

ENSAIOS GENÉTICOS EM PACIENTE COM INDICAÇÃO CLÍNICA DE DISGENESIA GONADAL: RELATO DE CASO*

CRISTIANO LUIZ RIBEIRO, GUSTAVO PINTO SILVA, CLÁUDIO CARLOS DA SILVA, APARECIDO DIVINO DA CRUZ

Resumo: disgenesia gonadal é uma anomalia com aspectos variáveis. O objetivo deste foi realizar o cariótipo e ensaios moleculares em paciente com manifestações clínicas associadas à disgenesia gonadal. As técnicas citogenéticas convencionais e moleculares revelaram um cariótipo 46,XY com o gene SRY positivo. A PCR amplificou o gene SRY e os éxons 1 e 4 do gene AR. A disgenesia gonadal pura XY foi estabelecida com observações clínicas à anamnese associadas aos resultados dos teste genéticos realizados.

Palavras-chave: Citogenética. Cariótipo. Disgenesia gonadal.

O presente relato descreve uma paciente de dois anos de idade, apresentando características fenotípicas do sexo feminino, hérnia inguinal, gônadas disgenéticas, ausência de ambiguidade genital e cariótipo 46,XY o que pode ser caracterizado como um caso clínico de disgenesia gonadal (NUSSBAUM, 2002).

A disgenesia gonadal compõem um amplo espectro clínico de anomalias com fenótipo variável, de feminino a ambíguo ou masculino. Tais manifestações podem estar associadas ao desenvolvimento puberal comprometido ou ausente, além do cariótipo contendo ou não, o cromossomo Y (SCOLFARO *et al.*, 2003; DE MELLO MP *et al.*, 2005).

Os processos envolvidos na determinação e diferenciação sexual estão diretamente associados à presença ou à ausência do cromossomo Y no cariótipo do indivíduo (JACOBS *et al.*, 1999; FORD *et al.*, 1999). O principal processo na determinação sexual é a especialização das gônadas, sendo que as demais diferenças entre os sexos são efeitos secundários devido às ações de hormônios produzidos por elas (JOST *et al.*, 1973).

Entre os genes mais estudados e importantes no processo de especialização das gônadas, destaca-se o gene SRY (Sex Region of Y chromosome), constituído por um único éxon e codifica uma proteína de 79 aminoácidos. A proteína SRY exibe alta homologia com proteínas nucleares não histônicas como, por exemplo, as proteínas de alta mobilidade HMG1 e HMG2 (High Mobility Group) (BEHLKE *et al.*, 1993; SU *et al.*, 1993).

A proteína SRY é responsável por uma ligação que altera a estrutura da cromatina e o dobramento da molécula de DNA, interferindo na regulação da expressão gênica de vários genes associados com o desenvolvimento sexual normal, atuando como um fator de transcrição. Aproximadamente de 10 a 15% das mulheres com cariótipo 46,XY têm mutações de ponto no gene SRY, e em alguns casos podem apresentar uma translocação do gene SRY para o cromossomo X, enquanto que de 10 a 15% apresentam deleção total do gene SRY. Essas alterações gênicas são estão associadas com a disgenesia gonadal pura XX ou XY e disgenesia gonadal completa (SINCLAIR *et al.*, 1990; FERRARI *et al.*, 1998; GIESE *et al.*, 1992).

O termo Disgenesia Gonadal Pura (DGP) é aplicado a indivíduos fenotipicamente femininos, sem ambiguidade genital, com presença de derivados mullerianos, gônadas disgenéticas e cariótipo 46,XX ou 46,XY, sendo classificadas em DGP XX ou DGP XY, respectivamente (MACIEL-GUERRA *et al.*, 2002).

Quanto à etiologia da DGP XY existem relatos que indicam a herança recessiva ligada ao cromossomo X ou autossômica dominante com expressão limitada ao sexo masculino (SIMPSON *et al.*, 1990).

