



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**PREVALÊNCIA DO GENE *TSPY* EM PACIENTES COM ANOMALIAS DO
DESENVOLVIMENTO SEXUAL NO PARÁ**

LENA STILIANIDI GARCIA

Belém- Pará

2014

LENA STILIANIDI GARCIA

**PREVALÊNCIA DO GENE *TSPY* EM PACIENTES COM ANOMALIAS DO
DESENVOLVIMENTO SEXUAL NO PARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano.

BELÉM-PARÁ

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lena Stilianidi Garcia

PREVALÊNCIA DO GENE *TSPY* EM PACIENTES COM ANOMALIA DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL NO PARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano
Instituição: Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Caroline Aquino Moreira Nunes
Instituição: Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará

Prof. Dr. Marcelo de OliveiravBahia
Instituição: Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Cláudio Amorim (Suplente)
Instituição: Universidade Federal do Pará

Belém, 14 de abril de 2014

DEDICATÓRIA

Aos pacientes portadores ANOMALIAS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL e suas famílias pela honra de atendê-los e sem os quais este trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo que sou e pelo dom da Medicina que Ele me concedeu.

À minha amada mãe (*in memoriam*), Helena Stilianidi Garcia, meu modelo de ser humano de bem, minha bússola a direcionar-me no caminho da retidão de caráter, minha eterna inspiração.

À minha família recurso divino que me permitiu ser como sou agradeço por me entenderem os meus humores, os cansaços, as conquistas e as vitórias. Agradeço pelo apoio para que eu alcançasse meu aprimoramento profissional.

À amiga e colega de Mestrado, Katia Soares de Oliveira, com quem caminhei esta etapa da vida e que sempre esteve disponível para contribuir e incentivar esta trajetória.

À Eliene Ksam, pela disponibilidade em sempre ajudar, por organizar minha agenda profissional e sempre me incentivar a progredir nas minhas conquistas pessoais e profissionais.

Ao Laboratório de Citogenética Humana da UFPA pela realização e interpretação dos métodos moleculares.

Ao Prof. Dr. Rommel M. Rodrigues Burbano, pela orientação, pela paternidade científica sempre acolhedora, pela paciência e estímulo constante na realização deste trabalho.

À Professora, Doutora e amiga, Ana Paula Guimarães, pela delicadeza e assertividade com que burilou minha capacidade científica e me conduziu ao aprimoramento profissional ímpar. Minha gratidão eterna. Que Deus sempre abençoe o dom que a deu de ensinar.

“Até aqui nos ajudou o Senhor.” (I Samuel 7:12)

“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar, é aproximar-se de Deus.”

Pitágoras

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.

Paulo Freire

RESUMO

Pacientes portadores de Distúrbios da Diferenciação Sexual (DDS) apresentam maior risco de desenvolver neoplasias. As alterações neoplásicas mais frequentes nestes pacientes são: o gonadoblastoma, o carcinoma *in situ*/tumores de células germinativas intra-tubulares não-classificados. As células germinativas tipo II são as precursoras destas lesões na maioria dos casos. O gonadoblastoma é uma neoplasia benigna que não metastiza, mas pela alta prevalência e risco de evolução para as formas malignas de neoplasias gonadais, merece especial atenção. Em uma região próxima ao centrômero no braço curto do cromossomo Y, foi mapeado o gene *TSPY*, imputado como o gene do gonadoblastoma. Este gene expressa-se em grande quantidade nas células que constituem o gonadoblastoma. Foram avaliados 47 pacientes com DDS nos seus cariótipos e na pesquisa da prevalência do *TSPY* através da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR). As análises revelaram que 50% das pacientes com síndrome de Turner, mesmo sem o cromossomo Y, íntegro ou não, evidente no cariótipo, foram positivas para a presença do gene *TSPY*. Estes dados evidenciam a importância da investigação do referido gene no acompanhamento e orientação de gonadectomia em pacientes com DDS.

Palavras-chave: *gonadoblastoma, TSPY, anomalia do desenvolvimento sexual, criança e adolescente.*

ABSTRACT

Patients with disorders of sexual differentiation (DDS) present higher risk of neoplasias. The most common neoplastic changes in these patients are: the gonadoblastoma, carcinoma in situ and cell germ tumors of intra-tubular unclassified. The type II germ cells are precursors these lesions in most cases. The gonadoblastoma is a benign tumor that no metastasizes, but the high prevalence and risk of progression to malignant forms of gonadal neoplasms, deserves special attention. In a close to the centromere on the short arm of the Y chromosome region, the *TSPY* gene was isolated, counted as the gonadoblastoma gene. Expressed in large amounts in cells that constitute the gonadoblastoma. DDS 47 patients were evaluated in their karyotypes and research investigated the prevalence of *TSPY* PCR. The analysis revealed that 50% of patients with Turner syndrome, even without the Y chromosome, righteous or not, evident in the karyotype, were positive for the presence of the *TSPY* gene. Evidencing the importance of the gene in the monitoring and guidance of gonadectomy in patients with DDS.

