

2.02.05 - Genética / Genética Humana e Médica

INVESTIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE CROMOSSOMO Y EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER

Heloísa Cristina da Silva^{1,6*}, Gabriela Maria de Andrade Correia^{2,4,6}, Rayane Ferreira da Silva^{3,6}, Diogo Lucas Lima Nascimento^{7,8}, Marshall Itallo Barros Fontes^{7,8}, Isabella Lopes Monlleó^{2,3,4,6,8}, Susane Vasconcelos Zanotti^{5,6}, Reginaldo José Petrolí^{2,4,6}

1. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – PPGCM
3. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS
4. Faculdade de Medicina – FAMED
5. Instituto de Psicologia - IP
6. Universidade Federal de Alagoas – UFAL
7. Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL
8. Hospital Universitário Professor Alberto Antunes – HUPAA - UFAL

Resumo

A Síndrome de Turner (ST) é um Distúrbio de Desenvolvimento Gonadal associado á anormalidades cromossômicas. É observada em aproximadamente 1:2.500 recém-nascidos do sexo feminino e ocorre devido a alterações numéricas ou estruturais envolvendo o cromossomo X. Casos de ST geralmente apresentam disgenesia gonadal, amenorreia primária ou secundária, baixa estatura, entre outros achados clínicos. Fragmentos do cromossomo Y, não identificados pelo cariótipo, podem ser observados em pacientes com ST através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esses fragmentos podem contribuir para o desenvolvimento de tumores gonadais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho consistiu na investigação da presença ou ausência de fragmentos de cromossomo Y, em 23 casos de ST, através da PCR convencional ou NESTED. Como resultado, 8,3% da casuística apresentou os fragmentos de Y aqui investigados. Desta forma, este trabalho complementou a abordagem diagnóstica dos casos de ST acompanhados no ambulatório de genética e psicanálise do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas. Além disso, os resultados alcançados contribuem para a ampliação do conhecimento das características clínicas, citogenéticas e moleculares dos casos de DDS de Alagoas.

Autorização legal: CAAE: 59929716.8.0000.5013, número do parecer: 1.753.489.

Palavras-chave: Diagnóstico; Desenvolvimento Gonadal; PCR.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFAL.

Introdução

Descrita pela primeira vez por Henry Turner em 1938, a Síndrome de Turner (ST) é um Distúrbio do Desenvolvimento Gonadal (DDG), classificada como Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) associado á anormalidades cromossômicas (LEE et al., 2016; MACIEL-GUERRA; GUERRA-JÚNIOR, 2019).

Como características clínicas, a ST está associada à baixa estatura, pescoço curto, *cubitus valgus*, baixa implantação dos cabelos na nuca, insuficiência ovariana primária, anomalias renais e cardiovasculares, dentre outros (TURNER, 1938; MANDELLI; ABRAMIDES, 2012; MARQUI, 2015, REIS, 2018). O diagnóstico é firmado através do cariótipo, devido a presença de um cromossomo X íntegro e ausência total ou parcial do segundo cromossomo sexual (MACIEL-GUERRA; GUERRA-JÚNIOR, 2019).

Segundo Dabrowski e colaboradores (2020), de 2% a 50% dos casos de ST apresentam tumores gonadais devido a presença de cromossomo Y ou parte dele, que não foram observados pelo cariótipo (DABROWSKI, JOHNSON, PATEL et al., 2020; OLIVEIRA, 2009; GRAVHOLT et al., 2017; HENTSCHKE MR, KIRA AT, PATELLA LH et al, 2019). Os fragmentos de Y podem ser identificados pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). A PCR é uma técnica sensível, eficaz, rápida e de baixo custo, mesmo em casos de mosaicismos de baixo grau, como pode ser observado em casos de ST (SILVA-GRECCO, 2016).

A investigação de fragmentos de Y em casos de ST pode atuar com método preventivo, auxiliar na conduta clínica, como o tratamento hormonal, além de proporcionar melhor prognóstico para os casos positivos, os quais podem ser submetidos a gonadectomia profilática.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a investigação de presença ou ausência de fragmentos Y em casos de ST, através da PCR. Os casos aqui analisados são acompanhados no ambulatório de genética e psicanálise do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (SGC/HUPAA/UFAL).