Outro gene importante na determinação sexual normal é o Receptor de Andrógeno (AR). Os principais andrógenos circulantes em mamíferos são a testosterona e seu derivado 5-alfa-reduzido, a dihidrotestosterona, que atuam no mesmo receptor. A ação dos andrógenos é mediada por um receptor androgênico que é codificado pelo gene AR localizado na região Xq11-12. O gene AR é constituído por 8 exons que codificam uma proteína de 110KDa (LUBAHN 1 *et al.*, 1988).

Distúrbios na função do receptor de andrógenos resultam em diferentes afecções, dentre elas a síndrome de insensibilidade aos andrógenos (AIS - Androgen Insensitivity Syndrome), atrofia muscular bulbar espinhal (SBMA - Spinal and Bulbar Muscular Atrophy ou Doença de Kennedy) e também pode estar relacionado com o surgimento com câncer de próstata.

A AIS é uma condição rara com incidência estimada entre 1:40.000 e 1:90.000, com herança recessiva ligada ao cromossomo X. Esta síndrome é causada por mutações no gene do AR e apresenta um amplo espectro de fenótipos, variando desde o fenótipo feminino (forma completa - CAIS) a fenótipos com graus variáveis de virilização (forma parcial - PAIS), ou mesmo apenas esterilidade (BRINKMANN *et al.*, 2001; BOEHMER *et al.*, 2001).

A CAIS foi descrita inicialmente como síndrome dos testículos feminilizantes e é caracterizada pela presença de genitália externa feminina, vagina ausente ou curta terminando em fundo cego, genitália interna com ausência dos derivados dos dutos de Wolff e de Muller, desenvolvimento de ginecomastia na puberdade e ausência de pêlos pubianos ou axilares, os testículos estão localizados na região abdominal ou na região inguinal (CORRÊA *et al.*, 2005).

O objetivo deste foi realizar o cariótipo e ensaios moleculares em paciente com manifestações clínicas associadas à disgenesia gonadal.

MÉTODOS

Amostras de sangue periférico heparinizado foram submetidas à cultura de linfócitos T a curto prazo, conforme protocolos convencionais para a obtenção de metáfases (VERMA; BABU, 1989).

Após a cultura, a suspensão de células foi gotejada sobre vapor de banho-maria a 60°C, em lâminas limpas e desengorduradas. Para a análise do cariótipo por bandas G (método GTG), as lâminas foram envelhecidas por sete dias e posteriormente tratadas em solução de tripsina (Gibco) diluída em tampão PBS (Gibco) a 0,25% e coradas em solução Giemsa (Gibco) a 4%. Para a análise cromossômica, as metáfases foram capturadas com auxílio de microscopia de luz motorizada e analisadas pelo software IKaros® (Metasystems Corporation, Alemanha).

A técnica de FISH (Fluorescente in situ Hybridization) foi realizada como ferramenta auxiliar do diagnóstico citogenético molecular. Foram utilizadas sondas de DNA (WCP® – Whole Chromosome Probe – Vysis, Alemanha), que hibridam o cromossomo Y inteiro, com fluorescência verde. Posteriormente foi realizado FISH para o gene SRY, utilizando sonda de sequência única para a região Yp11.3 (LSI® - Locus Sequence Identify – Vysis, Alemanha). As metáfases e núcleos interfásicos foram contracorados por DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). Para análise da fluorescência, as imagens foram capturadas com uma microscopia epifluorescente, utilizando-se os filtros específicos e analisadas com auxílio do software Isis® (Metasystems Corporation, Alemanha). O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total heparinizado (1mL) utilizando kit de extração Wizard® (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega Corporation, EUA). Posteriormente, o DNA extraído foi submetido a PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando o par de primers para identificação da região do único éxon do gene SRY e primers de identificação para os exons 1 e 4 do gene AR. Como controle positivo para DNA humano, um par de primers do gene ZFX/Y foi incluído na reação. A sequência dos primers e o tamanho esperado de seus produtos amplificados para o presente estudo encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências de *primers* utilizados na investigação do gene *SRY*, dos exons 1 e 4 do gene *AR* e do gene *ZFX*, indicando o tamanho do amplicon esperado