Key-words: gonadoblastoma, *TSPY*, disorders of sexual development, children and adolescent.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
FIGURA 1. Representação esquemática do cromossomo Y mostrando a localização do gene <i>TSPY</i> .	10
FIGURA 2. Fluxograma da coleta dos dados.	16
FIGURA 3. Análise da amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase.	18
FIGURA 4. Distribuição dos pacientes em estudo de acordo com a anomalia do desenvolvimento sexual apresentada.	21
FIGURA 5. Percentual de pacientes com <i>TSPY</i> positivos.	23
FIGURA 6. Percentual de pacientes com <i>TSPY</i> conforme a faixa etária.	26
FIGURA 7. Percentual de pacientes com <i>TSPY</i> positivos relacionado ao cariótipo com mosaico.	28

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Nova classificação de DDS de acordo com Lee <i>et al.</i> (2006).	2
Tabela 2. Apresentação dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>TSPY</i> , com a respectiva temperatura de anelamento.	17
Tabela 3. Características demográficas dos pacientes em estudo, Belém/PA.	20
Tabela 4. Associação entre as Patologias dos pacientes em estudo e a presença ou ausência do gene <i>TSPY</i> , Belém/PA.	22
Tabela 5. Associação entre características genéticas dos pacientes em estudo e a presença do gene <i>TSPY</i> , Belém-PA.	24
Tabela 6. Associação entre o sexo de criação dos pacientes estudados e a presenças ou ausência do gene <i>TSPY</i> .	25
Tabela 7. Associação entre as características genéticas dos pacientes em estudo e a presença do gene <i>TSPY</i> , Belém-PA	27

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADS: anomalia do desenvolvimento sexual
- CDC: Center for Disease Control and Prevention
- CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
- DDS: Distúrbios da Diferenciação Sexual
- DNA: Ácido dextrorribonucléico
- DG: Disgenesia Gonadal
- DGM: Disgenesia Gonadal Mista
- DGP: Disgenesia Gonadal Pura
- GD: gonadoblastoma
- GBY: locus do gonadoblastoma no cromossomo Y
- HV: Hermafrodita Verdadeiro
- ICS: Instituto de Ciências da Saúde
- IA: Insensibilidade Androgênica
- IAC: Insensibilidade Androgênica Completa
- IAP: Insensibilidade Androgênica Parcial
- HFSCMP: Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PCR: Reação em cadeia de polimerase
- ST: síndrome de Turner
- STSs (*sequence tagged sites*)
- TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido
- UFPA: Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	RELAÇÃO ENTRE DDS E PRESENÇA DE TUMORES GONADAIS	4
1.2	FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DO GONADOBLASTOMA EM PACIENTES COM DDS	6
1.3.	EVIDÊNCIAS GENÉTICAS DO GONADOBLASTOMA	8
1.4	GENE <i>TSPY</i>	9
1.5	JUSTIFICATIVA	12
2	OBJETIVOS	13
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
3.1	TIPO DE PESQUISA	14
3.2	LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO	14
3.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO	14
3.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	14
3.5	COLETAS DE DADOS	15
3.6	CARIÓTIPO	16
3.7	EXTRAÇÃO DE DNA	17
3.8	DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>TSPY</i> PELA TÉCNICA DE PCR	17
3.9	ANÁLISE DE DADOS	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5	CONCLUSÃO	29
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
	ANEXOS	37

1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios de desenvolvimento sexual (DDS) ou Intersexo atingem cerca de 1:3000 a 1:1.500 nascidos (BIOSINK, 2006), e correspondem à condição na qual há um incompleto ou desordenado desenvolvimento genital e/ou gonadal que resultam em uma discordância entre o sexo genético, o sexo gonadal e o fenótipo sexual (GRUMBACH *et al*, 2003; HOUK *et al*, 2005; BIOSINSKI, H.A., 2006; HUGHES *et al*, 2006; HUGHES *et al*, 2007).

