “Declaração de Helsinque” para pesquisa em seres humanos, e à resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996). Possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob os pareceres de número 415/2003 e 12.924/2006. Os pacientes ou seus responsáveis legais, no caso dos menores de idade ou com deficiência intelectual, concordaram em participar do estudo de forma livre e esclarecida.

### **5.2 DESENHO E METODOLOGIA DO ESTUDO**

Trata-se um estudo analítico transversal que avaliou um grupo de pacientes com diagnóstico de DDS 45,X/46,XY, com um nível de confiança de 95%. Segundo Hook (1972), se analisadas 99 a 112 células, seria necessário que 3% destas apresentassem determinada alteração numérica para a tomarmos como verdadeira, com nível de confiança de 95%. Essa proporção mínima necessária é inversamente proporcional ao número de metáfases analisadas.

### **5.3 LOCAL DO ESTUDO**

A pesquisa foi no Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCRP), da Universidade de São Paulo, e no Laboratório de Epigenética e Reprodução da FMRP-USP.

### **5.4 UNIVERSO DO ESTUDO**

O universo do estudo abrangeu indivíduos com mosaicismos 45,X/46,XY atendidos no Serviço de Genética Médica do HCRP, no período de 01/01/1973 a 01/05/2019. Este serviço é referência para atendimentos ambulatoriais de pacientes com DDS.

Uma vez que não existe uma entrada específica na Classificação Internacional de Doenças (CID-10, OMS, 1994)<sup>3</sup>, o levantamento dos pacientes foi feito pelos termos “disgenesia gonadal”; “Turner” e “45,X” nas fichas clínicas de registro familiar deste serviço de Genética Médica; bem como pela busca por resultados que contenham o termo “45,X” entre os cariótipos realizados pelo Laboratório de Citogenética do HCRP, a partir de 11/05/2006, quando o banco de resultados foi informatizado, até 15/03/2018.

A análise de amostras de DNA de homens residentes em Ribeirão Preto, participantes do estudo de Cruz (2018), desenvolvido no Laboratório de Epigenética e Reprodução da FMRP-USP foi utilizada como controle.

## 5.5 DESENHO E SELEÇÃO DA CASUÍSTICA

Os participantes foram selecionados segundo procedimentos de amostragem não probabilística, por critérios de conveniência.

### 5.5.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com cariograma, obtido a partir de cultura temporária de linfócitos de sangue periférico, evidenciando mosaicismos clinicamente relevantes, conforme preconizado por Hook (1972), constituído por pelo menos uma linhagem 45,X e por outra 46,XY, com ou sem alteração estrutural do cromossomo Y; ou ter cariótipo evidenciando linhagem 45,X, e outra linhagem contendo cromossomo marcador com sequências do gene *TSPY* detectadas à pesquisa qualitativa deste por Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR). De acordo com sistema internacional de nomenclatura para citogenética humana (ISCN), entende-se como marcador um cromossomo estruturalmente anormal com a presença de centrômero, cuja origem não pode ser caracterizada pelo estudo citogenético convencional; enquanto o fragmento não apresenta centrômero (SHAFFER et al, 2013).

### 5.5.2 Critérios de exclusão

- a) Pacientes cujo cariótipo não foi realizado pelo Departamento de Genética ou Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – FMRP-USP.

---

<sup>3</sup> ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **CID-10: Classificação Estatística Internacional de Doenças com disquete Vol. 1.** Edusp, 1994.

- b) Detecção de células da linhagem 45,X com nível de confiança menor que 95% (ex. menos de 3 células, em 100 metáfases analisadas), para evitar linhagens resultantes de artefatos da técnica.
- c) Detecção de linhagem 46,XX coexistente.
- d) Deleção do gene *SRY*, para efeito de cálculo do número de cópias do gene *TSPY* (*nTSPY*), por carência de controle interno da reação.

## 5.6 DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos foram obtidos a partir de revisão de prontuários físicos, computadorizados e microfilmados. Registraram-se os seguintes dados, quando disponíveis:

- a) Percentual de linhagens com Y em estudo citogenético (% Y);
- b) Idade à coleta dos dados, à coleta do cariótipo e à coleta de amostra para extração de DNA;
- c) Sexo social adotado;
- d) Idade dos pais ao nascimento;
- e) Peso ao nascer;
- f) Comprimento ao nascer;
- g) Desenvolvimento neuropsicomotor;
- h) Detecção de anomalias cardíacas;
- i) Detecção de anomalias renais;
- j) Relato de doença neuropsiquiátrica;
- k) Queixa de infertilidade conjugal;
- l) Fenótipo genital;
- m) Estruturas da genitália interna;
- n) Realização de estudo histopatológico gonadal;
- o) Realização de gonadectomia;
- p) Detecção de gonadoblastoma ou de outros tumores gonadais;
- q) Estatura final;
- r) Cálculo de canal familiar;
- s) Tempo de uso do hormônio do crescimento humano recombinante (rec-hGH).

## 5.7 ESTUDO MOLECULAR

### 5.7.2 Coleta do material biológico

Foram colhidos cerca de 4 mL de sangue por punção venosa com tubo VacuTainer™ contendo EDTA como anticoagulante. As amostras foram processadas e armazenadas no Laboratório de Epigenética e Reprodução, do Departamento de Genética, da FMRP-USP.

### 5.7.3 Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo modificado de extração e precipitação de DNA em NaCl (OLERUP; ZETTERQUIST, 1992). Para tanto, reservou-se 900 µL de cada amostra de sangue periférico com 450µL de tampão de lise [Sucrose 0,32 M, Tris HCl (pH 7,5), 12 mM, MgCl<sub>2</sub>, 5 mM, Triton 1x], em um microtubo de 1,5 mL, o qual foi centrifugado a 14.000 RPM por 20 segundos; descartou-se o líquido e se repetiu o procedimento de lavagem até três vezes, em 1 mL de tampão de lise celular.

O corpo de fundo resultante do lavado foi somado com 380 µL de solução de proteinase K: 200 µg de proteinase K, NaCl 79,3 mM, SDS (pH 7.2) 0,52%, EDTA (pH 8) 25,4 mM. Essa solução permaneceu incubada, em banho maria a 55°C, por 14 horas. No dia seguinte, foi refrigerada a -20°C por 15 minutos. Posteriormente, acrescentaram-se 120 µL de NaCl 5 M, e foi centrifugada a 14.000 RPM por oito minutos, para decantação dos resíduos de proteínas.

A seguir, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL para realizar a purificação por precipitação em etanol absoluto refrigerado. Ao tubo contendo o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto a -20°C, que foi invertido de três a cinco vezes. Essa solução foi levada a -80°C por 15 minutos, e posteriormente foi centrifugada a 14.000 RPM a 0°C por 10 minutos, e mantida por duas horas a -20°C. Após esse tempo, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Ao tubo, foi adicionado 1 mL de etanol a 70% a -20°C, que foi mais uma vez centrifugado; e o sobrenadante, desprezado.

Na sequência, o microtubo contendo o corpo de fundo (pellet) da amostra foi colocado no sistema Eppendorf Concentrator plus a 45°C, por 20 minutos. Em seguida, o pellet contendo o DNA extraído e purificado foi ressuscitado em 50 µL de água deionizada estéril, permaneceu em banho maria a 37°C por 1 hora, e foi congelado a -20°C. No dia seguinte à

extração, as amostras foram avaliadas por espectrofotometria quanto à qualidade e à quantidade do DNA, no Nanodrop 2000® (Thermo Fisher Scientific Inc), seguindo os critérios de qualidade indicados pelo fabricante.

#### 5.7.4 Construção dos *primers*

Foi realizada a investigação qualitativa dos genes *TSPY*, *DAZ* e *SRY*, usando os genes *GAPDH* (do inglês, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) como controle da reação do primeiro, e o *HBE* (do inglês, *epsilon-globin*) como controle da reação dos dois últimos.

Para a quantificação relativa do número de cópias do gene *TSPY*, por sua vez, adotou-se o *SRY*, em cópia única no cromossomo Y, como controle interno; e *GADPH*, em cópia dupla em autossomo, como controle externo.

Os *primers* foram construídos a partir de sequências depositadas nos bancos de dados GenBank (NCBI) e UCSC Genome Bioinformatics <<http://genome.ucsc.edu>>, utilizando os programas *PrimerQuest Tool* <[https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Details/0\\_1](https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Details/0_1)> e *Primer Biosoft International* <<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>>, conforme apresentados na Tabela 1. A sequência escolhida para a investigação do gene *TSPY* foi específica das cópias funcionais deste gene, não compartilhada com os pseudogenes.

A plataforma BLASTn foi usada para validação dos *primers* de acordo com as sequências de alta similaridade e homologia do *GenBank* (NCBI) e posterior padronização das condições de reação (BARTMANN et al., 2004; RAMOS et al., 2010).

Tabela 1 – *Primers* utilizados para amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR).

<i>Primer</i>	sequência 5'-3'	bp	gene
<i>DAZ-F</i>	TAAATCTGTTGGATCCTCTCAGC	210	<i>deleted in azoospermia (DAZ)</i>
<i>DAZ-R</i>	CAC AGA ACC AGG TTC TAA ATA AAC		
<i>GAPDH-F</i>	CATCCCTTCTCCCCACACAC	104	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>
<i>GAPDH-R</i>	AGTCCCAGGGCTTTGATTTG		
<i>HBE-F</i>	CCT GAG AGC TTG CTA GTG ATT	619	<i>epsilon-globin (HBE1)</i>
<i>HBE-R</i>	TAG TCC CAC TGT GGA CTA CTT		
<i>SRY-F</i>	GCGATGATTACAGTCCAGC	174	<i>sex-determining region Y (SRY)</i>
<i>SRY-R</i>	GAGACCACACGATGAATGC		
<i>TSPY-F</i>	CGGCGTCGATGTGACTCTTTGG	176	<i>testis-specific protein, Y-linked (TSPY)</i>
<i>TSPY-R</i>	CGCTCTGAACTCGCTTCTGCTC		

Legenda: bp - Pares de bases (do inglês, *base pairs*).

Fonte: adaptado de Cruz (2018).

### 5.7.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras foram testadas por PCR multiplex, para presença dos genes *SRY*, *DAZ* e *TSPY*; e seus respectivos genes de referência, os genes *GAPDH* para o *TSPY*, e o *HBE* para os dois primeiros. As PCR foram realizadas a partir de 100 ng de cada amostra de DNA, utilizando-se os seguintes reagentes (Invitogen / Termo Fisher Scientific®): 2,5 µL de Tampão 10x, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5 µL de dNTP 10mM, 0,2µL Taq DNA polimerase (5 U/µL), e os *primers* F e R, nos volumes a seguir, todos a uma concentração final de 10 pmol; e água ultrapura para um volume final de 25 µL:

- DAZ*<sub>F</sub> e *DAZ*<sub>R</sub>: 0,7 µL; e *HBE*<sub>F</sub> e *HBE*<sub>R</sub>: 1,0 µL;
- SRY*<sub>F</sub> e *SRY*<sub>R</sub>: 0,3 µL; e *HBE*<sub>F</sub> e *HBE*<sub>R</sub>: 1,0 µL;
- TSPY*<sub>F</sub> e *TSPY*<sub>R</sub>: 0,5 µL; e *GAPDH*<sub>F</sub> e *GAPDH*<sub>R</sub>: 0,6 µL.

O microtubos foram incubados em termociclador (T-100 Thermal Cycler BIORAD). O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. As condições de temperatura e ciclos das reações podem ser observadas na tabela 5.2.

Tabela 2 – Condições de temperatura e ciclos das PCRs multiplex.

<i>Primers</i>	Desnaturação inicial	Desnaturação	Hibridação	Extensão	Extensão final	Ciclos
<i>TSPY</i> <i>GAPDH</i>	94 °C x 4min	94 °C x 1min	60 °C x 1min	72 °C x 1min	72 °C x 5min	37
<i>SRY</i> <i>HBE</i>	94 °C x 5min	94 °C x 45s	54 °C x 1min	72 °C x 30s	-	34
<i>DAZ</i> <i>HBE</i>	96 °C x 5min	94 °C x 1min	58 °C x 1min	72 °C x 1min	72 °C 10min	35

Legenda: °C: temperatura expressa em graus Celcius; min: tempo expresso em minutos; s: tempo expresso em segundos.

Fonte: adaptado de Cruz (2018).

### 5.7.5 Cálculo do número de cópias dos genes *TSPY* e *SRY*

Para cálculo relativo do n*TSPY* e do percentual de detecção do gene *SRY* (%*SRY*), o DNA extraído foi posteriormente analisado pela técnica de qPCR (Quantitative *Polymerase*

*Chain Reaction*), no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems*, seguindo as especificações do fabricante, após padronização de reagentes e de programação.

Desenharam-se *primers* para as sequências do gene de múltiplas cópias *TSPY*, do gene de cópia única *SRY*, ambos mapeados no cromossomo Y; e do controle endógeno, gene autossômico, de dupla cópia (*glyceraldehyde-3-hosphate dehydrogenase*, *GAPDH*), mapeado no cromossomo autossômico 12 (Tabela 1).

Os *primers* foram construídos a partir de sequências depositadas nos bancos de dados *GenBank* (NCBI) e *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu>), utilizando os programas *PrimerQuest TOOL* ([https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Details/0\\_1](https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Details/0_1)) e *Primer Biosoft International* (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>). As plataformas *BLASTn* e *PCR in silico Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) foram usadas para validação dos *primers*, de acordo com as sequências de alta similaridade e homologia.

Realizaram-se curvas-padrão de diluições seriadas de DNA para os *primers* para estabelecer a eficiência da reação, segundo as especificações do fabricante (90%-110%). A eficiência foi calculada por meio da fórmula  $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \cdot 100$ , onde  $E = 100$  corresponde a 100% de eficiência. Os valores de eficiência para os genes *TSPY*, *SRY* e *GAPDH* foram, respectivamente, 107%, 106%, 104%. As concentrações da reação de amplificação foram 5  $\mu\text{L}$  de *SYBR® Green PCR Master Mix (5X, Applied Biosystems®)*, 0,1  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10 pmol, *Thermo Fisher®*), 1  $\mu\text{L}$  de DNA (10 ng) e 3,8  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura para um volume final da reação de 10  $\mu\text{L}$ . As reações para cada gene foram realizadas separadamente.

As condições de amplificação para todos os genes foram: 95°C por 10 minutos para ativação da enzima, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos, pareamento à 60°C por 1 minuto. Após os 35 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise de curva de dissociação, para a verificação de ausência de amplificação de produtos inespecíficos e dímeros de *primer*.

A ciclagem da curva de dissociação consistiu em: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e o incremento de 0,3°C até atingir 95°C por 15 segundos. Em cada placa, a mesma amostra foi utilizada como controle de experimento. Para cada reação, utilizou-se triplicata experimental, triplicata de controle negativo e duplicata de placa, sendo que somente as placas e amostras com desvio padrão < 0,3 foram utilizadas para as análises. O valor de *threshold* utilizado para análise de todas as placas foi de 0,5, com nível máximo de confiança de 95%. O programa estatístico utilizado fora o específico do equipamento no qual os testes foram realizados, adotando-se nível de significância de 5%.

O número de cópias relativo do gene *TSPY* e a proporção de células com gene *SRY* foram calculados a partir do método  $\Delta Ct$  para quantificação relativa, que parte do pressuposto de que todos os genes utilizados no experimento amplificam com a mesma eficiência em cada amostra. O cálculo relativo foi realizado utilizando a fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ , onde o  $\Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{referência}}$ . (PFAFFL, 2001; RAMOS *et al.*, 2010). O gene *GAPDH*, com duas cópias em todos os indivíduos (=2 cópias) foi utilizado como gene referência (=1 cópia); enquanto o gene *SRY*, normalmente presente em cópia única no cromossomo Y, foi utilizado para o cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY*.

## 5.8 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

O aspecto externo da genitália pode ser classificado através de diferentes propostas (DAMIANI, 2001). Dentre as mais utilizadas, está a escala de Prader (1954), que classifica o aspecto da genitália externa dos pacientes com Hiperplasia Adrenal Congênita de acordo com o grau de virilização sofrido: do mais leve (Prader I) até o mais virilizado (Prader V).