Gene	Amplicon (pb)
<i>SRY</i>	472
AR (éxon 1)	528
AR (éxon 4)	128
<i>ZFX</i>	495

As reações de PCR foram realizadas utilizando tampão 10X (*Invitrogen*), 3μM MgCl₂, 0,5μM de cada *primer*, 4μM de dNTP (*Invitrogen*), 0,5μM de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*) e 2,0μM de DNA. A tabela 2 indica o protocolo de termociclagem utilizado.

Tabela 2: Protocolo de termociclagem utilizado para o conjunto de *primers* com suas respectivas temperaturas e tempo do ciclo

CICLOS	FASES	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (MIN)
1	Desnaturação inicial	94	7
1	Desnaturação	94	7
35	Anelamento	50-60	1
1	Extensão	72	1
1	Extensão	72	7
A	Repouso	4	∞

Ao final da reação de PCR os amplicons foram armazenados a -20°C. Os produtos de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de Agarose 1,5%, sob um campo elétrico uniforme de 10V/cm, em TBE 1X por 2 horas. Ao final da corrida os géis foram corados com brometo de etídeo (*Invitrogen*) 5mg/mL, em TBE 1X, por 15 minutos. As imagens foram capturadas pelo Sistema de Vídeo Foto Documentação (VDS[®] - *Video Documentation System – General Electrics*) e os resultados analisados pelo *software* TotalLab[®] versão 1,1 (*General Electrics*).

RESULTADOS

Os resultado obtido através da análise citogenética convencional, revelou um cariótipo 46,XY conforme apresentado na Figura 1,

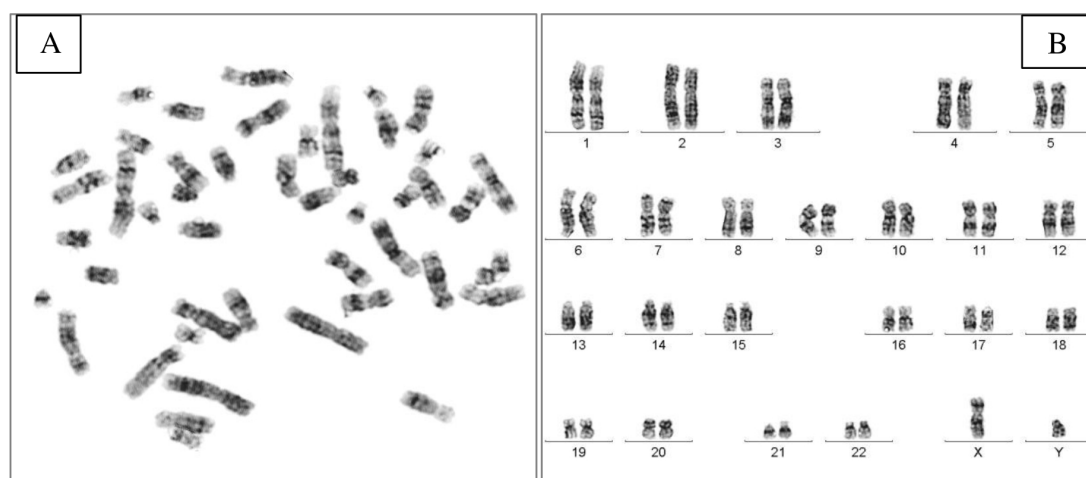


Figura 1: Em (A) metáfase e (B) pareamento cromossômico do indivíduo com indicação clínica de disgenesia gonadal e que apresentou o cariótipo 46,XY

Fonte: Imagens cedidas pelo laboratório LaGene – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular – Lacen – Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cyneiros - SES – Secretaria da Saúde do Estado de Goiás.