Metodologia

Trata-se de uma pesquisa observacional com amostra constituída por pessoas com diagnóstico clínico e citogenético de ST, atendidos no SGC/HUPAA/UFAL entre maio de 2008 e dezembro de 2020. Conforme critério de inclusão, que foi o diagnóstico citogenético de ST, independente da idade, foram incluídos 23 casos. Foram excluídos os casos 46,XX, 46,XY e casos que não apresentaram alterações numéricas ou estruturais no cromossomo X. O presente trabalho apresenta aprovação do comitê de ética da UFAL (CAAE: 59929716.8.0000.5013) e todos os participantes concordaram em participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento de Livre e Esclarecido (TCLE).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do HUPAA/UFAL, que consistiram na extração de DNA genômico de sangue periférico, pelo método fenólico, realizado em duas etapas. Na primeira etapa, utilizou-se soluções para lise das hemácias e digestão de proteínas. Já na segunda etapa, realizou-se a purificação fenólica seguida de precipitação do DNA com acetato de sódio e etanol absoluto, conforme padronizado no LGMH/HUPAA/UFAL (SAMBROK, 1989). Os DNAs extraídos foram quantificados e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8%. Para a amplificação dos marcadores de cromossomo Y: XES, DYZ3, TSPY através da PCR convencional e da PCR NESTED, foi utilizado 100 nanogramas de DNA genômico. Ambas as PCRs foram padronizadas utilizando controles 46,XX e 46,XY. Considerou-se padronizada a amplificação do fragmento cujo amplicon foi observado somente no controle 46,XY. Todos os experimentos, desde a coleta da amostra de sangue periférico para extração de DNA até as PCRs, foram realizados por pessoas do sexo feminino. Esse cuidado faz-se necessário para evitar contaminação das amostras por células 46,XY.

Após a padronização dos fragmentos acima citados, o passo seguinte foi a investigação dos fragmentos nos casos que compõem a casuística deste trabalho. Primeiro foi realizada a PCR convencional de todos os casos. Para os casos que não revelaram os fragmentos investigados, foi realizada a PCR NESTED, com primers internos aos utilizados na PCR convencional. Os casos que revelaram os fragmentos através da PCR convencional, não foram submetidos a PCR NESTED. Todas as PCRs foram realizadas com controles 46,XX, 46,XY e controle branco. Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 1%, no qual foi observado

a presença ou ausência do fragmento de interesse, com auxílio de marcador de peso molecular. Por fim, os géis foram fotografados e arquivados para análises dos resultados.

Resultados e Discussão

A ST é uma das principais anormalidades cromossômicas em humanos, observada em aproximadamente 1:2.500 nascimentos femininos. O fenótipo varia amplamente, porém baixa estatura e hipogonadismo hipergonadotrófico sem ambiguidade genital são características distintivas. Citogeneticamente, caracteriza-se pela monossomia total (45,X) ou parcial do cromossomo X. A presença de material derivado do cromossomo Y é um importante fator prognóstico visto que eleva o risco de neoplasias gonadais.

Neste trabalho, foram investigados 23 casos, as idades variaram 9 meses a 42 anos, os cariótipos compreenderam 45,X (54,2%), mosaicismo (29,1%), isocromossomo (12,5%) e deleção (4,2%). Segundo a literatura, cerca de 50% a 70% dos casos apresentam monossomia do X e, neste trabalho, observamos que 54,2% apresentaram esse cariótipo, dados concordantes com a literatura (BISPO, 2015; OLIVEIRA et al., 2009; BISPO, 2011; MACIEL-GUERRA; GUERRA-JÚNIOR; 2019).

Como dito anteriormente, pacientes com ST podem apresentar cromossomo Y em sua constituição cromossômica, que pode contribuir para o desenvolvimento de gonadoblastomas e/ou disgerminomas - tumores gonadais (GRAVHOLT et al., 2017; HENTSCHE MR, KIRA AT, PATELLA LH et al, 2019). Neste trabalho, dois casos de ST (8,3%) apresentaram os fragmentos de Y, sendo uma lactente 45,X[50], que durante o exame físico foi identificado: pescoço “alado” com baixa implantação dos cabelos na nuca (em formato de tridente), palato alto, tórax largo com pectus excavatum, orelhas com baixa implantação, hipertensão e coarctação aórtica com persistência do canal arterial. Esse caso apresentou os quatro fragmentos de Y através da PCR convencional. Já o outro caso, tinha 9 anos na primeira consulta e cariótipo 46,X,i(X)(q10)[40]. Durante o exame físico, foi identificado baixa estatura, palato estreito, tórax largo e unha de implantação profunda. Esse caso revelou somente o fragmento SRY através da PCR NESTED.

Sendo assim, a investigação de fragmentos de cromossomo Y nesses casos, a fim de definir uma melhor conduta terapêutica e melhor prognóstico, se faz necessária. Para casos de presença de fragmento Y, segundo a literatura, a gonadectomia preventiva é indicada (MACIEL-GUERRA; GUERRA-JÚNIOR; 2019). Segundo Barbosa e colaboradores (2021), a realização da técnica de investigação de fragmentos do cromossomo Y ajudou na conduta profilática de detecção de gonadoblastoma em 12,8% dos sujeitos participantes do estudo (total amostral de 109). Além disso, a investigação de cromossomo Y através da PCR ajuda na elucidação dos casos de mosaicismo, ainda de acordo como mesmo autor (Barbosa et al., 2021).