Ahmed; Khwaja; Hughes (2000) propõem um sistema de pontuação especialmente criado para avaliar quantitativamente o grau de subvirilização da genitália externa – escore de masculinização externa (EMS, do inglês, external masculinization score; faixa 0-12); e das estruturas reprodutivas internas – escore de masculinização interna (IMS, do inglês, internal masculinization score; intervalo 0-10), vide Anexo II. Esses autores propõem ainda uma sistematização para os padrões de diferenciação gonadal de pacientes com mosaïcismo 45,X/46,XY: testículos normais, túbulos testiculares disgenéticos; gônada em fita, com estruturas semelhantes a túbulos seminíferos disgenéticos; e estroma ovário-like, sem folículos ovarianos.

Para fins de categorização do fenótipo genital, adotou-se a subclassificação proposta por Cools *et al* (2011), que agrupa os achados genitais em: subvirilização mínima ou imperceptível ( $EMS \geq 7$ ); ambiguidade franca ( $EMS < 7$ ); e feminina (fenótipo Turner). Os achados anatomopatológicos foram categoriados em gônadas concordantes ou discordantes entre si, estas características da Disgenesia Gonadal Mista.

Para fins de análise, as variáveis a seguir foram categorizadas em:

- a) *nTSPY*: até 55 cópias; maior que 55 cópias<sup>4</sup>;
- b) %Y: até 50%; maior que 50%;
- c) peso ao nascer: menor que 2500 g; maior ou igual a 2500 g<sup>5</sup>;
- d) comprimento ao nascer: menor que 45 cm; maior ou igual a 45 cm<sup>6</sup>;
- e) idade: blocos de múltiplos de cinco anos, como proposto pela estratificação etária do IBGE<sup>7</sup>;
- f) idade materna: até 40 anos ou maior<sup>8</sup>;
- g) idade paterna: até 40 anos ou maior<sup>9</sup>;
- h) desenvolvimento neuropsicomotor: normal; atraso motor; atraso de linguagem;
- i) fenótipo genital: subviriliação leve a imperceptível; ambiguidade genital; fenótipo Turner;
- j) estruturas da genitália interna: masculinizada; ambígua; feminina<sup>10</sup>;
- k) estatura final média: menor que 1,67 m; a partir de 1,67 m<sup>11</sup>;
- l) estatura final média para a síndrome de Turner: menor que 1,42 m; a partir de 142 cm)<sup>12</sup>;
- m) estatura final para sexo social feminino: menor que 1,52 m; a partir de 1,52 m);
- n) estatura para sexo social masculino: menor que 1,63 m; a partir de 1,63 m).

As seguintes variáveis dicotômicas foram classificadas quanto à sua presença ou ausência: detecção de anomalias cardíacas; detecção de anomalias renais; gonadectomia; detecção de gonadoblastoma; detecção de outros tumores gonadais. O sexo social adotado foi feminino ou masculino. A característica “cor” autodeclarada no momento da abertura do

<sup>4</sup> Shen et al. (2013) encontraram maior chance de falha espermatogênica em homens com mais de 55 cópias relativamente.

<sup>5</sup> Recém-nascidos a termo com peso inferior a 2500g são considerados pequenos para a idade gestacional.

<sup>6</sup> Comprimento normal ao nascer de 45 a 55cm.

<sup>7</sup> IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) - Pesquisa de Orçamentos Familiares.

<sup>8</sup> HAGMAN, Anna et al. Women who gave birth to girls with Turner syndrome: maternal and neonatal characteristics. **Human reproduction**, v. 25, n. 6, p. 1553-1560, 2010.

<sup>9</sup> WYROBEK, Andrew J. et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 25, p. 9601-9606, 2006.

<sup>10</sup> Subviriliação leve a imperceptível (EMS  $\geq$  7); ambiguidade genital (EMS  $<$  7); fenótipo Turner, conforme proposto por Cools (2011).

<sup>11</sup> Estimativas populacionais das medianas de altura e peso de adultos, por sexo – Brasil. Mediana de estatura masculina: 1,73 m (1,63 a 1,83 m). Mediana da estatura feminina 1,61 m (1,52 a 1,70 m); Média das medianas da estatura de ambos os sexos: 1,67 m. Fonte: IBGE - Pesquisa de Orçamentos Familiares. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/2645>>

<sup>12</sup> ROCHICCIOLI P. et al. Study of final height in Turner’s syndrome: ethnic and genetic influences. **Acta Paediatr.** 1994;83(3):305-8.

prontuário hospitalar permitiu respostas tais como branco, negro e mulato. O tempo de uso do rec-hGH foi expressso em número de semanas.

## 5.9 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os dados foram registrados no software SPSS v25 (*Statistical Package for Social Sciences*, IBM Corporation) para Windows v10, e analisados por meio de estatística descritiva e inferencial bivariada.

Para os procedimentos descritivos, foram apresentados os dados brutos e ponderados (frequências e porcentagens) e medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade [desvio-padrão (DP) e valores mínimos e máximos].

Os procedimentos de inferência estatística, por sua vez, foram realizados por meio do teste de Mann-Whitney, que identifica diferenças de distribuição de dados entre dois grupos; e pelo test- t de amostras independentes, que compara a diferença entre a média dos grupos, de acordo com a variância assumida pelo teste de Levene. Gráficos do tipo diagrama de caixa foram gerados para ilustrar a diferença entre grupos. Utilizou-se o teste exato de Fisher para identificar distribuições de variáveis categóricas em tabelas de referência cruzada; e o cálculo do coeficiente  $\rho$  de Spearman para avaliar a correlação entre variáveis contínuas e para avaliar o percentual de concordância para respostas equivalentes. A distribuição dos dados das variáveis contínuas foi apresentada em gráficos de dispersão. A estatura e o tempo de uso do rec-hGH de pacientes menores de idade, que não tinham atingido a estatura final durante o período de coleta dos dados, não foram consideradas para fins de análise estatística inferencial. Para a interpretação das informações, adotou-se intervalo de confiança de 95%, e nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

## 6 RESULTADOS

Para o levantamento de pacientes, consultaram-se as hipóteses diagnósticas de mais de 13.000 registros familiares do serviço de Genética Médica do HCRP, e também em 9.395 resultados de cariótipo armazenados no banco de dados do Laboratório de Citogenética do HCRP.

Identificaram-se 34 indivíduos com linhagens 45,X/46,XY em sangue, dois dos quais excluídos do grupo de participantes, dada a coexistência de linhagem XX, e sete excluídos por baixo mosaico. Foram ainda identificados mais 18 casos de suspeição, por detecção de linhagem 45,X e de outra, em nove dos quais se confirmou a presença do cromossomo Y à pesquisa por PCR convencional e quantitativa. Somando-se os 25 pacientes incluídos a partir do estudo citogenético, com os nove identificados pela complementação com PCR, os dados de 34 pacientes foram considerados na etapa de revisão de prontuários.

Nos dias de consultas médicas regulares, os pacientes sem material biológico armazenado no Laboratório de Epigenética e Reprodução foram convidados a participar da etapa de caracterização molecular. A avaliação do cromossomo Y por PCR faz parte do protocolo de investigação dos mosaicismos 45,X/46,XY no serviço de Genética Médica do HCMRP.

O grupo controle foi composto por 95 homens brasileiros, residentes em Ribeirão Preto, participantes do estudo de Cruz (2018).

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

A média de idade dos 34 participantes foi de 34 anos (DP=15,3) no momento da coleta de dados dos prontuários, variando de 1 a 67 anos. Não houve relato de óbito entre os participantes entre o momento do diagnóstico citogenético e a coleta dos dados; 41,2% destes foram atendidos neste hospital há mais de dois anos.

A maioria se autodeclarou de cor de pele branca (85,3%) e de sexo social feminino (55,9%). Os participantes foram provenientes da cidade de Ribeirão Preto e suas redondezas, cidade-sede do estudo, como apresentado na Figura 4 abaixo.



ambas as idades (N=19) está representada na Tabela 5; Apêndice. A faixa etária de coleta de ambos os exames se relacionaram positiva e fortemente ( $\rho=0,874$ ;  $p<0,001$ , teste exato).

Dados relativos à antropometria neonatal estavam disponíveis para 13 dos pacientes, com comprimento ao nascer mediano de 47 cm, variando de 32 cm a 50 cm; e peso ao nascer mediano de 2925g, variando de 1045 g a 3430g. Peso e comprimento ao nascer não foram corrigidos segundo a idade gestacional, devido à disponibilidade limitada dessa informação, para que se pudesse calcular a sua adequação.

Dos 34 indivíduos estudados, nove usaram hormônio do crescimento recombinante humano, com idade de início mediano de 14 anos, variando dos 6 aos 19 anos. Dentre os pacientes que adotaram sexo social feminino, a estatura final mediana foi de 1,44 m, variando de 1,35 a 1,64 m; enquanto, para o sexo social masculino, a mediana foi de 1,56 m, variando de 1,40 a 1,70 m. A diferença entre média das idades dos pacientes agrupados por sexo de criação foi estatisticamente significativa ( $p<0,01$ , teste t, teste de Levene), vide Figura 5.

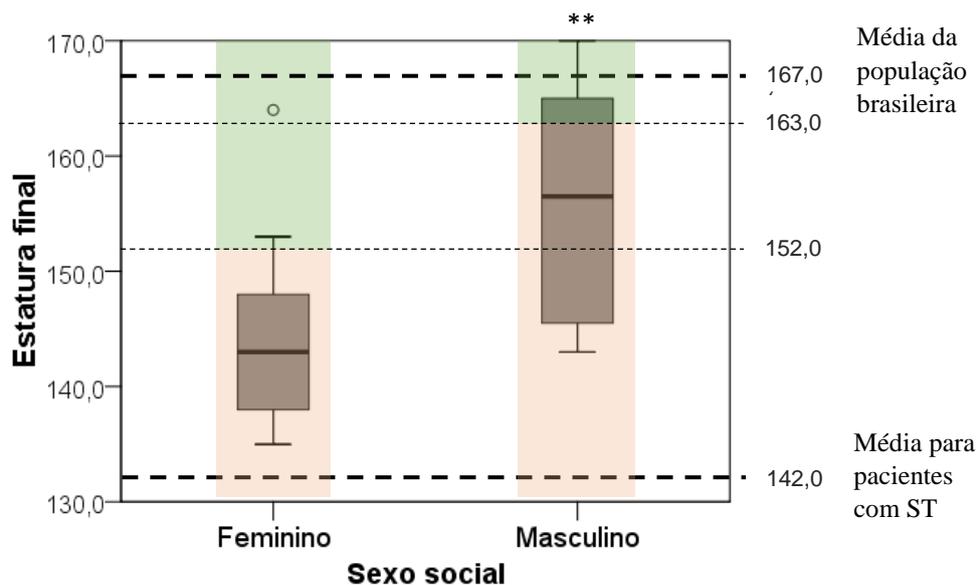
A distribuição das variáveis contínuas, sendo “n” o número de pacientes para os quais o dado estava disponível, com respectivos valores mínimo, máximo e médio, bem como desvios-padrão da média para a categoria, está apresentada na Tabela 3.

Na Tabela 4, está apresentada a distribuição dos pacientes de acordo com a categorização das seguintes características clínicas: idade materna, paterna, peso e comprimento ao nascer; detecção de malformação cardíaca, renal ou genital; fenótipo genital; estruturas da genitália interna, realização de gonadectomia; concordância da histologia gonadal; detecção de gonadoblastoma; e dados relacionados à estatura. Informações relativas à posição ao nascer estavam disponíveis em 12,5% dos registros (n=4; nascimentos cefálicos).

A diferença entre as médias das idades paterna e materna dos pacientes ao nascimento, de seus respectivos pesos e comprimentos ao nascer, e a média da estatura final destes; de acordo com o percentual de células da linhagem 45,X identificadas ao estudo citogenético não foi estatisticamente significativa.

As cardiopatias foram relatadas em 31,3% (n=5) dos 16 indivíduos que realizaram ecocardiografia, os quais foram diagnosticados com alterações cardiovasculares: valva aórtica bicúspide (n=3); insuficiência de valva aórtica (n=2); dilatação atrial (n=2); dilatação ventricular (n=1); comunicação interatrial tipo *ostium secundum* (n=1). Malformações renais foram detectadas em 21,1% dos 19 indivíduos que realizaram ultrassonografia de abdome: rins em ferradura (n=2), duplicação do sistema coletor renal (n=1) e persistência do úraco (n=1).

Figura 5 – Diagrama de caixas com a distribuição da estatura final dos pacientes com mosaïcismo 45,X/46,XY, segundo sexo social. Destaque para a estatura média das pacientes com síndrome de Turner (142 cm)<sup>1</sup>, e da população brasileira (167 cm)<sup>2</sup>. A área rosada delimita os pacientes com baixa estatura; e a área em verde claro discrimina os que estão dentro da normalidade para o sexo social, ambos discriminados por sexo social. A diferença entre média das idades dos pacientes agrupados por sexo de criação foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ , teste-t para igualdade de médias; teste de Levene para variâncias). Dos 22 pacientes cuja estatura final foi registrada, 60% receberam tratamento com rec-hGH.



Legenda: rhGH: hormônio do crescimento recombinante humano; ST: síndrome de Turner.

Fonte: <sup>1</sup> Média das medianas da estatura de ambos os sexos: 1,67 m. IBGE - Pesquisa de Orçamentos Familiares. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/2645>>; <sup>2</sup> ROCHICCIOLI P. et al. Study of final height in Turner's syndrome: ethnic and genetic influences. *Acta Paediatr.* 1994;83(3):305-8.

Os marcos do desenvolvimento neuropsicomotor foram registrados no prontuário de 16 dos pacientes, dentre os quais 25% (n=4) com relato de atraso motor ou de linguagem. Enquanto achados adicionais, registraram-se: vitiligo (n=1); hipotireoidismo (n=1); doenças neuropsiquiátricas em 14,7 (n=5), distribuídas entre crises convulsivas não febris (n=2); transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (n=1), e transtorno depressivo (n=1). Nove pacientes, 26,5% dos pacientes, queixaram-se de infertilidade conjugal durante o atendimento médico.

Tabela 3 – Distribuição das variáveis contínuas de pacientes 45,X/46,XY, segundo registro em prontuário hospitalar de centro de referência em distúrbios do desenvolvimento sexual; e de grupo controle composto por homens residentes em Ribeirão Preto-SP.

	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	DP	
<b>Pacientes 45,X/46,XY</b>	<i>Caracterização etária</i>						
	Idade à coleta dos dados	34	34	34	1	67	15,3
	Idade à coleta do cariotipo	24	14	14	0	45	11,3
	Idade à extração do DNA	25	21	16	0	62	14,6
	Idade à análise gonadal	14	13	12	0	33	9,8
	Metáfases analisadas	30	93	100	22	200	30,6
	<i>Dados perinatais</i>						
	Idade materna ao nascimento	13	30	31	14	47	9,3
	Idade paterna ao nascimento	11	32	32	22	51	7,9
	Peso ao nascer	15	2780	2902	1045	3430	574,8
	Comprimento ao nascer	14	46	47	32	50	4,4
	<i>Dados relacionados à estatura</i>						
	Idade ao início do rec-hGH	10	13	14	6	19	4,4
	Tempo de rec-hGH (sem)	7	48	28	4	118	45,2
	Estatura final geral	22	148,4	147,0	135,0	170,0	10,4
	Estatura final (sexo de criação feminino)	13	144,5	144,0	135,0	164,0	8,2
	Estatura final (sexo de criação masculino)	9	154,1	156,0	140,0	170,0	11,1
	Estatura-alvo ajustado para sexo de criação	5	158,2	157,0	148,0	170,8	9,0
	Células de linhagem 45,X (%)	30	43%	40%	3%	92%	31%
	<i>Idade à coleta e extração do DNA</i>						
Percentual relativo do gene <i>SRY</i>	19	71%	64%	6%	253%	61%	
Número relativo de cópias <i>TSPY</i>	19	28	26	17	58	10	
<b>Grupo controle</b>	Idade à coleta dos dados e DNA	95	23	22	17	45	4
	Número relativo de cópias <i>TSPY</i>	95	44	41	22	84	12

Legenda: rec-hGH: hormônio do crescimento humano recombinante; sem: tempo de uso em semanas; 45,X(%): percentual de células da linhagem 45,X em cariótipo de sangue periférico; %*SRY*: percentual relativo de cópias do gene *SRY*, em relação ao gene *GAPDH*; n*TSPY*: cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY*, em relação ao gene *SRY*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Distribuição absoluta (e), percentual (e%) e relativa ao número amostral (n=34) de características clínicas de pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY, segundo prontuário médico.