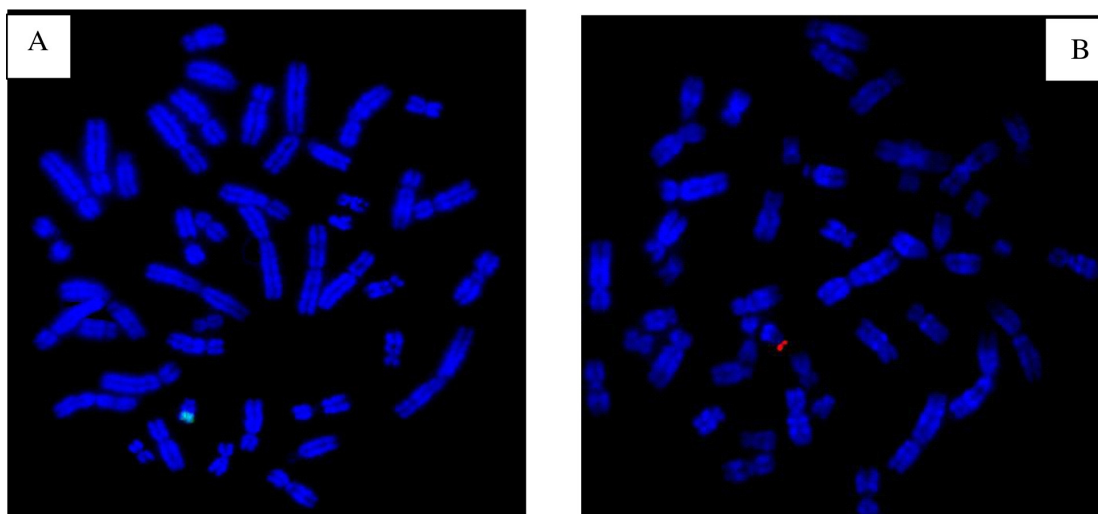


Figura 2: Técnica de FISH em células metafásicas. Em (A) presença do cromossomo Y e em (B) presença do gene *SRY* no cromossomo Y

Fonte: Imagens cedidas pelo laboratório LaGene – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular – Lacen – Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cyneiros - SES – Secretaria da Saúde do Estado de Goiás.

A citogenética molecular (FISH) confirmou a presença do cromossomo Y e do gene *SRY* no cromossomo Y, conforme indicados na Figura 2, em 100% das células analisadas.

Os resultados moleculares através do uso da PCR revelaram uma amplificação dos genes *SRY* e dos exons 1 e 4 do gene *AR* presente no cromossomo X. O gene *ZFX* usado como controle da reação também foi amplificado e estão indicados na Figura 3.