O desenvolvimento sexual nos mamíferos está relacionado com a presença ou ausência do cromossomo Y, e se inicia no momento da fertilização com o estabelecimento do sexo cromossômico do zigoto, sendo determinado pela interação entre genes, fatores transcricionais e receptores hormonais. A determinação e a diferenciação sexual ocorrem em etapas distintas e sequenciais, estando o desenvolvimento classicamente dividido em três etapas que consistem da Diferenciação (cromossomicamente estabelecido na fertilização), Diferenciação das Gônadas e Diferenciação Sexual secundária (resposta de inúmeros tecidos a hormônios produzidos pelas gônadas para completar a maturação sexual durante a puberdade). Deste modo, alterações ocorridas em um destes estágios podem resultar em DDS, especialmente em indivíduos com cariótipo 46, XY (GOODFELOW e DARLING, 1988; DOMENICE *et al*, 2002; HUGHES *et al*, 2006; GUERRA-JÚNIOR e MACIEL-GUERRA, 2007; DE-MELLO e SOARDI, 2010).

Uma variedade de eventos moleculares regula as etapas de determinação e diferenciação do sexo, como o desenvolvimento e a proliferação das células germinativas para a crista urogenital e a formação de testículos e ovários (BRENNAN e CHAPEL, 2004; MACLAUGHLIN e DONAHOE, 2004). Interações de vários genes envolvidos no complexo mecanismo da cascata da determinação sexual estão sendo gradualmente esclarecidos, porém já se sabe que durante o processo de maturação gonadal, as células germinativas perdem a expressão de genes da fase embriológica e começam a aumentar a expressão de outros genes, entre os quais o *TSPY*, indicando um maior grau de diferenciação nas linhagens das células germinativas masculinas (HONECKER *et al*, 2004).

A complexidade fisiopatológica que envolve o estudo de pacientes com DDS resulta em enorme variedade de apresentações clínicas que ao longo dos anos vêm sendo agrupadas em nomenclaturas que permitam uma homogeneização de termos para facilitar o entendimento do assunto. Outrora resumida no termo intersexo, atualmente, após o consenso de Chicago em 2006 (HUGHES *et al*, 2006), criou-se uma nomenclatura agrupando o termo DDS, seguida do achado cromossômico sexual proposto para homogeneizar os diagnósticos

nas publicações científicas e também para facilitar o estudo epidemiológico estatístico dentro deste instigante e desafiador campo de estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Nova classificação de DDS de acordo com Lee *et al.*(2006).

ESTRUTURAS	CARIÓTIPOS		
	46,XX	46,XY	OUTROS
OVÁRIOS	DDS 46,XX ovariano (PHF)	DDS 46,XY ovariano (-)	
TESTÍCULOS	DDS 46,XX testicular (Homem XX)	DDS 46,XY testicular (PHM)	
OVÁRIOS + TESTÍCULOS	DDS 46,XX ovario-testicular (HV)	DDS 46,XY ovario-testicular (HV)	DDS ovario-testicular (HV)
DISGENÉTICAS	DDS 46,XX disgenético (DGP XX)	DDS 46,XY disgenético (DG XY)	DDS disgenético (Turner & Klinefelter)
DISGENÉTICAS + TESTÍCULOS		DDS 46,XY disgenético (DG XY)	DDS disgenético (DGMista) (45,X/46,XY)

Assim, os DDS/XY, anteriormente chamados de Pseudohermafroditismo Masculino; os DDS/XX, chamadas de Pseudohermafroditismo Feminino; os DDS/ovitesticular, denominados Hermafroditas Verdadeiros (HV); os DDS/ alterações cariotípicas como 45,X e variantes; 47, XXY e variantes. Um dos grandes méritos da nomenclatura do Consenso é não estigmatizar os portadores de DDS com termos como Hermafroditas, Intersexo ou portadores de Genitália Ambígua.

Mesmo com a nomenclatura do Consenso de 2006, ainda agrupam-se patologias de manifestações clínicas bastante diversas entre si:

- DDS/XX: Hiperplasia Adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase com fenótipo de genitália externa ambígua, gônadas femininas normais, virilização; DDS/XX homem com sexo reverso, Disgenesia Gonadal Pura (DGP) XX;
- DDS/XY engloba: Insensibilidade androgênica completa e parcial, defeitos de síntese de testosterona, defeito de receptor de LH, deficiência de 5-alfa-redutase, Disgenesias Gonadais Pura XY. Cada um com apresentações clínicas bastante diversas desde fenótipo feminino normal até, vários graus de ambiguidade genital;
- DDS/ 45,X/46/XY para as Disgenesias Gonadais Mistas (DGM).

Em pacientes com formas específicas de distúrbios da diferenciação sexual, segundo o Consenso de Chicago para classificação e manejo destas condições, há um risco maior de desenvolvimento de neoplasias originárias das linhagens de células germinativas, mais especificamente de células germinativas tipo II. Paciente com DDS, XY com disgenesias testiculares com criptorquidia, sub-fertilidade ou infertilidade apresentam risco aumentado para desenvolver neoplasias gonadais (OOSTERHUIS *et al*, 2005).