<b>Variáveis categóricas</b>	<b>e</b>	<b>e %</b>	<b>e/n %</b>
<b>Idade materna ao nascer</b>			
Até 40 anos	12	92,3%	35,3%
> 40 anos	1	7,7%	2,9%
<b>Idade paterna ao nascer</b>			
Até 40 anos	10	90,9%	29,4%
> 40 anos	1	9,1%	2,9%
<b>Peso ao nascer</b>			
≥ 2500g	4	25,0%	11,8%
< 2500g	12	75,0%	35,3%
<b>Comprimento ao nascer</b>			
≥ 45cm	4	26,7%	11,8%
< 45cm	11	73,3%	32,4%
<b>Anomalia cardíac</b>			
Ausente	11	68,8%	32,4%
Presente	5	31,3%	14,7%
<b>Anomalia renal</b>			
Ausente	15	78,9%	44,1%
Presente	4	21,1%	11,8%
<b>Fenótipo genital</b>			
Masculinizado	8	30,8%	23,5%
Ambíguo	8	30,8%	23,5%
Feminino (Turner)	10	38,5%	29,4%
<b>Histologia gonadal</b>			
Não realizada	13	43,3%	38,2%
Realizada	17	56,7%	50%

Legenda: † Estaturas abaixo do percentil 3 para a população brasileira, de acordo com o sexo social adotado; rec-hGH: hormônio do crescimento recombinante humano.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os 26 pacientes cuja descrição da genitália externa constava no prontuário, observou-se ambiguidade franca em 34,6% (n=9) destes. Dos 14 indivíduos dos quais dispúnhamos dos achados à ultrassonografia ou ressonância magnética de pelve, estes foram sugestivos de derivados müllerianos em 64,3% (n=9); e de derivados wolfianos em 14,3% (n=2); e 21,4% (n=3) apresentaram anomalias de genitália interna ao exame de imagem.

Metade dos pacientes (n=17) foram submetidos à análise histológica gonadal, 82,4% (n=13) destes por gonadectomia, e 17,6% (n=3) por biópsia gonadal. Destes pacientes, 42,9% (n=6) apresentaram mais de um padrão histológico gonadal, dentre os seguintes: testículos normais, túbulos testiculares disgenéticos; gônada em fita, com estruturas semelhantes a túbulos seminíferos disgenéticos; e estroma ovário-*like*, sem folículos ovarianos.

Detectou-se gonadoblastoma em 14,3% (n=2) destes pacientes, um dos quais com seminoma coexistente. A relação entre o fenótipo da genitália, os achados da genitália interna e a caracterização desses pacientes quanto ao sexo social e o antecedente de gonadectomia estão apresentados na Tabela 5. Pacientes com fenótipo genital predominante virilizado (EMS>7) não foram submetidos à gonadectomia, e essa relação foi estatisticamente significativa ( $\rho=-0,70$ ;  $p<0,01$ ).

A idade média à gonadectomia foi de 13 anos (mediana de 12, variando de 0 aos 33 anos). A idade mediana à gonadectomia para os indivíduos com fenótipo genital subvirilizado (EMS<7) foi de 2 anos de idade (DP=14), e de 16 anos naqueles com fenótipo genital feminino (DP=7). A distribuição das idades dos pacientes que dispunham de ambas as informações, isto é, idade de coleta do cariótipo e da gonadectomia, relacionaram-se positiva e fortemente entre si, conforme apresentado na Figura 6 ( $\rho=0,99$ ,  $p<0,01$ ).

O EMS se relacionou positiva e fortemente à categorização da genitália quanto à virilização de qualquer grau ou completa (respectivamente,  $\rho=-0,90$  e  $\rho'=-0,82$ ; ambos  $p<0,01$ ; correlação de Spearman, teste exato), e se relacionou positiva e fortemente com o escore de masculinização da genitália interna IMS ( $\rho=0,85$ ;  $p<0,01$ ). Maior EMS se relacionou também positiva e fortemente com o sexo de criação masculino ( $\rho=0,80$ ;  $p<0,01$ ); enquanto menor EMS se relacionou moderadamente com a maior ocorrência de gonadectomia ( $\rho=-0,63$ ;  $p<0,01$ ).

Houve diferença significativa entre a distribuição da idade de coleta do cariótipo e a categoria do fenótipo genital ( $p=0,019$ ; teste de Mann-Whitney). A distribuição das idades dos pacientes submetidos à gonadectomia, comparando-se os que tinham a genitália virilizada e os com fenótipo genital feminino, foram semelhantes ( $p=0,171$ ; teste de Mann-Whitney).

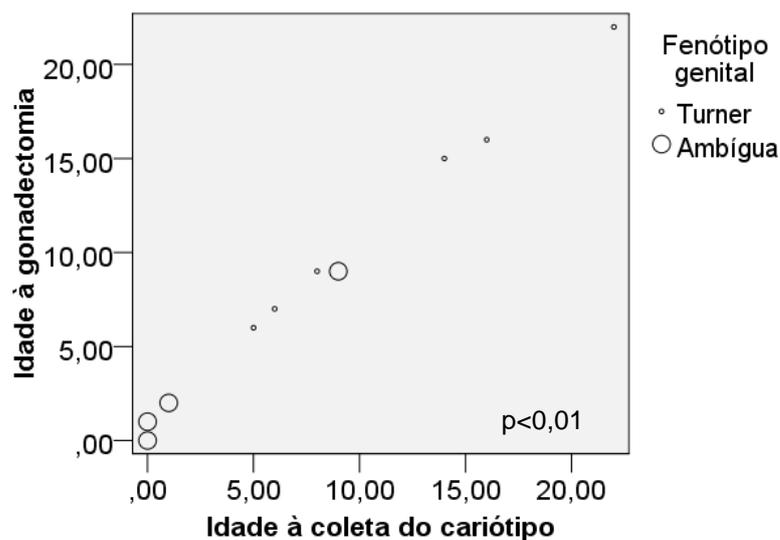
Tabela 5 – Visão global do fenótipo da genitália de pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY em relação à avaliação histopatológica gonadal e ao sexo de criação, segundo registro em prontuário hospitalar em centro de referência em Distúrbios do Desenvolvimento Sexual.

	Fenótipo feminino (EMS 0; Turner)		Ambiguidade franca (EMS 1-6)		Subviriliação mínima (EMS ≥ 7)		p
	F	%	f'	%	f''	%	
	<b>Sexo de criação</b>						
Feminino	10	38,5%	6	23,1%	-	-	$\rho$ 0,80
Masculino	-	-	3	11,5%	7	26,9%	$p < 0,01$
<b>Gonadectomia</b>							
Não	2	8,3%	2	8,3%	7	29,2%	$\rho$ -0,63
Sim	8	33,3%	5	20,8%	-	-	$p < 0,01$
<b>Genitália interna</b>							
Feminina (IMS 0)	4	28,6%	-	-	-	-	$\rho$ 0,85
Ambígua (IMS 1-7)	2	14,3%	3	21,4%	-	-	$p < 0,01$
Masculinizada (IMS >7)	-	-	2	14,3%	3	21,4%	

Legenda: EMS=escore de masculinização externa (do inglês, *external masculinization score*; faixa 1-12, categorização proposta por Cools, 2011). p: nível de significância (teste exato de Fisher).

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 6 – Correlação entre a idade à coleta do cariótipo em função da idade à gonadectomia, segundo o fenótipo genital ambíguo ou feminino ( $\rho=0,99$ ,  $p < 0,01$ ).



Legenda: no eixo x, a idade à coleta do cariótipo; no eixo y, a idade à gonadectomia; p: nível de significância (coeficiente  $\rho$  de Spearman; teste exato).

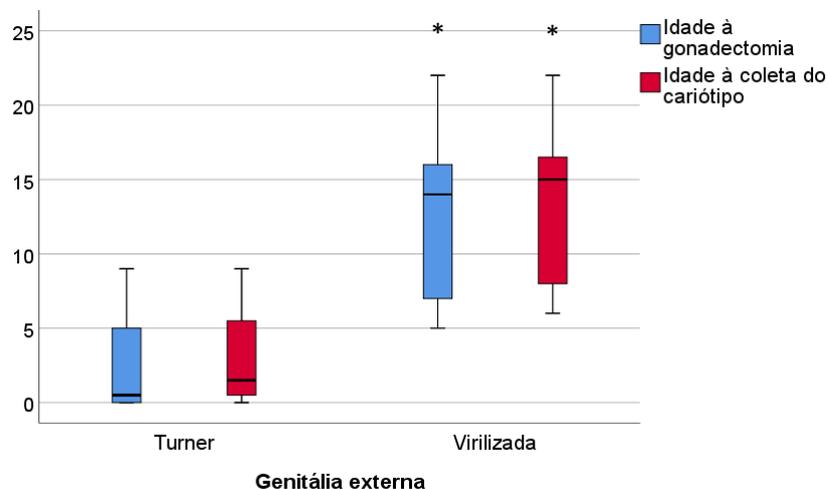
Fonte: elaborado pelo autor.

A idade mediana à coleta do cariótipo dos indivíduos submetidos à gonadectomia foi de 9 anos (DP=7), enquanto a dos que não foram submetidos ao procedimento foi de 24 anos (DP=15). A diferença entre a idade média da coleta do cariótipo de pacientes submetidos à gonadectomia, em relação aos não submetidos, não foi estatisticamente significativa ( $p=0,08$ , teste t para igualdade de médias; variâncias iguais não assumidas pelo teste de Levene).

Quando comparados apenas indivíduos em cujo prontuário constava tanto a idade de coleta do cariótipo, quanto a da realização da gonadectomia, ambas se relacionaram positivamente com o fenótipo genital, se feminino ou ambíguo (respectivamente,  $\rho=0,69$ ,  $p=0,02$ ; e  $\rho=0,66$ ,  $p=0,03$ ). Ambas as distribuições etárias e respectivas correlações por fenótipo genital estão representadas na Figura 7.

A idade à coleta do cariótipo se relacionou à de coleta da amostra de DNA ( $\rho=0,84$ ;  $p<0,01$ ). Ambas as idades de coleta se relacionaram com a idade à gonadectomia ou à biópsia gonadal (respectivamente,  $\rho=0,99$ ,  $p<0,01$ ; e  $\rho=0,80$ ;  $p<0,01$ ), e à idade de início do hormônio do crescimento recombinante humano (respectivamente,  $\rho=0,84$ ,  $p<0,01$ ; e  $\rho=0,89$ ,  $p<0,01$ ). A idade à coleta do cariótipo se correlacionou com a estatura final dos indivíduos de sexo social masculino ( $\rho=0,99$ ,  $p<0,01$ ).

Figura 7 – Distribuição da idade à gonadectomia de indivíduos 45,X/46,XY, e à coleta do cariótipo destes, em função da virilização da genitália externa (respectivamente,  $p=0,04$ ; e  $p'=0,02$ , teste Mann-Whitney). Ambas as idades se relacionaram positivamente com o fenótipo genital ( $\rho=0,69$ ,  $p=0,03$ ; e  $\rho'=0,66$ ,  $p'=0,04$ ; correlação de Spearman, teste exato de Fisher).



Legenda: no eixo x, a idade à coleta do cariótipo; no eixo y, a idade à gonadectomia; p: nível de significância  $< 0,05$  (\*);  $\rho$ : coeficiente  $\rho$  de Spearman.

Fonte: elaborado pelo autor.

## 6.2 AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR

De 34 pacientes que atenderam aos critérios de amostragem, havia DNA disponível para estudo de 20. Devido à deleção do segmento genômico onde está mapeado o gene *SRY*; foi possível o cálculo relativo do n *TSPY* de 20 dos participantes. Havia imagens de metáfases disponíveis de 31 dos pacientes, dez dos quais com alterações numéricas e estruturais observadas à análise citogenética; e 21 com alterações numéricas em mosaico apenas. A mediana de metáfases analisadas foi de 100 por cariótipo (DP=31); vide Tabela 3.

O percentual de células da linhagem 45,X variou de 8% a 97%, dentre os 30 pacientes dos quais se dispunha dessa informação. O percentual de células da linhagem 45,X se relacionou positivamente com o sexo de criação feminino ( $\rho$  0,42;  $p=0,05$ ). Pacientes com mais da metade das células pertencentes à linhagem 45,X se relacionaram positivamente com o fenótipo genital feminino da síndrome de Turner ( $\rho$  0,48;  $p=0,02$ ); negativamente com a virilização da genitália externa ( $\rho$  -0,48;  $p=0,05$ ) e interna ( $\rho$  -0,56;  $p<0,05$ ).

A idade mediana à coleta do DNA dos pacientes foi de 16 anos (DP=15,  $n=19$ ); enquanto a mediana das idades dos homens do grupo controle foi de 22 anos (DP=4;  $n=95$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a idade média à coleta desse exame entre ambos os grupos ( $p=0,17$ , teste t-student; variâncias iguais não assumidas pelo teste de Levene); nem entre a mediana de ambos os grupos ( $p=0,82$ ; teste de mediana de amostras independentes). A distribuição das idades à coleta do DNA entre esses pacientes e o grupo controle foi diferente entre si ( $p=0,04$ , teste de Mann-Whitney); Tabela 3.

A distribuição da faixa etária dos pacientes em função do percentual de células da linhagem 45,X, à coleta do cariótipo; e do percentual de presença do gene *SRY* e do número de cópias do gene *TSPY*, à coleta do DNA, estão apresentadas na Tabela 9 (Anexo). A faixa etária dos pacientes à coleta dos respectivos exames não se relacionou às categorias de %*SRY* nem de n*TSPY* (teste de correlação de Spearman).

A fluorescência das reações de PCR para as sequências de *TSPY*, *SRY* e *DAZ*, e respectivos genes de referência, obtidas a partir de gel de agarose, está apresentada na sessão Apêndice (Figuras 12, 13 e 14). A idade ao diagnóstico; o resultado do cariótipo de sangue; o resultado da pesquisa dos genes *SRY*, *TSPY* e *DAZ*; e os achados histológicos dos pacientes estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Idade ao diagnóstico; cariótipo; análise do DNA para os genes *SRY*, *TSPY* e *DAZ*; e achados histopatológicos de pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY.