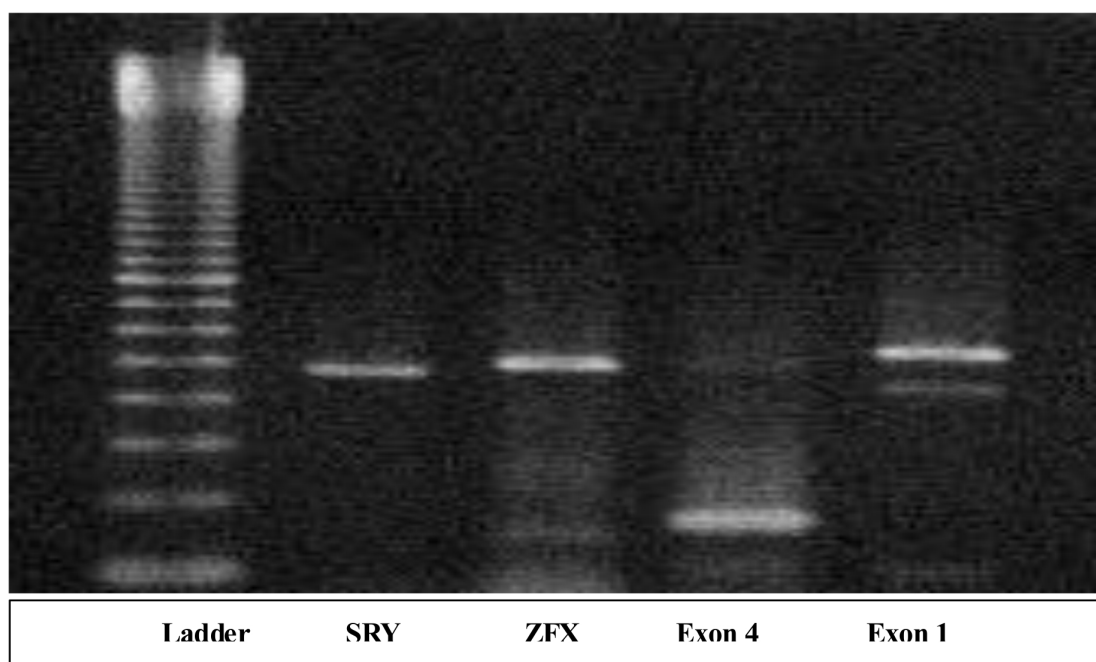


Figura 3: Amplificação por PCR do Ladder e respectivamente dos genes: *SRY*, *ZFX* e exons 1 e 4 do gene *AR*
Fonte: Imagens cedidas pelo laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon – Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

DISCUSSÃO

Após o cariótipo analisado compatível com o sexo masculino, apresentando notação cariotípica 46,XY e presença do gene *SRY* no cromossomo Y em todas as células

analisadas e também a presença dos exons 1 e 4 do gene *AR* identificados por estudos genéticos moleculares associados às manifestações clínicas observadas à anamnese, permitiu-se determinar o diagnóstico de DGPXY na paciente com características fenotipicamente do sexo feminino.

Neste caso, a ausência do fenótipo masculino pode estar relacionada com possíveis mutações no gene *SRY* que não foram identificadas e/ou alterações pós-traducionais da proteína *SRY*, o que podem ser alguns dos fatores determinantes na redução da ação proteica como fator de transcrição gênica no período gestacional, sendo quando ocorre a diferenciação sexual do indivíduo para o sexo masculino. Adicionalmente, em situações de proteína *SRY* normal, o fenótipo masculino está associado à ação de produtos de outros genes envolvidos na diferenciação testicular normal.

A síndrome de insensibilidade aos andrógenos é um distúrbio raro ligado ao cromossomo X, desta forma torna-se necessário ressaltar a importância de serem analisados não só os exons 1 e 4, mas sim os outros seis exons que participam da composição do gene *Receptor de Andrógeno*, porque, mutações causadas neste gene estão associadas a uma grande variedade de fenótipos nos indivíduos com DGPXY.

Os testes citogenéticos convencional e molecular, associados aos métodos moleculares de análise do DNA constituem uma excelente ferramenta para o diagnóstico de doenças genéticas relacionadas aos mecanismos de determinação sexual. Ressaltamos a importância do diagnóstico precoce de DGPXY, pois os portadores, normalmente diagnosticados tardiamente no período da puberdade, apresentam um risco de 20 a 30% de desenvolvimento de tumores gonadais histologicamente classificados como gonadoblastomas e/ou disgerminomas, o que pode ter consequências ainda mais graves para a paciente. A possibilidade de alterações genéticas acrescentam componentes adicionais à conduta clínica e a responsabilidade médica.

O aconselhamento genético é imprescindível e deve ser realizado. É necessário haver uma discussão de forma multidisciplinar entre os profissionais envolvidos com o tratamento e orientação sobre o distúrbio de determinação e diferenciação sexual, buscando oferecer informações detalhadas sobre a condição da paciente e esclarecimento a seus familiares.