Neste trabalho, 91,7% da casuística não revelaram os fragmentos de Y através das PCRs convencional e NESTED, o que não se descarta a presença desses fragmentos, uma vez que os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho podem não ter flanqueado as regiões de Y que o paciente apresenta. Para esses casos, a técnica denominada análise de fragmento em analisador genético será utilizada como complemento da abordagem diagnóstica.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura, onde 4% a 60 % dos casos de ST apresentam Y em sua constituição cromossômica (Araújo et al., 2008; Marqui et al., 2015). A investigação dos fragmentos de Y foi incorporada como rotina para todos os casos de ST atendidos no SGC/HUPAA/UFAL, complementando a abordagem diagnóstica, o tratamento e o aconselhamento genético para os casos de ST atendidos pelo SUS em Alagoas. Além disso, os resultados deste projeto contribuem para a ampliação do conhecimento das características clínicas, citogenéticas e moleculares dos casos de DDS de Alagoas.

Referências bibliográficas

- ARAÚJO, C. et al. Molecular identification of chromosome Y sequences in Brazilian patients with Turner syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 24:713-7, 2008.
- BARBOSA, Lene Garcia et al. Reconhecimento do cromossomo Y na síndrome de Turner usando sangue periférico ou tecido da mucosa oral. *Anais de endocrinologia e metabolismo pediátrico* vol. 26,4 (2021): 272-277.
- BISPO, Adriana Valéria Sales. SÍNDROME DE TURNER: ESTUDO CROMOSSÔMICO E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO METABOLISMO DO FOLATO COMO FATORES DE RISCO NA NÃO-DISJUNÇÃO. 2011. Dissertação (PósGraduação em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2011.
- BISPO, Adriana Valéria Sales. Investigação De Mosaicismo Críptico E Potenciais Fatores De Riscos Para A Não Disjunção Cromossômica Na Síndrome De Turner. 2015. Tese (Programa de Pós Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2015.
- DABROWSKI E, JOHNSON EK, PATEL V, et al. Síndrome de Turner com cromossomo Y: telarca espontânea, menarca e risco de malignidade. *J Pediatr Adolesc Gynecol* . 2020; 33 (1): 10-14. doi: 10.1016 / j.jpag.2019.08.011
- GRAVHOLT, C. H. et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting *European Journal of Endocrinology.* v. 177, n 3. p. G1-G70, 2017.
- HENTSCHKE MR, KIRA AT, PATELLA LH et al. Gonadoblastoma bilateral em paciente com mosaicismo de síndrome de Turner: relato de caso e revisão de literatura. *FEMINA* , [S. l.], p. 1-6, 12 out. 2019.
- LEE, Peter A. et al. Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions, Approach and Care. *HORMONE RESEARCH IN PÆDIATRICS* , [S. l.], p. 1-23, 28 jan. 2016.
- MACIEL-GUERRA, A. T; GUERRA-JUNIOR, G. MENINO OU MENINA? DISTÚRBIOS DA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO. 3. ED. V. 1. CURITIBA: APPRIS, 2019.
- MANDELLI, Suhamy Aline; ABRAMIDES, Dagma Venturini Marques. Manifestações clínicas e fonoaudiológicas na Síndrome de Turner: estudo bibliográfico. *Revista CEFAC*, [S. l.], p. 1-10, 1 fev. 2012.
- MARQUI, A. B. T. et al. Prevalência de sequências do Y e de gonadoblastoma em síndrome de Turner. *Rev Paul Pediatr.*34 (1):114-121, 2015.
- OLIVEIRA, Rose Mary Rocco de et al. Cromossomo Y na síndrome de Turner: revisão da literatura. *São Paulo Med. J.*, São Paulo, v. 127, n. 6, pág. 373-378, novembro de 2009.
- RATTO, Marcelo B.; SANTORO, Renata I.; LEMOS-MARINI, Sofia H. V.; MACIEL GUERRA, Andréa T. Alterações cardiovasculares na Síndrome de Turner e correlação cariótipo-fenótipo. *Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP*, Campinas, SP, [S. l.], p. 1-1, out. 2019.
- REIS, Carolina Trombeta. Importância da altura na qualidade de vida relacionada à saúde na Síndrome de Turner. 2018. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 2018.
- Sambrook, E.F. Fritsch, T.E. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- SANTOS, Luana Oliveira dos. Avaliação de genes relacionados a resposta imune em pacientes com Síndrome de Turner. 2018. Tese de doutorado (PósGraduação em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2018.
- SILVA-GRECCO, R. L. et al., Identification of Y-Chromosome Sequences in Turner Syndrome. *Indian J Pediatr.* 83(5):405–409, 2016.
- TURNER HH. A SYNDROME OF INFANTILISM, CONGENITAL WEBBED NECK, AND CUBITUS VALGUS. *ENDOCRINOLOGY* 1938; 23: 566-74.
- WANDERLEY, Miriam da Silva; SILVA, Fabyanne Mazutti da; LOPES, Bárbara Amerquídia; FIDELES, Cecília Ramos. Síndrome de turner e gravidez: implicações clínicas, legais e éticas na utilização de técnicas de reprodução assistida. *Revista Brasília Médica*, [S. l.], p. 1-1, 2014.