Caso	Idade	Cariótipo	Sequências Y			Achados histológicos gonadais / genitais internos
			<i>SRY</i>	<i>TSPY</i>	<i>DAZ</i>	
I	45	45,X[03]/46,XY[97]	.	.	.	-
II	0	45,X,+ace[2]/45,X[3]/46,XY[95]	+	+	+	Gonada esquerda disgenética em fita, com trompa; testículo direito disgenético com células de Sertoli e epidídimo
III	11	45,X[03]/46,XY[97]	+	+	+	-
IV	13	46,X,+mar[96]/45,X[4]	.	.	.	-
V	28	45,X[5]/46,XY[80],del(Y)(q)	+	-	+	-
VI	.	45,X[11]/46,XY[89]	.	.	.	Biópsia: aplasia de células germinativas (Sertoli cell-only syndrome)
VII	.	46,X,+mar[87]/45,X[13]	.	.	.	
VIII	34	47,X,+2mar[42]/45,X[8]	+	-	+	Biópsia: aplasia de células germinativas (Sertoli cell-only syndrome)
IX	.	46,X,mar[83]/45,X[17]	.	.	.	
X	1	45,X[76]/46,XY[124]	+	+	+	Gônadas em fita; tuba uterina; útero imaturo
XI	5	45,X[28]/46,XY[72]	+	+	+	Testículo disgenético à direita, com gonadoblastoma; gônada em fita à esquerda, com estroma ovário-like, sem folículos ovarianos.

continua

Caso	Idade	Cariótipo	Sequências Y			Achados histológicos gonadais / genitais internos
			<i>SRY</i>	<i>TSPY</i>	<i>DAZ</i>	
XII	13	45,X[28]/46,XY[72],dup(Y)(q)	.	.	.	
XIII	6	45,X[35]/46,XY[65]	+	+	+	Gonadas disgenéticas, com estroma ovário-like, sem folículos; Tubas normais com resquícios mesonéfricos (epidídimo e córtex adrenal ectópicos)
XIV	22	45,X[39]/46,XY[61]	.	.	.	Gônadas em fita, com estroma ovário-like, sem folículos ovarianos; trompas uterinas normais.
XV	0	45,X[41]/46,XY[59]	+	+	+	-
XVI	24	45,X[28]/46,XY[22]	.	.	.	-
XVII	30	45,X[38]/47,XY+mar[1]/46,XY[61]	+	+	+	-
XVIII	.	45,X[67]/46,XY[33]	.	.	.	-
XIX	14	45,X[16]/46,XY[6]	.	.	.	Gônadas em fita, com estroma ovário-like, sem folículos ovarianos; trompas uterinas normais.
XX	16	45,X[39]/46,XY[11]	.	.	.	-
XXI	43	45,X[79]/46,XY[21]	+	+	+	Testículo esquerdo com túbulos com seminoma (provavelmente derivado de gonadoblastoma); gonada direita em fita útero hipoplásico com focos de tecido prostático e microcalcificações; tubas tuterinas congestionadas com cisto paramesonéfrico à esquerda; epidídimos com alguns cistos pequenos
XXII	33	45,X[160]/46,XY[40]	+	-	+	Biópsia: aplasia de células germinativas (Sertoli cell-onl syndrome)
XXIII	8	45,X[90]/46,XY[10]	-	+	+	Gônadas em fita

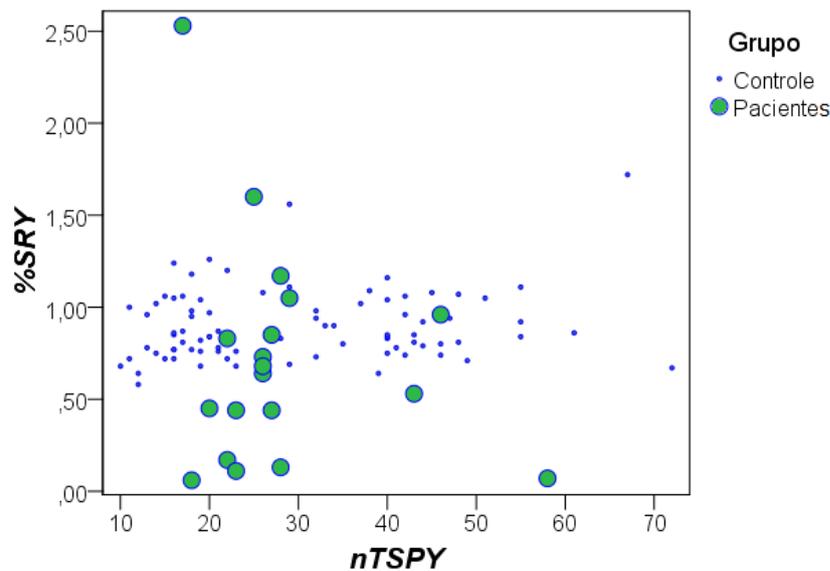
Caso	Idade	Cariótipo	Sequências Y			Achados histológicos gonadais / genitais internos
			<i>SRY</i>	<i>TSPY</i>	<i>DAZ</i>	
XXIV	14	45,X[90]/46,XY[10]	.	.	.	Gônadas em fita, com estroma ovário-like, sem folículos ovarianos; trompas uterinas normais.
XXV	62	45,X[91]/46,X,del(X)(q21)[9]	+	+	+	-
XXVI	16	45,X[92]/46,XY[8]	+	+	+	Gônadas disgenéticas ao lado de tubas uterinas; epidídimos e ductos deferentes sem alterações
XXVII	20	45,X /46,X,r(Y)/47,X,r(Y),r(Y)	.	.	.	-
XXVIII	15	45,X[55]/46,X,del(Y)(qter?)[45]	+	+	+	-
XXIX	9	45,X/46,XY	+	+	+	-
XXX	0	45,X/46,XY	+	+	+	Testículo direito e epididimo prepuberais; gonada esquerda disgenética com restos de cordões sexuais indiferenciados em região cortical e restos mesonéfricos em região medular
XXXI	14	45,X/46,XY	.	.	.	-
XXXII	28	45,X, 15ps+?[14]/46,XY,(Y)(qh-?), 15ps+?[86]	+	-	+	-
XXXIII	16	45,X[45]/46,XY[55]	+	+	+	-
XXXIV	0	45,X[14]/46,XY[16]	+	+	+	-

Fonte: elaborado pelo autor.

Dos 19 pacientes cuja pesquisa do cromossomo Y por qPCR foi realizada, o cálculo relativo médio do %*SRY*, em relação ao controle endógeno *GAPDH*, foi de 71%, variando de 6% a 253% (DP 0,61). Pelo menos 42,1% dos pacientes apresentaram %*SRY* menor que 50%. O grupo de pacientes se relacionou com menores %*SRY*, tanto quando analisado contínua quanto categoricamente ( $p < 0,01$ ; teste exato de Fisher).

O número médio de cópias do gene *TSPY* dos pacientes foi de 28 cópias, variando de 17 a 58 (DP 10); enquanto o do grupo controle foi de 31 cópias (DP=14,7). Não houve diferença significativa entre o *nTSPY* de pacientes e controles ( $p=0,16$ ; teste exato de Fisher). Não houve diferença na distribuição do *nTSPY* entre pacientes e controles ( $p=0,99$ , teste de Mann-Whitney), nem entre a mediana do valor calculado para ambos os grupos ( $p=0,17$ , teste de mediana de amostras independentes). A diferença entre ambas as médias não foi estatisticamente significativa ( $p=0,38$ ; teste t para variâncias iguais não assumidas). Não houve diferença na distribuição relação entre *nTSPY* médio do grupo de pacientes 45,X/46,XY em relação ao grupo controle. Ambos os valores foram calculados em relação ao gene de referência *GAPDH*.

Figura 8 – Distribuição do percentual do gene *SRY* por célula em relação ao cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY* de pacientes 45,X/46,XY e do grupo controle ( $p=0,38$ ). Valores calculados em relação ao gene de referência *GAPDH*.



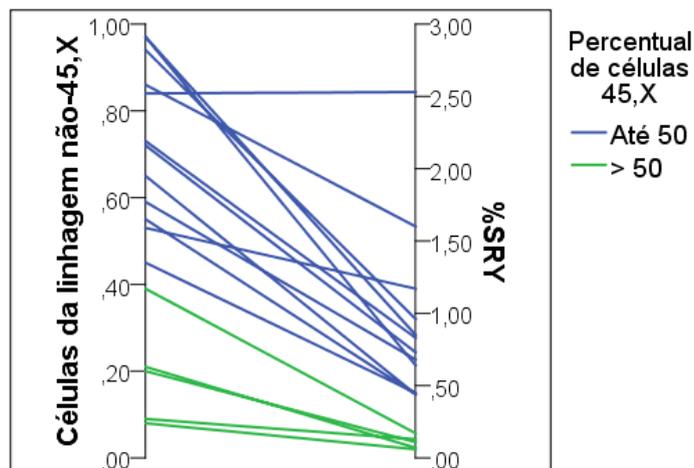
Legenda: %*SRY*: Percentual relativo da presença do gene *SRY*.

Fonte: elaborado pelo autor.

A distribuição categórica dos pacientes, segundo o percentual de monossomia do cromossomo X detectada ao estudo citogenético em sangue, está representada da Tabela 9 (Anexo). Houve diferença significativa entre a média do %*SRY* entre os pacientes com até 50% e com > 50% de células da linhagem 45,X. Essa razão se relacionou inversamente à proporção de detecção do gene *SRY* ( $\rho -0,78$ ;  $p<0,01$ ), conforme apresentado na Figura 9.

Não houve correlação estatisticamente significativa entre as variáveis clínicas categóricas estudadas e a presença relativa do gene *SRY*; nem entre estas variáveis clínicas categóricas e o número relativo de cópias do gene *TSPY*.

Figura 9 – Correlação entre a razão de células de linhagem celular 46,XY e suas variantes, em relação à razão calculada da presença do gene *SRY* ( $\rho 0,78$ ;  $p<0,01$ ). Em verde, destaque para pacientes que apresentaram mais de 50% das células da linhagem 45,X; e, em azul, os que apresentaram até 50% dessa linhagem, ao estudo citogenético de sangue periférico.



Legenda: %*SRY*: Percentual relativo da presença do gene *SRY*.

Fonte: elaborado pelo autor.

## 7. DISCUSSÃO

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As manifestações clínicas do mosaicismo 45,X/46,XY variam da virilização completa ao fenótipo de ST; e cuja suspeição e confirmação podem ocorrer desde o período neonatal à vida adulta, ou até permanecer despercebido (LEE, 2006).

Durante a gestação, pode-se suspeitar da ocorrência desta aneuploidia na vigência de alterações compatíveis com a síndrome de Turner, como restrição de crescimento fetal, higroma cístico e presença cardiopatia, estando indicado o estudo citogenético do líquido amniótico e cariótipo de sangue periférico do recém-nascido.

Ao nascimento, a suspeição se relaciona à detecção de criptorquidia com ou sem hipospádia, ambiguidade genital, ou na presença de características clínicas da Síndrome de Turner, como recém-nascido pequeno para a idade gestacional, com linfedema, pescoço curto e alado e fácies típica. Durante a infância e adolescência, podem se evidenciar a baixa estatura, o atraso no aparecimento dos caracteres sexuais secundários e a amenorreia primária.

Na vida adulta, o diagnóstico pode ser incidental ou mesmo motivado pela investigação de infertilidade conjugal (LEE, 2006; WOLFFENBUTTEL et al., 2016). Um indivíduo com aparência masculina, sem anomalia genital grave nem intenção de ter filhos, talvez nunca descubra a infertilidade nem tampouco a investigue, logo pode também ignorar anomalias cardíacas e renais menos graves.

As situações de suspeição, as quais indicam a realização do cariograma, são variadas: ambiguidade genital, recém-nascido pequeno para a idade gestacional, baixa estatura, amenorreia primária, atraso no surgimento de caracteres sexuais secundários e outros estigmas de Síndrome de Turner, infertilidade conjugal por fator masculino. O diagnóstico laboratorial é fundamental para o aconselhamento genético apropriado e decisão reprodutiva (WOLFFENBUTTEL et al., 2016).

Clinicamente, o mosaicismo 45,X/46,XY é muito variável, tanto em expressão quanto em gravidade. A incidência de 1,7/10.000 gestações (1,7‰) proposta por Skakkebaek (2003) foi estimada por estudo citogenético em escala populacional, enquanto que o diagnóstico clínico depende de uma queixa individual.

Devido à raridade da patologia, a maioria dos trabalhos científicos consiste em relatos ou séries de casos (TELVI et al, 1999); ou estudos multicêntricos internacionais (LIUBICIC et al, 2019; CHANG; CLARK, BACHMAN, 1990). A maior série de casos nacional

previamente publicada consistiu de cinco pacientes e revisão de 58 casos da literatura vigente (ROSEMBERG et al, 1987).

Chang, Clark, Bachman (1990) estudaram as características de 92 pacientes, diagnosticados por meio de estudos pre-natais, cujas amostras foram provenientes de 730 laboratórios de citogenética consultados. Em 1990, Telvi et al publicaram uma série de 27 casos, na qual não houve relação entre a proporção de linhagens 45,X/46,XY em sangue/fibroblastos e fenótipo genital.

O levantamento de prontuários do presente centro de referência em DDS, desde o ano de 1973, permitiu-nos uma casuística de 34 pacientes, e cálculos de estatística inferencial. As estruturas da genitália interna se relacionaram estatisticamente à proporção de células da linhagem 45,X. Ainda que esta relação não tenha sido significativa para o fenótipo genital, alcançou um nível de significância limítrofe entre os pacientes estudados.

Ainda que predominantemente provenientes de uma cidade metropolitana e de seus arredores, muitos pacientes foram referenciados tardiamente ao serviço especializado. O retardo no início do seguimento pode prejudicar a abordagem multiprofissional para orientação do sexo de criação, nos casos de ambiguidade genital; além do rastreio de doenças e dos tratamentos clínicos, como o rec-hGH, e cirúrgicos.

O mosaicismo 45,X/46,XY, ainda que raro, é a segunda maior causa de anomalias genitais, que são predominantemente relacionadas à Hiperplasia Adrenal Congênita (THYEN et al., 2006). Considerando isso, Ahmed; Khwaja; Hughes (2000) recomendam que o manejo de recém-nascidos do sexo masculino com EMS <11 justifique uma abordagem multidisciplinar e que essas crianças tenham uma avaliação endócrina completa.

De acordo com Liubicic et al (2019), que publicaram estudo multicêntrico internacional com análise de dados clínicos de 63 pacientes, pacientes diagnosticados devido a alterações genitais apresentam pior prognóstico.

Embora a apresentação clínica do mosaicismo 45,X/46,XY com anomalias genitais represente a minoria dos pacientes com esse cariótipo, esses são os casos mais difíceis de manejar (THYEN et al., 2006) e eventualmente passam despercebidos até a descoberta da persistência do ducto Mülleriano, ou seja, de útero e/ou trompa acidentalmente encontrados junto a testículos, durante orquidopexia ou herniorrafia, em paciente fenotipicamente masculino. (WOLFFENBUTTEL et al., 2016).

A síndrome de Turner, por outro lado, é um DDS mais frequente. Kwon et al. (2017) encontraram material críptico do cromossomo de Y, não detectável por cariótipo, em 8,5% dos casos de Síndrome de Turner estudados. A prevalência de gonadoblastoma neste grupo

foi de 20%, semelhante aos 16% grupo de pacientes com ST cujo cromossomo Y fora observado desde o cariótipo; versus 2,4% nas pacientes com ST em geral.

Muitos desses pacientes são tratados com hormônio do crescimento recombinante humano (rhGH) para tratarem a baixa estatura, e alguns autores questionam se essa administração em doses supra-fisiológicas poderia aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias, mas essa suposição nunca foi, de fato, demonstrada (ROJEK et al., 2017).

Além de alguns indivíduos com mosaicismo 45,X/46,XY, pessoas com alteração da diferenciação gonadal 46,XY são o grupo de maior propensão para desenvolver gonadoblastoma, sendo o risco inversamente proporcional ao grau de virilização genital. Nesses casos, se o registro for feminino, preconiza-se proceder a gonadectomia bilateral; se masculino, que testículos não descidos sejam biopsiados no momento da orquidopexia e após a puberdade. Recomenda-se realizar ultrassonografia anual de testículos dos casos em que não se proceda a gonadectomia (LEE et al., 2006; LEE et al., 2016).

A abordagem gonadal dos nossos pacientes esteve em concordância com o consensualmente preconizado, de modo que nenhum paciente com subvirilização mínima ou ausente foi submetido a gonadectomia. Para estes, foi recomendado a biópsia gonadal, na gonadopexia, se realizada, e pós-puberal, com ultrassonografias gonadais anuais. O acompanhamento ultrassonográfico das gônadas dos pacientes com genitália mais virilizada, os quais não tenham sido submetidos à gonadectomia, em alguns casos foi prejudicado pela baixa adesão destes ao seguimento clínico.

Se considerarmos apenas os pacientes cujo estudo histológico gonadal ocorreu pós gonadectomia, registramos a ocorrência de gonadoblastoma em 15,4% dos casos, percentual este próximo ao relatado por Kwon et al. (2017), superior ao esperado para pacientes com cariótipo 45,X sem Y detectado à pesquisa por PCR, mas um pouco inferior à análise exclusiva de pacientes com o fenótipo Turner, uma vez que a disgenesia gonadal é fator de risco para o desenvolvimento da neoplasia.

A prevalência de gonadoblastoma inferior à reportada por Kwon et al. (2007) pode ainda ser influenciada pela idade da gonadectomia. Embora nossa casuística tenha sido predominantemente composta por indivíduos adultos (média de 21,9 anos; prevalência das faixas etárias de 11-15 anos e 21-30 anos); a média cai entre os pacientes submetidos à gonadectomia. O procedimento antecedeu o uso de rhGH na maioria dos pacientes.