GENETIC TESTING IN GONADAL DYSGENESIS: A CASE REPORT

Abstract: gonadal dysgenesis is a disorder with variable features. The aim of this was to make a karyotype, and molecular studies in patients with clinical manifestations associated with gonadal dysgenesis. The conventional and molecular cytogenetic techniques revealed a karyotype 46, XY with positive SRY gene. The PCR amplified the SRY gene and exons 1 and 4 of the AR gene. The XY pure gonadal dysgenesis was established with clinical observations on the history associated with the results of genetic testing conducted.

Referências

- BEHLKE, M.A. et al. Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics*;17: 736-9; 1993.
- BOEHMER, A.L. et al. Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*;86:4151-60, 2001.
- BRINKMANN, A.O. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*;179:105-9, 2001.
- CORRÊA, R.V. Insensibilidade completa aos andrógenos em pacientes brasileiras causada pela mutação P766A no gene do receptor androgênico. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.49 no.1 São Paulo Jan./FEB, 2005.
- DE MELLO, M.P.; ASSUMPÇÃO, J.G; HACKEL, C. Genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.49 no.1 São Paulo Jan./Feb; 2005.
- FERRARI, S. et al. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *Eur J Mol Biol*;11:794-802,1998.
- GIESE, K; COX, J; GROSSCHEDL, R. The HMG domain of the lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*; 69:185-95, 1992.
- FORD, C.E. et al. A sex- chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*;1:711-3,1999.
- JACOBS, P.A et al. Chromosomal sex in the syndrome of testicular feminization. *Lancet*; 2:591-2,1999.
- JOST, A. et al. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res*; 29:1-41. 1973.
- NUSSBAUM, R.L; MCINNES, M.D.R; WILLARD, H.F. Genética Médica. Estudos de casos clínicos ilustrando fundamentos genéticos, Reversão Sexual. Guanabara Koogan; RJ. 6º edição; 2002.
- LUBAHN, D.B. et al. Sequence of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*;240:327-30, 1988.
- MACIEL-GUERRA, A.T; GUERRA-JÚNIOR, G. Menino ou menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2002.
- SCOLFARO, M.R; CARDINALI, I.A; GUERRA JÚNIOR, G.A. Importância da análise histológica morfométrica gonadal na identificação da gônada disgenética. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.47; no.2; SP; 2003.
- SU, H; LAU, Y.F.C. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet*; 52:24-38,1993.
- SINCLAIR, A.H. et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*; 3:2404-46, 1990.
- SIMPSON, J.L. Dysgenesis gonadal type XY. In: Buyse ML, editor. Birth defects. Cambridge:Blackwell Scientific Publications;p.806-7, 1990.
- VERMA, R.S.; BABU, A. Human Chromosomes: Manual of Basic Techniques. São Paulo: Pergamon, 1989.

* Recebido em: 05.03.2012. .
Aprovado em: 17.03.2012.

CRISTIANO LUIZ RIBEIRO

Programa de Pós-Graduação Lato Sensu em Genética / Núcleo de Pesquisas Replicon / Departamento de Biologia / Universidade Católica de Goiás, Goiânia (GO).

GUSTAVO PINTO SILVA

Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/ Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros / Secretaria da Saúde do Estado de Goiás, Goiânia (GO).

CLÁUDIO CARLOS DA SILVA

Programa de Pós-Graduação Lato Sensu em Genética / Núcleo de Pesquisas Replicon / Departamento de Biologia / Universidade Católica de Goiás, Goiânia (GO). Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/ Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros / Secretaria da Saúde do Estado de Goiás, Goiânia (GO).

APARECIDO DIVINO DA CRUZ

Programa de Pós-Graduação Lato Sensu em Genética / Núcleo de Pesquisas Replicon / Departamento de Biologia / Universidade Católica de Goiás, Goiânia (GO). Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/ Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros / Secretaria da Saúde do Estado de Goiás, Goiânia (GO).