No que diz respeito a outras características clínicas estudadas, foram relatadas cardiopatias diversas, a saber: valva aórtica bicúspide; insuficiência de valva aórtica; dilatação atrial; dilatação ventricular; comunicação interatrial. Dentre as malformações urinárias

registradas, por sua vez, mencionam-se rins em ferradura, duplicação do sistema coletor renal, persistência do úraco

De modo semelhante a outros estudos nacionais e estrangeiros, nossos participantes apresentaram prevalência de cardiopatia e de nefropatia maior que a estimativa populacional. Existe uma relação bem estabelecida entre ambas as condições e a monossomia parcial ou total do cromossomo X. Essa frequência pode ser superestimada por se tratar de pacientes de um serviço de alta complexidade, de referência para alterações da diferenciação sexual.

Foi registrada a ocorrência de crises convulsivas não febris em dois dos participantes da casuística; enquanto Telvi et al (1999) relatam a ocorrência de deficiência intelectual leve em quatro dos pacientes estudados, e de transtorno do espectro autista em dois destes.

A presença de atraso do desenvolvimento com dismorfias possivelmente contribuiu para a indicação do estudo citogenético, sobretudo na presença de outras características clínicas de suspeição de síndromes cromossômicas, e não reflete necessariamente a prevalência na síndrome estudada. Por outro lado, há relatos da expressão do gene *TSPY* no cérebro em estágios precoces do desenvolvimento embrionário, e a monossomia do cromossomo X em determinadas linhagens celulares poderia, de fato, ter relação com transtornos neuropsiquiátricos.

Sugere-se uma metanálise para comparação sistemática entre as publicações anteriores, e mais estudos a fim de se elucidar essa relação com distúrbios neuropsicológicos.

## **7.2 AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PESQUISA DO CROMOSSOMO Y**

O risco para o desenvolvimento de tumores de células germinativas em pacientes com gônadas disgenéticas é maior após a puberdade, mas há relatos de diagnóstico no primeiro ano de vida; ou ainda em pacientes com cariótipo sanguíneo normal, e mosaicismo 45,X/46,XY detectado apenas ao estudo citogenético gonadal (NISIMA-UCHIDA et al., 2015; MORANDI et al., 2018; CUNHA et al., 2018).

Acredita-se que o risco para desenvolvimento de gonadoblastoma depende da constituição cromossômica, sobretudo se houver alteração numérica ou estrutural do cromossomo Y envolvendo os genes *TSPY* e *SRY* (BIANCO, 2009); da expressão de marcadores de células germinativas embrionárias, como OCT3/4 e KITL, após o primeiro ano de vida; e da localização da gônada (LEE et al., 2006).

Shen et al. (2013) analisaram o número de cópias da *TSPY* em 2.272 homens chineses não aparentados, com ou sem deleções em AZFc, agrupados segundo a produção espermática.

As distribuições do número de cópias de *TSPY* foram significativamente diferentes entre homens sem deleções em AZFc com diferentes fenótipos espermatogênicos. Observou-se menor produção de espermatozoides e um risco elevado de falha espermatogênica tanto em homens com menos de 21 cópias *TSPY* quanto naqueles com mais de 55 cópias, em comparação com o grupo intermediário, com 21 a 55 cópias. Resultados semelhantes foram observados à análise homens com deleção parcial do gene. Os autores concluíram que as CNVs do *TSPY* afetam a suscetibilidade à falha espermatogênica pela modulação da eficiência da espermatogênese.

Apesar da proposição de que o número de cópias do gene *TSPY* poderia influenciar na abertura da dupla-fina de DNA, por aumentar a propensão para quebras e prejudicando a estabilidade do cromossomo Y, Guiachini et al (2009) apontam prevalência maior de infertilidade entre homens com menos de 33 cópias do *TSPY*.

No presente estudo, o cálculo do *nTSPY* de 19 indivíduos com mosaicismos 45,X/46,XY – e suas variantes – foi correlacionado aos valores calculados para 95 homens residentes na região metropolitana de Ribeirão Preto. Destaca-se a casuística dessa patologia rara obtida a partir de único centro, como também o desenho do tipo caso-controle, considerando dados clínicos, citogenéticos e moleculares.

Não observamos diferença entre o *nTSPY* dos nossos pacientes (média de 28; DP=10); e do grupo controle estudado (média de 31; DP=14,7). As amostras de DNA utilizadas como referência, contudo, foram obtidas a partir de sangue de homens da população urbana residente em Ribeirão Preto, sem triagem clínica ou citogenética prévia.

Ainda que não haja diferença significativa entre a média das idades à coleta do cariótipo do grupo de pacientes e do grupo controle, houve diferença na distribuição das idades. Essa diferença pode estar relacionada aos pacientes menores de idade que participaram deste estudo (14,7% do total, na ocasião da última consulta médica registrada em prontuário), enquanto todos os controles foram adultos assintomáticos.

Todos os pacientes que apresentaram %*SRY* maior que 0,50 apresentaram também menos de 50% de células da linhagem 45,X. O %*SRY* se relacionou positiva e fortemente com o percentual de células das linhagens 46,XY e suas variantes. Algumas dessas linhagens são representadas por segmentos de cromossomo marcador, cuja conformação não pôde ser determinada ao estudo citogenético, podendo, inclusive, conter mais de uma cópia do gene *SRY* e de outros genes. Apesar disso, a correlação entre esses valores alcançou significância estatística.

A perda somática do cromossomo Y em mosaico (mLOY, do inglês, *mosaic loss of Y*) nos leucócitos circulantes em sangue são o mosaicismo clonal mais comumente detectado, todavia suas causas e consequência conhecidas são limitadas (JACOBS; BRUNTON; BROWN, 1963; WRIGHT et al, 2017).

Usando uma abordagem computacional, Thompson et al (2019) estimam que 20% homens com amostras armazenadas no *UK Biobank* apresentam algum grau de LOY. O estudo identificou ainda 156 loci autossômicos determinantes para o LOY, os quais foram replicados em 756.114 homens de ascendência europeia e japonesa. Esses loci estão mapeados em genes envolvidos com a regulação do ciclo celular e susceptibilidade ao câncer; em *drivers* somáticos de crescimento tumoral, e em sítios-alvo de quimioterapia.

O sequenciamento de RNA de célula única permitiu identificar desregulações na expressão de genes autossômicos em leucócitos com LOY, e contribui para a compreensão da expansão clonal dessas células. Thompson et al (2019) demonstraram ainda que a susceptibilidade genética ao LOY está relacionada a efeitos não-hematopoiéticos presentes em ambos os sexos. Nessa mesma linha, Terao et al (2019) relacionam mLOY à trombocitose e à anemia. Esses achados reforçam a hipótese de que a hematopoiese clonal seria um biomarcador da instabilidade cromossômica em outros tecidos, assim como a mLOY.

Uma vez que os casos de mosaicismo de cromossomos sexuais requerem uma ampliação no número de metáfases habitualmente analisadas, para melhor avaliação citogenética, que a cultura celular é um processo delicado, e que sua análise demanda mais tempo, a pesquisa molecular de sequências do gene *SRY* poderia ser considerada como estratégia complementar à investigação citogenética.

O estudo do mosaicismo do cromossomo Y revela mecanismos subjacentes ao câncer e a outras doenças relacionadas ao envelhecimento. Aprofundar a etiologia do mLOY nos permitirá compreender melhor os fatores de risco para essas doenças e, conseqüentemente, para a mortalidade global.

## 8. CONCLUSÃO

## 8 CONCLUSÃO

Apesar de se tratar de uma patologia rara e subdiagnosticada, que engloba um grupo de pacientes heterogêneos entre si, a avaliação dos dados clínicos e laboratoriais destes 34 pacientes, e a comparação destes com o cálculo relativo do número de cópias do *TSPY* do grupo controle, constituído por 95 homens residentes em Ribeirão Preto-SP (CRUZ, 2018), permitiu as seguintes conclusões:

- a) A prevalência de baixo peso ao nascer, de cardiopatia congênita e de malformações renais foi maior do que o observado na população geral. A maioria alcançou uma estatura final abaixo do normal para a população brasileira, independentemente do sexo de criação. A idade mediana à gonadectomia e à coleta do cariótipo de pacientes com ambiguidade genital foi muito mais precoce do que a das com fenótipo Turner. Pacientes com genitália externa predominantemente masculinizada não foram submetidos a gonadectomia, tal qual preconizado.
- b) O fenótipo da genitália externa se relacionou com os órgãos genitais internos, com o sexo de criação, e com a realização da gonadectomia. A virilização das estruturas genitais internas se relacionaram inversamente com a proporção de células da linhagem 45,X detectadas. As demais variáveis não se relacionaram estatisticamente com as características clínicas.
- c) Não houve diferença entre o *nTSPY* de ambos os grupos de pacientes e controle.
- d) Não houve relação entre o *nTSPY* e o percentual de células da linhagem 45,X dos pacientes.
- e) O %*SRY* dos pacientes se relacionou fortemente à proporção de células da linhagem 45,X.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S. Faisal; KHWAJA, Omar; HUGHES, Ieuan A. The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. **BJU international**, v. 85, n. 1, p. 120-124, 2000.
- ARNOLD, Arthur P.; CHEN, Xuqi. What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues?. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2009.
- BACHTROG, Doris. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. **Nature reviews. Genetics** v. 14, n. 2, p. 113–24, 2013.
- BAKKER, Julie. Sex differentiation: Organizing effects of sex hormones. In: **Gender Dysphoria and Disorders of Sex Development**. Springer, Boston, MA, 2014. p. 3-23.
- BASHAMBOO, A. et al. Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development. **Clinical genetics**, v. 91, n. 2, p. 143-156, 2017.
- BERGERON, M. B.; LEMIEUX, N.; BROCHU, P. Undifferentiated gonadal tissue, Y chromosome instability, and tumors in XY gonadal dysgenesis. **Pediatric and developmental pathology**, v. 14, n. 6, p. 445-459, 2011.
- BHOWMICK, Bejon Kumar; SATTA, Yoko; TAKAHATA, Naoyuki. The origin and evolution of human ampliconic gene families and ampliconic structure. **Genome research**, v. 17, n. 4, p. 441-450, 2007.
- BIANCO, Bianca et al. Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 9, p. 1113-1118, 2006.
- BIANCO, Bianca et al. *SRY* gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoral gonadal lesions in Turner syndrome. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 28, n. 2, p. 197-202, 2009.
- BICHILE, Dipti L. et al. Y chromosome: Structure and biological functions. **Indian J. Basic Appl. Med. Res**, v. 3, p. 152-160, 2014.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. Conselho Nacional de Saúde. Resolução no 196, de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos [Internet]. Brasília, 2008. [citado 2014 Jan 4]. Disponível em: [http://www.conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/index.html](http://www.conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html).
- CARDOSO, Ana R. et al. Major influence of repetitive elements on disease-associated copy number variants (CNVs). **Human genomics**, v. 10, n. 1, p. 30, 2016.

CARVALHO, Annelise B. et al. Clinical and cytogenetic features of 516 patients with suspected Turner syndrome—a single-center experience. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 167-173, 2018.

COLACO, Stacy; MODI, Deepak. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 14, 2018.

COLAIANNI, Valeria; MAZZEI, Rosalucia; CAVALLARO, Sebastiano. Copy number variations and stroke. **Neurological Sciences** v. 37, n. 12, p. 1895–1904, 2016.

COOLS, Martine et al. Gonadal pathology and tumor risk in relation to clinical characteristics in patients with 45, X/46, XY mosaicism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. E1171-E1180, 2011.

CRUZ, Juliana de Oliveira. **Variações genéticas na população brasileira: repetições de cópias do gene TSPY e inserção Alu YAP**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

CUNHA, Sarah Crestian et al. Early development of a gonadal tumor in a patient with mixed gonadal dysgenesis. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 62, n. 6, p. 644-647, 2018.

DAMIANI, Durval et al. As novas definições e classificações dos estados intersexuais: o que o Consenso de Chicago contribui para o estado da arte?. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2007.

DAMIANI, Durval et al. Genitália ambígua: diagnóstico diferencial e conduta. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 1, p. 37-47, 2001.

DANON, Mathilde; SACHS, Leo. Sex chromosomes and human sexual development. **The Lancet**, v. 270, n. 6984, p. 20-25, 1957.

DHANOVA, Jasdeep Kaur; MUKHOPADHYAY, Chandra Sekhar; ARORA, Jaspreet Singh. Y- chromosomal genes affecting male fertility: A review. **Veterinary World** v. 9, n. 7, p. 783–791, 2016.

EHDIVAND S, GUPTA N **Gonadoblastoma**. PathologyOutlines.com website. <<http://www.pathologyoutlines.com/topic/ovarytumorgonadoblastoma.html>>. Acessado em 7 de maio de 2019.

FORSBERG, Lars A. et al. Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer. **Nature genetics**, v. 46, n. 6, p. 624, 2014.

GIACHINI, Claudia et al. *TSPY1* copy number variation influences spermatogenesis and shows differences among Y lineages. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 10, p. 4016-4022, 2009.

HELENA MANGS, A.; MORRIS, Brian J. The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future. **Current genomics**, v. 8, n. 2, p. 129-136, 2007.

HOOK, ERNEST B. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. **American journal of human genetics**, v. 29, n. 1, p. 94, 1977

JACOBS, Patricia A. et al. Change of human chromosome count distributions with age: evidence for a sex difference. **Nature**, v. 197, n. 4872, p. 1080-1081, 1963.

KAPROVA-PLESKACOVA, Jana et al. 45, X/46, X, psu dic (Y) gonadal dysgenesis: influence of the two cell lines on the clinical phenotype, including gonadal histology. **Sexual Development**, v. 7, n. 6, p. 282-288, 2013

KARINA BARTMANN, Ana et al. *TSPY* detection in blood, buccal, and urine cells of patients with 45, X karyotype. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 130, n. 3, p. 320-321, 2004.

KEE, Kehkooi et al. Human *DAZL*, *DAZ* and *BOULE* genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 222-225, 2009.

KERSEMAEKERS, Anne-Marie F. et al. Identification of germ cells at risk for neoplastic transformation in gonadoblastoma: an immunohistochemical study for OCT3/4 and *TSPY*. **Human pathology**, v. 36, n. 5, p. 512-521, 2005.

KOREN, Amnon et al. Genetic variation in human DNA replication timing. **Cell**, v. 159, n. 5, p. 1015-1026, 2014.

KWON, Ahreum et al. Risk of Gonadoblastoma Development in Patients with Turner Syndrome with Cryptic Y Chromosome Material. **Hormones and Cancer**, v. 8, n. 3, p. 166-173, 2017.

LARDONE, M. C. et al. Quantification of *DDX3Y*, *RBM1*, *DAZ* and *TSPY* mRNAs in testes of patients with severe impairment of spermatogenesis. **Molecular human reproduction**, v. 13, n. 10, p. 705-712, 2007.

LAU, Y F. Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the *TSPY* gene. **American journal of human genetics** v. 64, p. 921-927, 1999.

LAU, Y.F; LI, Y; KIDO, T. Gonadoblastoma locus and the *TSPY* gene on the human Y chromosome. **Birth Defects Res C Embryo Today** v. 87, n. 1, p. 114-22, 2009.

LEE, Peter A. et al. Consensus statement on management of intersex disorders. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. e488-e500, 2006.

LEE, Peter A. et al. Global disorders of sex development update since 2006: perceptions, approach and care. **Hormone research in paediatrics**, v. 85, n. 3, p. 158-180, 2016.

LEWONTIN, Richard C.; WESSLER, Susan R.; GRIFFITHS, Anthony JF. **An Introduction to Genetic Analysis**. 2007.

MACHIELA, Mitchell J. et al. Characterization of breakpoint regions of large structural autosomal mosaic events. **Human molecular genetics**, v. 26, n. 22, p. 4388-4394, 2017.

MACIEL-GUERRA, Andréa Trevas; GUERRA-JÚNIOR, Gil. **Menino ou Menina? Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo**-. Appris Editora e Livraria Eireli-ME, 2019.

MANZ, E et al. *TSPY*-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in *DYZ5* tandem repeat units on the human Y chromosome. **Genomics** v. 17, n. 3, p. 726-31, 1993.

MASSAIA, Andrea; XUE, Yali. Human Y chromosome copy number variation in the next generation sequencing era and beyond. **Human genetics**, v. 136, n. 5, p. 591-603, 2017.

MAXWELL, Susannah et al. First trimester screening cut-offs for noninvasive prenatal testing as a contingent screen: Balancing detection and screen-positive rates for trisomy 21. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 56, n. 1, p. 29-35, 2016.

MAZEYRAT, Sophie; MITCHELL, Michael J. Rodent Y chromosome *TSPY* gene is functional in rat and non-functional in mouse. **Human molecular genetics**, v. 7, n. 3, p. 557-562, 1998.

MELLO, Joana C. Moreira et al. Early X chromosome inactivation during human preimplantation development revealed by single-cell RNA-sequencing. **Nature Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10794, 2017.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **The Developing Human, Clinically Oriented Embryology**. Elsevier. 2016.

MORANDI, Grazia et al. 45, X/46, XY mosaicism presenting with isolated unilateral cryptorchidism and a normal blood karyotype. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 6, p. 2079-2082, 2018.

NISHINA-UCHIDA, Noriko et al. Identification of X monosomy cells from a gonad of mixed gonadal dysgenesis with a 46, XY karyotype: case report. **Medicine**, v. 94, n. 14, 2015.

O'LEARY, Nuala A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D733-D745, 2016.

OLERUP, Ole; ZETTERQUIST, Henrik. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue antigens**, v. 39, n. 5, p. 225-235, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **CID-10: Classificação Estatística Internacional de Doenças** com disquete Vol. 1. Edusp, 1994.

PAGE, David C. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. **Development**, v. 101, n. Supplement, p. 151-155, 1987.

PRADER, Andreas. Der Genitalbefund beim Pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms: Morphologie, Häufigkeit, Entwicklung, und Vererbung der verschiedenen Genitalformen. **Helv. Paediatr. Acta**, v. 9, p. 231-248, 1954.

RAMOS, Ester S. et al. Identification of X chromosome copies by quantitative real-time polymerase chain reaction for population screening tests. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 6, p. 2476-2478, 2010.

REPPING, Sjoerd et al. High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. **Nature genetics**, v. 38, n. 4, p. 463, 2006.

ROJEK, Aleksandra et al. Molecular Detection and Incidence of Y Chromosomal Material in Patients with Turner Syndrome. **Sexual Development**, v. 11, n. 5-6, p. 254-261, 2017.

SAX, Leonard. How common is Intersex? A response to Anne Fausto-Sterling. **Journal of sex research**, v. 39, n. 3, p. 174-178, 2002.

SCHEMPP, W et al. Comparative mapping of *YRRM*- and *TSPY*-related cosmids in man and hominoid apes. **Chromosome Res** v. 3, n. 4, p. 227-34, 1995.

SCHNIEDERS, F et al. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. **Hum Mol Genet** v. 5, n. 11, p. 1801-7, 1996.

SHAFFER, Lisa G. et al. (Ed.). **ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013)**. Karger Medical and Scientific Publishers, 2013.

SHEN, Hui et al. Integrated molecular characterization of testicular germ cell tumors. **Cell reports**, v. 23, n. 11, p. 3392-3406, 2018.

SIMPSON, Elizabeth. Sex reversal and sex determination. **Nature**, v. 300, n. 5891, p. 404, 1982.

SKAKKEBÆK, Niels E. Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. **International Journal of Andrology**, v. 27, n. 4, p. 189-191, 2004.

SKALETSKY, Helen et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature** v. 423, n. 6942, p. 825–837 , 2003.

SKAWRAN, Britta et al. Characterization of a human *TSPY* promoter. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 276, n. 1-2, p. 159-167, 2005.

SOHVAL, Arthur R. “Mixed” gonadal dysgenesis: a variety of hermaphroditism. **American journal of human genetics**, v. 15, n. 2, p. 155, 1963.

SOLARI, A.J. Synaptonemal complex analysis in human male infertility. **Eur J Histochem** v. 43, n. 4, p. 265–76 , 1999.

SU, Hua; LAU, Y. F. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (*SRY*) gene, using a reverse genetic approach. **American journal of human genetics**, v. 52, n. 1, p. 24, 1993.

SVACINOVA, Veronika et al. Sequence recombination in exon 1 of the *TSPY* gene in men with impaired fertility. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 155, n. 3, p. 287-98, 2011.

TERAO, Chikashi et al. GWAS of mosaic loss of chromosome Y highlights genetic effects on blood cell differentiation. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2019.

THOMPSON, Deborah J. et al. Genetic predisposition to mosaic Y chromosome loss in blood. **Nature**, v. 575, n. 7784, p. 652-657, 2019.

THYEN, Ute et al. Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany. **Hormone research in paediatrics**, v. 66, n. 4, p. 195-203, 2006.

VAN NIEKERK, Willem A.; RETIEF, Andries E. The gonads of human true hermaphrodites. **Human genetics**, v. 58, n. 1, p. 117-122, 1981.

VOGEL, T.; SCHMIDTKE, J. Structure and function of *TSPY*, the Y-chromosome gene coding for the “testis-specific protein”. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 80, n. 1-4, p. 209-213, 1998.

WILSON, Thomas E. et al. Large transcription units unify copy number variants and common fragile sites arising under replication stress. **Genome research**, p. gr. 177121.114, 2014.

WOLFFENBUTTEL, K. P. et al. Gonadal dysgenesis in disorders of sex development: diagnosis and surgical management. **Journal of pediatric urology**, v. 12, n. 6, p. 411-416, 2016.

WRIGHT, Daniel J. et al. Genetic variants associated with mosaic Y chromosome loss highlight cell cycle genes and overlap with cancer susceptibility. **Nature genetics**, v. 49, n. 5, p. 674, 2017.

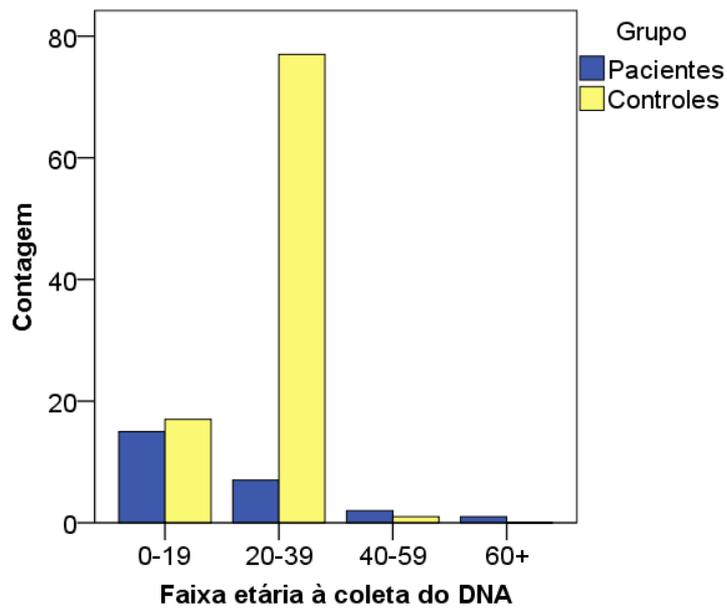
YEN, P.H. Advances in Y chromosome mapping. **Curr Opin Obstet Gynecol** v. 11, n. 3, p. 275–81 , 1999.

YIN, Y. H. et al. *TSPY* is a cancer testis antigen expressed in human hepatocellular carcinoma. **British journal of cancer**, v. 93, n. 4, p. 458, 2005.



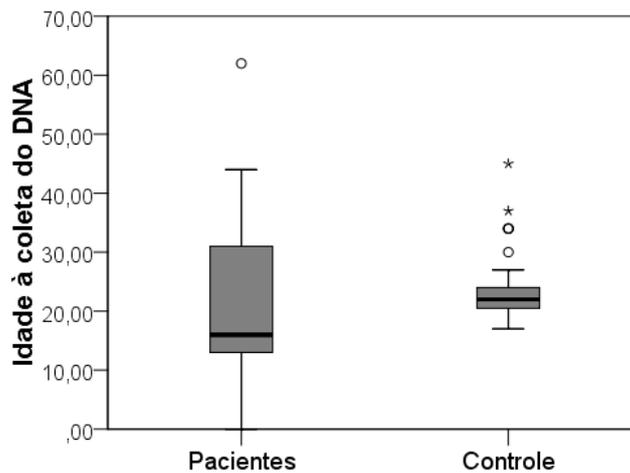
## APÊNDICE A – ILUSTRAÇÕES COMPLEMENTARES

Figura 10 – Distribuição de pacientes 45,X/46,XY e de grupo masculino controle, em função da faixa etária à coleta do DNA (nível de significância  $p=0,04$ , teste Mann-Whitney).



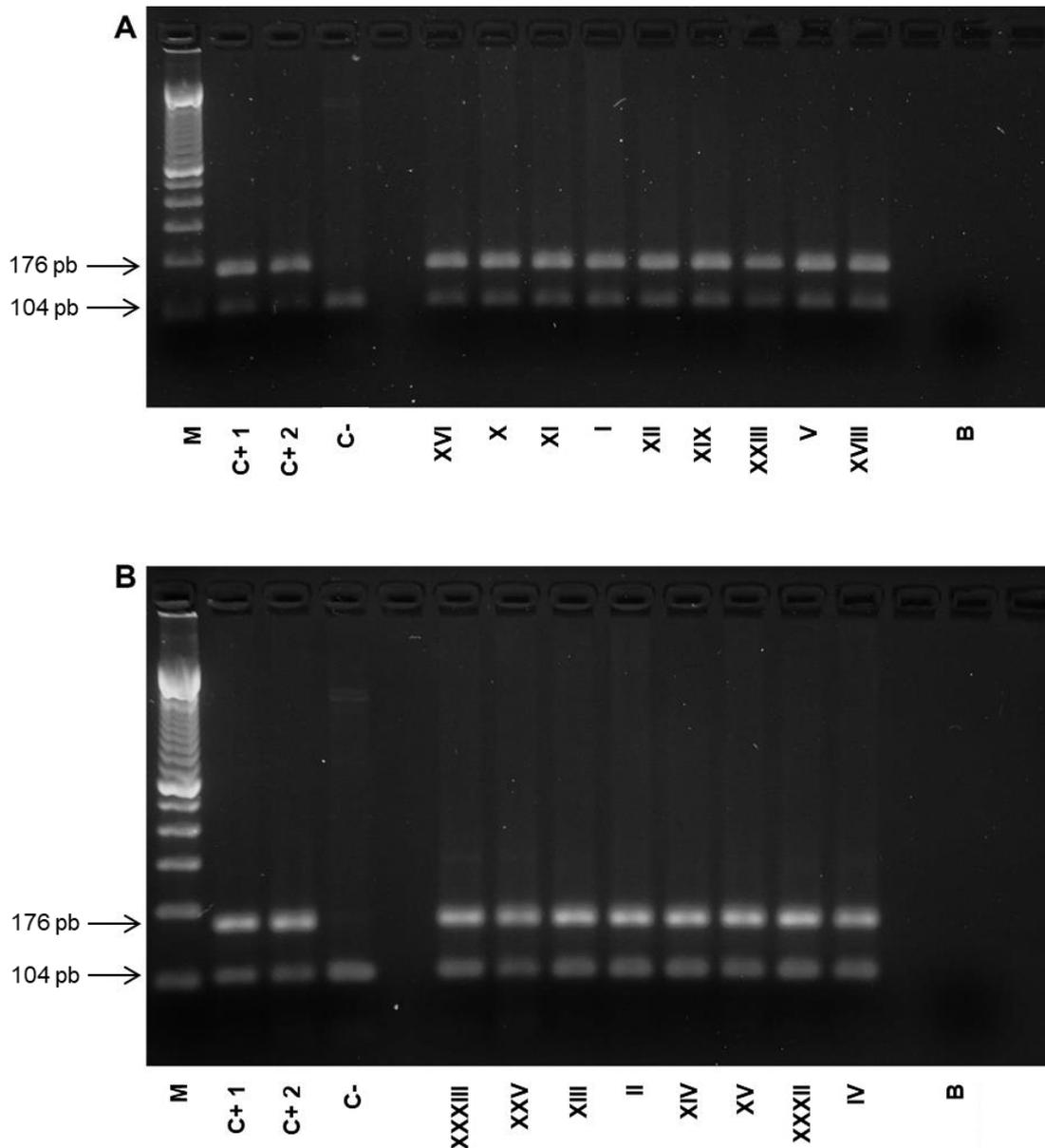
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11 – Distribuição das idades à coleta do DNA de pacientes 45,X/46,XY ( $n=25$ ) e de grupo masculino controle ( $n=95$ ). Nível de significância  $p=0,04$ , teste Mann-Whitney.



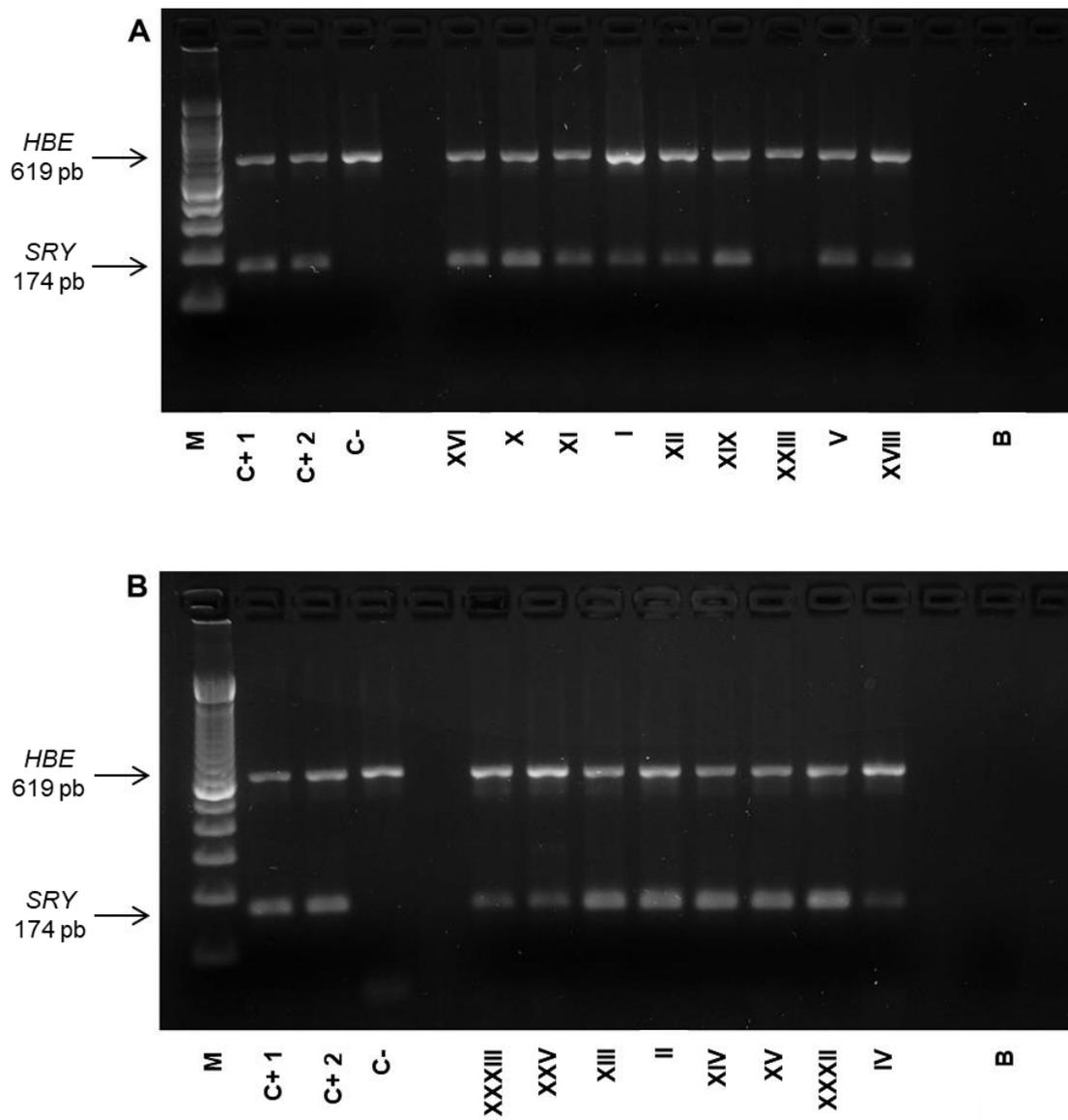
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 12 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Reação de PCR multiplex para seqüências do gene *TSPY* (176 pb); e do gene de referência, *GAPDH* (104 pb). M: marcador de peso molecular 100 pb Invitrogen®; C+<sub>1</sub>, C+<sub>2</sub> e C-: respectivamente, controles positivos e negativo obtidos a partir de amostras de homens e de mulher da população de Ribeirão Preto; algoritmos romanos: amostras de pacientes; B: branco (água ultrapura).



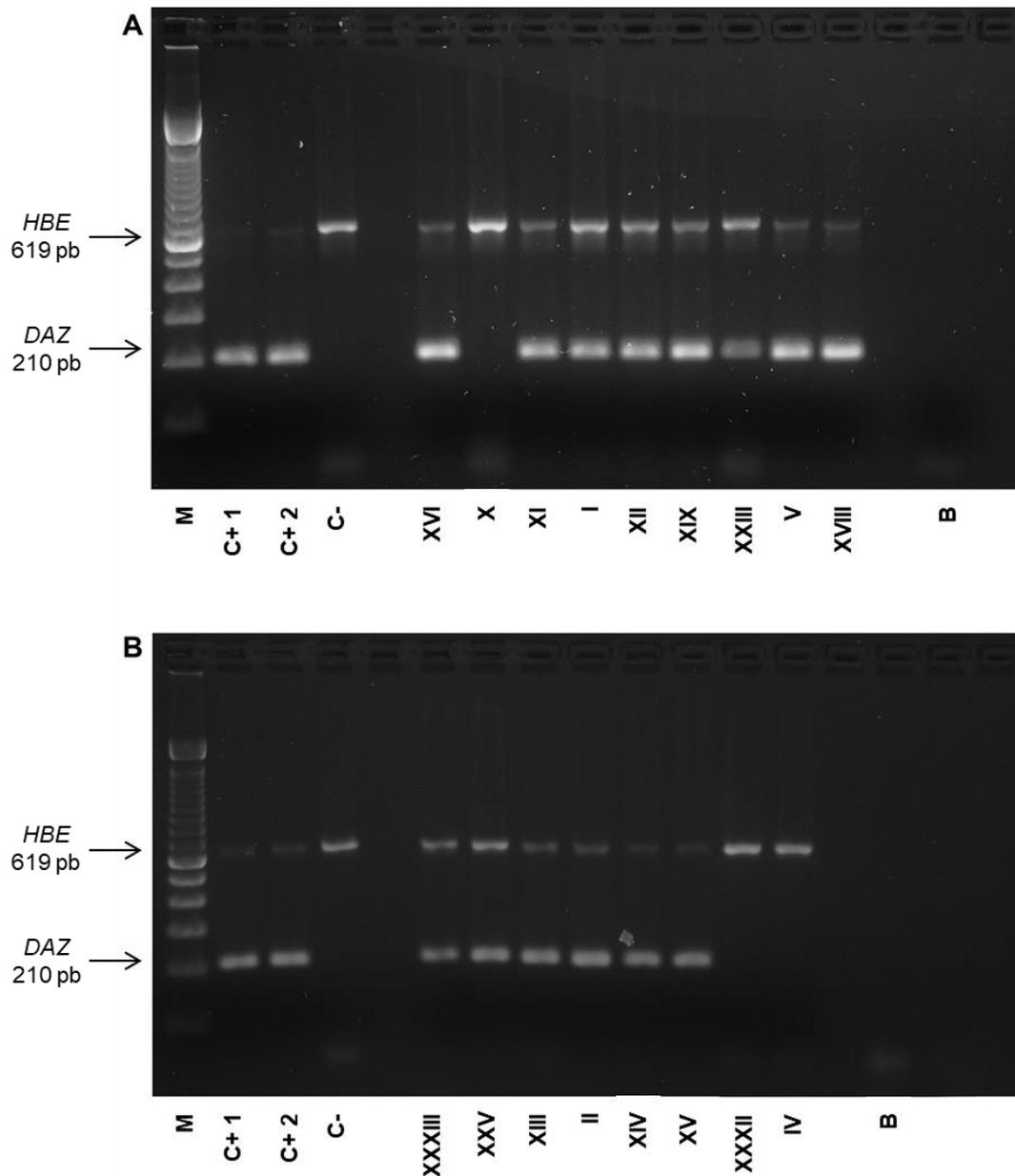
Legenda: pb: pares de bases;  
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 13 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Reação de PCR multiplex para sequências do gene *SRY* (174 pb); e do gene de referência, *HBE* (619 pb). M: marcador de peso molecular 100pb Invitrogen®; C<sub>+1</sub>, C<sub>+2</sub> e C<sub>-</sub>: respectivamente, controles positivos e negativo obtidos a partir de amostras de homens e de mulher da população de Ribeirão Preto; algoritmos romanos: amostras de pacientes; B: branco (água ultrapura).



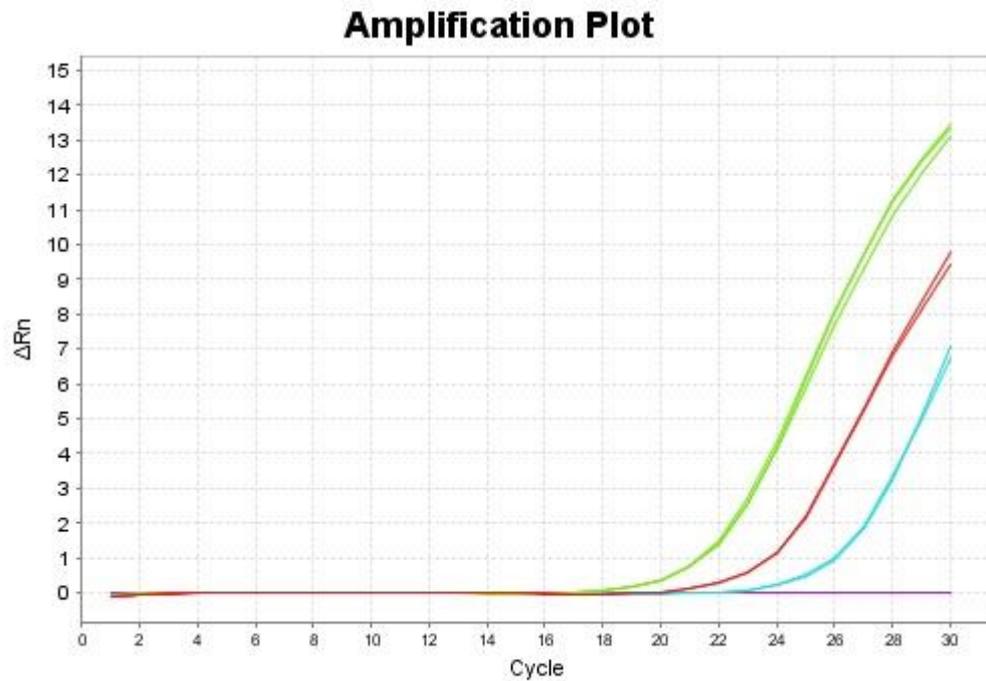
Legenda: pb: pares de bases;  
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 14 – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Reação de PCR multiplex para sequências do gene *DAZ* (210 pb); e do gene de referência, *HBE* (619 pb). M: marcador de peso molecular 100pb Invitrogen®; C<sub>+1</sub>, C<sub>+2</sub> e C<sub>-</sub>: respectivamente, controles positivos e negativo obtidos a partir de amostras de homens e de mulher da população de Ribeirão Preto; algarismos romanos: amostras de pacientes; B: branco (água ultrapura).



Legenda: pb: pares de bases;  
Fonte: elaborada pelo autor.

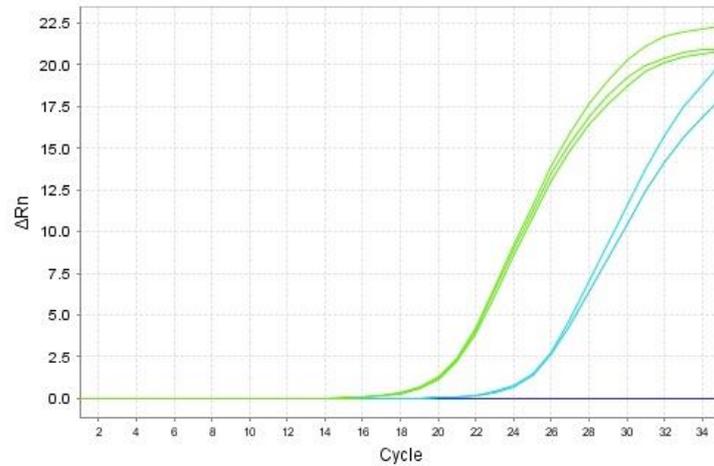
Figura 15 – Gráfico de amplificação dos genes *GAPDH*, *SRY* e *TSPY*, obtida pela técnica de qPCR – paciente XIII. No gráfico, as curvas verdes correspondem à amplificação do gene *TSPY*; as curvas magenta, centrais, correspondem à amplificação do gene autossômico de referência, *GAPDH*; e as curvas azuis, à direita, ao gene de cópia única *SRY*. A linha lilás abaixo corresponde ao branco da reação. As curvas referentes ao gene *TSPY* estão mais proximais do que as demais, indicando maior número relativo de cópias (cópias múltiplas); as curvas referentes ao *SRY* estão à direita das demais, indicando menor número relativo de cópias (gene de cópia única).



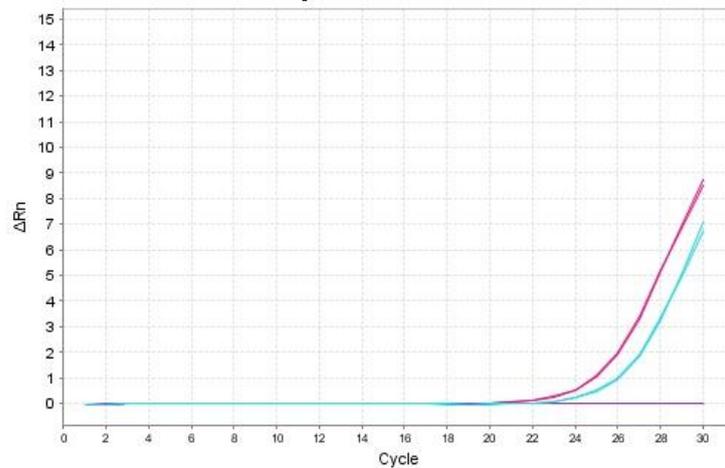
Fonte: elaborado pelo autor. *Software* StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems.

Figura 16 – Curvas de amplificação dos genes *GAPDH*, *SRY* e *TSPY*, técnica de qPCR:

(A) Controles masculino (amplificação dos genes *TSPY*, verde; e *SRY*, azul) e feminino (linha lilás, não amplificando os genes *TSPY* nem *SRY*).



(B) Amplificação do gene *SRY*: controle masculino (curva rosada); paciente XIII (curva azul); e controle feminino (linha lilás).



(C) Amplificação do gene *TSPY*: controle masculino (curva rosada); paciente XIII (curva verde); e controle feminino (linha lilás).

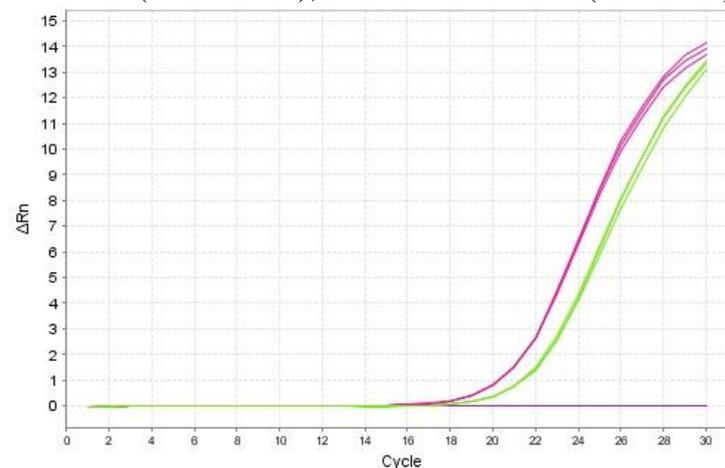
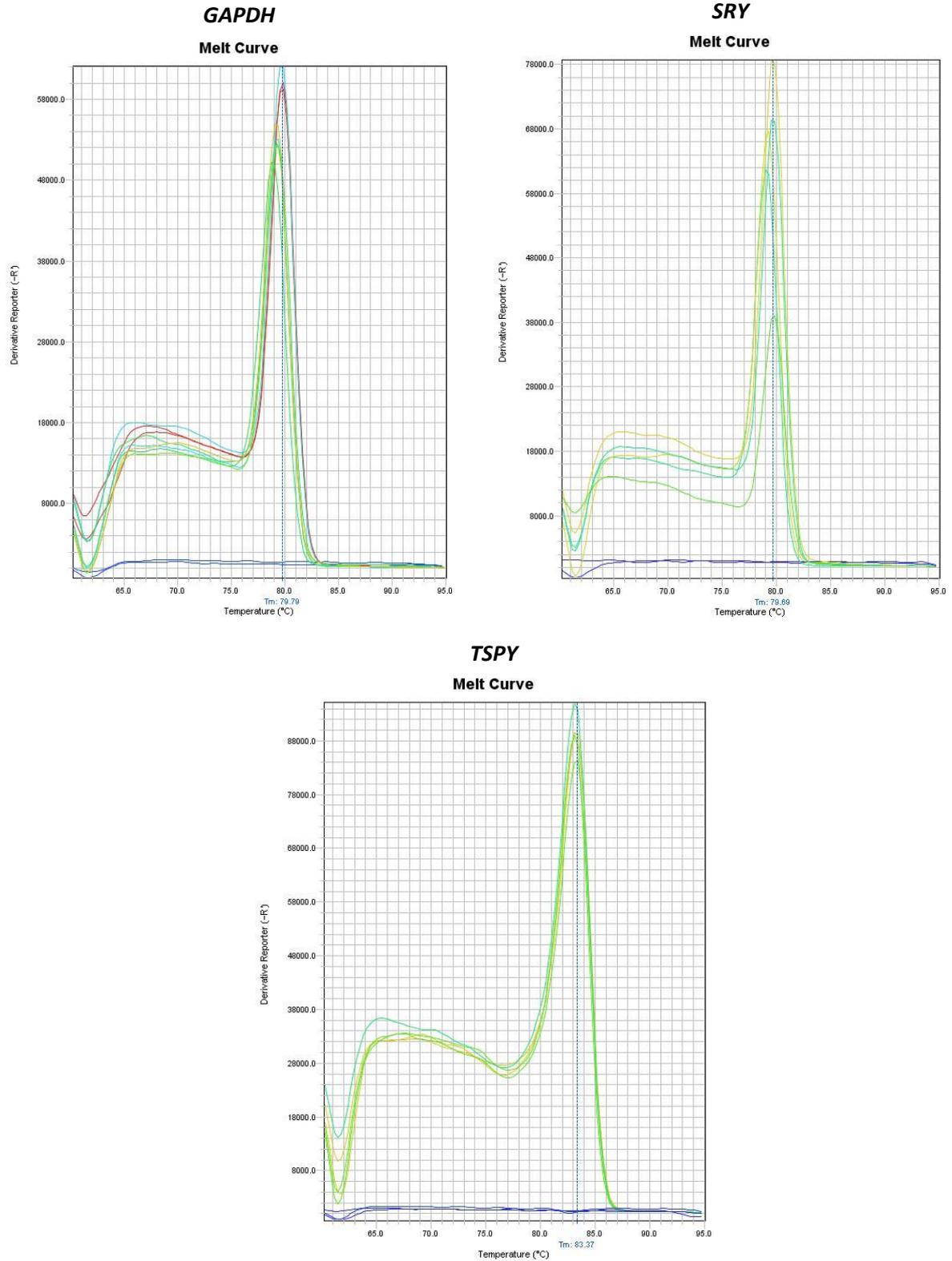
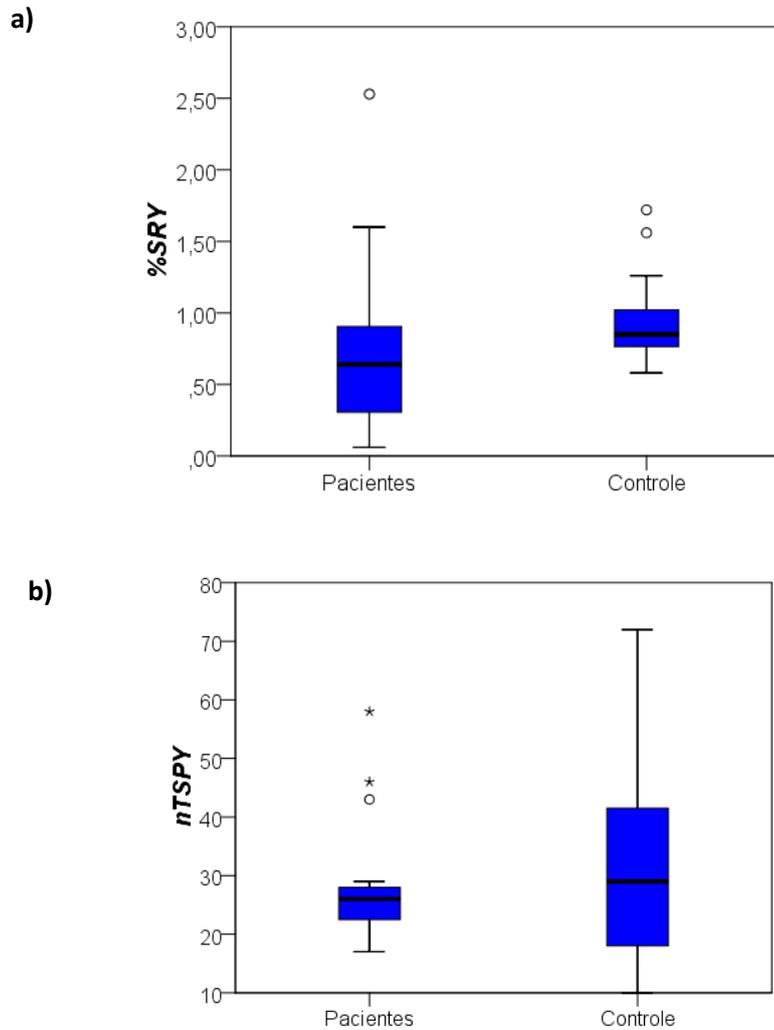


Figura 17 – Curvas de *melting* dos *primers* usados nas reações de quantificação relativa dos genes *GAPDH*, *SRY* e *TSPY*, respectivamente, obtida pela técnica de qPCR.



Fonte: elaborado pelo autor. Software StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems.

Figura 18 – Distribuição relativa: a) de células nas quais se detectou o gene *SRY* em relação ao par de alelos do gene autossômico *GAPDH*; e b) do cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY*, em pacientes 45,X/46,XY e em grupo masculino controle. ( $p < 0,001$ , teste de Mann-Whitney).



Legenda: %*SRY*: Percentual relativo da presença do gene *SRY*; *nTSPY*: cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY*; p: nível de significância.

Fonte: elaborado pelo autor.

## APÊNDICE B – TABELAS COMPLEMENTARES

Tabela 7 – Distribuição de pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY por faixa etária, de acordo com a idade à coleta do sangue para análise citogenética e para a molecular, segundo registro em prontuário hospitalar em que conste ambas as informações. Observa-se uma relação positiva e forte entre ambas as categorias (correlação  $\rho$  de Spearman).

Faixa etária à coleta	Cariótipo (NC)		Molecular (ND)		$\rho$ ( $p$ )
	F	%	f	%	
0-19 anos	13	68,4%	13	68,4%	0,874 ( $<0,01$ )
20-39 anos	6	31,6%	5	26,3%	
40-59 anos	0	0%	1	5,3%	

Legenda: NC (número de indivíduos submetidos a exame citogenético; ND (número de indivíduos submetidos à análise molecular); † Valor de  $p$  derivado do teste exato de Fisher aplicado às idades.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Frequência absoluta (F e f) e prevalência (%) de pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY e de grupo masculino controle, de acordo com a proporção de células com gene *SRY* (%*SRY*) e o cálculo do número de cópias do gene *TSPY* (*nTSPY*), em relação ao gene de referência *GAPDH*.

	Pacientes		Grupo controle masculino		$p$
	F	%	f	%	
<b>%<i>SRY</i></b>					
até 50%	8	42,1%	0	-	$<0,001$
maior que 50%	11	57,9%	83	100%	
<b><i>nTSPY</i></b>					
até 55 cópias	18	94,7%	84	95,5%	1,00
> 55 cópias	1	5,3%	4	4,5%	

Legenda: %*SRY*: percentual relativo de células com *SRY*, calculado por PCR quantitativo; *nTSPY*: cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY*;  $p$ : nível de significância; teste exato de Fisher.

Fonte: dados de grupo controle masculino obtidos a partir do estudo de Cruz (2018); dados de pacientes elaborado pelo autor.

Tabela 9 – Distribuição do percentual de células da linhagem 45,X ao estudo citogenético de linfócitos (%45,X); da proporção de células com o gene *SRY* (%*SRY*) e do número de cópias do gene *TSPY* (*nTSPY*), em função da faixa etária à coleta do DNA, em pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY, segundo registro em prontuário hospitalar.

Faixa etária (anos) à análise	%45,X		% <i>SRY</i>		<i>nTSPY</i>	
	Até 50%	> 50%	Até 50%	> 50%	Até 55	> 55
	F	f	F'	f'	F''	f''
0 - 19	10	5	3	8	9	2
20 - 39	3	1	3	3	5	1
40 - 59	2	-	1	-	-	1
≥ 60	-	-	1	-	1	-
$\rho$ (p)	-0,19 (0,51)		0,41 (0,10)		0,12 (0,70)	

Legenda:  $\rho$  (p): coeficiente de correlação  $r$  de Spearman; p' significância; teste exato de Fisher.  
Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 10 – Frequência absoluta (F, f, F' e f') e prevalência (%) da proporção de células da linhagem 45,X no cariótipo de sangue, e do cálculo relativo do número de células com cópia do gene *SRY*, em relação a variáveis clínicas categóricas do grupo de pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY, segundo registros em prontuário hospitalar.

Características da amostra	Células da linhagem 45,X					Presença do <i>SRY</i> (%)					nTSPY				
	≤ 50%		> 50%		p	≤ 50%		> 50%		p	≤ 50%		> 50%		p
	F	%	f	%		F'	%	f'	%		F''	%	f''	%	
Idade paterna <sup>1</sup>															
Até 40 anos	7	70%	2	20%	1,00	2	29%	4	57%	1,00	4	57%	2	29%	1,00
> 40 anos	1	10%	0	0%		0	0%	1	14%		1	14%	0	0%	
Idade materna <sup>1</sup>															
Até 40 anos	8	67%	3	25%	1,00	3	33%	5	56%	1,00	6	67%	2	22%	1,00
> 40 anos	1	8%	0	0%		0	0%	1	11%		1	11%	0	0%	
Baixo peso <sup>1</sup>															
≥ 2500g	2	14%	0	0%	1,00	0	0%	3	27%	0,49	1	9%	2	18%	0,06
< 2500g	10	71%	2	14%		3	27%	5	45%		8	73%	0	0%	
Comprimento <sup>1</sup>															
≥ 45cm	2	15%	0	0%	1,00	0	0%	3	30%	0,53	2	20%	1	10%	1,00
< 45cm	9	69%	2	15%		2	20%	5	50%		6	60%	1	10%	
Marcos DNPM															
Normais	8	53%	3	20%	1,00	3	30%	5	50%	0,53	5	50%	3	30%	0,53
Atrasados	3	20%	1	7%		0	0%	2	20%		2	20%	0	0%	
Cardiopatias															
Ausente	8	57%	2	14%	1,00	4	31%	6	46%	0,50	8	62%	2	15%	1,00
Presente	3	21%	1	7%		0	0%	3	23%		2	15%	1	8%	
Anomalia renal															
Ausente	10	59%	3	18%	0,10	4	29%	7	50%	0,54	9	64%	2	14%	1,00
Presente	1	6%	3	18%		2	14%	1	7%		2	14%	1	7%	
Virilização															
Ausente (♀)	10	43%	3	13%	0,22	2	13%	8	50%	0,12	6	38%	4	25%	0,23
Presente	5	22%	5	22%		4	25%	2	13%		6	38%	0	0%	
Virilização															
Subvirilizada	8	35%	8	35%	0,05	6	38%	7	44%	0,25	10	63%	3	19%	1,00
Completa (♂)	7	30%	0	0%		0	0%	3	19%		2	13%	1	6%	
Fenótipo genital															
Masculinizado	5	22%	5	22%	0,07	4	25%	2	13%	0,08	6	38%	0	0%	0,19
Ambíguo	3	13%	3	13%		2	13%	5	31%		4	25%	3	19%	
Turner (♀)	7	30%	0	0%		0	0%	3	19%		2	13%	1	6%	

continua

Características da amostra	Células da linhagem 45,X					Presença do SRY (%)					nTSPY				
	≤ 50%		> 50%		p	≤ 50%		> 50%		p	≤ 50%		> 50%		p
	F	%	f	%		F'	%	f'	%		F''	%	f''	%	
Genitália interna															
Masculinizado	2	13%	3	20%	0,05*	1	9%	1	9%	0,16	2	18%	0	0%	1,00
Ambíguo	2	13%	2	13%		3	27%	2	18%		3	27%	2	18%	
Turner (♀)	6	40%	0	0%		0	0%	4	36%		3	27%	1	9%	
Gonadectomia															
Não realizada	12	43%	3	11%	0,23	3	16%	6	32%	0,65	8	42%	1	5%	0,58
Realizada	7	25%	6	21%		5	26%	5	26%		7	37%	3	16%	
Histologia gonadal															
Concordante	3	23%	2	15%	0,17	3	33%	3	33%	0,87	4	44%	2	22%	0,87
Discordante	4	31%	4	31%		1	11%	2	22%		3	33%	0	0%	
Gonadoblastoma <sup>3</sup>															
Ausente	5	42%	5	42%	1,00	3	33%	4	44%	1,00	5	56%	2	22%	1,00
Presente	1	8%	1	8%		1	11%	1	11%		1	11%	1	11%	
Sexo de criação															
Feminino	7	23%	8	27%	0,05	6	32%	5	26%	0,35	9	47%	2	11%	1,00
Masculino	13	43%	2	7%		2	11%	6	32%		6	32%	2	11%	
Estatura final															
≥ Média pop.	9	47%	8	42%	0,49	5	42%	6	50%	1,00	7	58%	4	33%	1,00
< Média pop.	2	11%	0	0%		0	0%	1	8%		1	8%	0	0%	
≥ Média na ST	2	11%	2	11%	1,00	1	8%	2	17%	1,00	2	17%	1	8%	1,00
< Média na ST	9	47%	6	32%		4	33%	5	42%		6	50%	3	25%	
Baixa (♀) <sup>2</sup>	4	40%	5	50%	1,00	3	43%	3	43%	1,00	5	71%	1	14%	0,29
Normal (♀) <sup>2</sup>	0	0%	1	10%		0	0%	1	14%		0	0%	1	14%	
Baixa (♂) <sup>2</sup>	4	44%	2	22%	0,50	2	40%	1	20%	0,40	1	20%	2	40%	0,40
Normal (♂) <sup>2</sup>	3	33%	0	0%		0	0%	2	40%		2	40%	0	0%	
Uso de rec-hGH															
Não	11	46%	5	21%	0,91	4	24%	6	35%	0,70	9	53%	1	6%	0,25
Sim	6	25%	2	8%		2	12%	5	29%		4	24%	3	18%	

Legenda: p=nível de significância (correlação de Spearman, teste exato de Fisher); DNPM: desenvolvimento neuropsicomotor; pop.: populacional; ST: síndrome de Turner; <sup>1</sup>ao nascimento; <sup>2</sup>de acordo com sexo de criação; <sup>3</sup>à gonadectomia.

Fonte: elaborado pelo autor.

conclusão

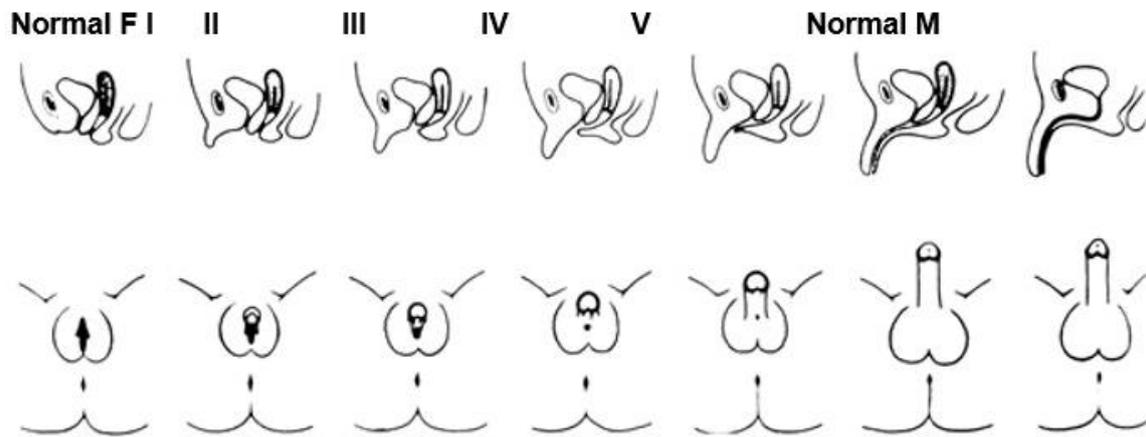
Tabela 11 – Frequência absoluta (F e f) e prevalência (%) de pacientes com mosaicismos 45,X/46,XY com até 50% células com monossomia do X (45,X) ou mais de 50% de células dessa linhagem, ao estudo citogenético, de acordo com o cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY* (*nTSPY*) e com a proporção de células com gene *SRY* (*%SRY*), em relação ao controle endógeno *GAPDH*.

	Percentual de células 45,X				<i>p</i>
	Até 50%		> 50%		
	F	%	f	%	
<i>nTSPY</i>					
até 55 cópias	11	64,7%	4	23,5%	p=1,00
> 55 cópias	1	5,9%	1	5,9%	
<i>%SRY</i>					
até 50%	3	17,6%	5	29,4%	p<0,01
maior que 50%	9	52,9%	0	-	

Legenda: *%SRY*: percentual relativo de células com *SRY*, calculado por PCR quantitativo; *nTSPY*: cálculo relativo do número de cópias do gene *TSPY*; *p*: nível de significância; teste exato de Fisher.  
 Fonte: elaborado pelo autor.

## ANEXO II – SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO GENITAL

Figura 19 – Diferentes graus de virilização, de acordo com a escala desenvolvida por Prader, para pacientes femininos com Hiperplasia Adrenal Congênita: Estágio I: clitoromegalia sem fusão labial; Estágio II: clitoromegalia e fusão labial posterior; Estágio III: maior grau de clitoromegalia, orifício urogenital perineal único e fusão labial quase completa; Estágio IV: clitóris cada vez mais fálico, seio urogenital semelhante à uretra, na base do clitóris, e fusão labial completa; Estágio V: falus com meato uretral na extremidade, e proeminências labioescrotais semelhantes ao escroto (aparência de homens sem gônadas palpáveis).



Fonte: PRADER, 1954.

Tabela 12 – Escore de virilização baseado em pontuação atribuída a características anatômicas. O EMS (do inglês, *External Masculinization Score*) é baseado em características dos órgãos genitais externos; enquanto o IMS (do inglês, *Internal Masculinization Score*) nos órgãos genitais internos.

Característica	Pontuação	
	Sim	Não
<i>EMS</i>		
Fusão escrotal	3	0
Micropenis	0	3
Meatus uretral		
Normal	3	
Glandar	2	
Peniana	1	
Perineal	0	
Gônada direita e esquerda (cada)		
Escrotal	1,5	
Inguinal	1	
Abdominal	0,5	
Ausente	0	
<i>IMS</i>		
Útero	0	3
Tuba uterina direita e esquerda (cada)	0	2
Epidídimo direito e esquerdo (cada)	2	0
Vas deferens direito e esquerdo (cada)	2	0

Legenda: EMS: 0-12; IMS 0-15

Fonte: AHMED; KHWAJA; HUGHES, 2000.