As lesões precursoras das neoplasias de células germinativas tipo II são o Carcinoma *in situ*/ Neoplasia intra-tubular de células germinativas não classificadas e o gonadoblastoma. Estas são, portanto, as lesões pré-cancerígenas mais comuns nos pacientes com DDS e dependem do nível de diferenciação sexual da gônada para ocorrerem (SCULLY *et al*, 1970; SKAKKEBSEK, *et al*, 1972; COOLS, *et al*, 2005; JERSEMAEKERS, *et al*, 2005; DIECKMANN, *et al*, 2007; COOLS, *et al*, 2006).

O gonadoblastoma (GD) é uma neoplasia gonadal benigna, *in situ*, que não metastiza, sendo rara, e descrita pela primeira vez em 1953 por Scully (SCULLY *et al*, 1970). Porém em gônadas disgenéticas, intra-abdominais e em pacientes com cromossomo Y (íntegro ou seus fragmentos moleculares), o gonadoblastoma tem alto potencial de malignização (SCULLY *et al*, 1970; VERP *et al*, 1987; RUTGERS *et al*, 1991; CARCAVILLA *et al*, 2008). Essa neoplasia é composta por células germinativas intimamente misturadas a cordões de células sexuais em grupos ou ninhos circunscritos, geralmente com membrana basal hialina e com calcificações difusas ou focais (SCULLY, 1970). Entretanto, na metade dos casos, as células germinativas, sem o seu manto de células do cordão sexual, infiltram-se no estroma, para formar o germinoma (seminoma ou disgerminoma). Cerca de 17% dos germinomas que surgem de gonadoblastomas são bilaterais (SCULLY, 1970; SCULLY, 1981; RUTGERS *et al*, 1987; SIMPSON *et al*, 1990; RUTGERS, 1991).

A análise histopatológica do gonadoblastoma evidencia dois tipos de células: grandes células germinativas (como nos disgerminomas e nos seminomas) e pequenas células, que lembram células de Sertoli imaturas ou células da granulosa. Em 2/3 dos exames, observam-se células de Leydig. A invasão do estroma por grandes células germinativas com numerosas figuras mitóticas conferem ao gonadoblastoma uma característica mais agressiva e com potencial metastático (SCULLY, 1970; GRAVHOLT *et al*, 2000).

Os gonadoblastomas são encontrados quase que exclusivamente (96%) em gônadas disgenéticas de indivíduos 46,XY, mas também têm sido observado raramente em indivíduos com ausência do cromossomo Y (três casos com cariótipo 46,XX, um 45,X, dois 45,X/46,XX,

quatro com anomalias estruturais do X, um 46,XX,del(11p) e dois hermafroditas verdadeiros (SIMPSON, *et al*, 1990; KINDAL, *et al*, 2003).

Embora as sequências Y-específicas nem sempre sejam evidentes citogeneticamente, as gônadas disgenéticas de pacientes com estas sequências do cromossomo Y apresentam potencialidade para o desenvolvimento de tumores gonadais. O gonadoblastoma é o mais temido pela sua frequência. A detecção destas sequências por técnicas citogenéticas ou moleculares tem sido estimulada para nortear a indicação profilática de cirurgia para retirada das gônadas neste grupo de pacientes, uma vez que não são, em geral, tumores metastáticos e pela possibilidade de cura com a sua rescisão. (MACIEL-TREVAS, *et al*, 2005).

O diagnóstico do gonadoblastoma é um desafio, no entanto, uma vez identificado pelo seu potencial risco de malignização, há indicação de remoção profilática das gônadas. Apesar de não invasivo, 50% das amostras demonstram evidência de crescimento focal do componente germinativo e cerca de 10% dos germinomas/ seminomas que surgem neste contexto apresentam metástases. (SCULLY, 1970).

1.1 Relação entre DDS e presença de tumores gonadais

A incidência de tumores gonadais em pacientes com DDS, de um modo geral, é maior nos casos de indivíduos com gônadas disgenéticas e presença de cromossomos Y (íntegro ou não) na constituição genômica, ocorrendo em cerca de 30% das Disgenesias Gonadais Puras XY e em 9 a 25% das Disgenesias Gonadais Mistas. O tumor mais frequente é o gonadoblastoma que é observado quase exclusivamente nas gônadas disgenéticas (VERP *et al*, 1987; RUTGERS *et al*, 1991).

Em cerca de 8% dos casos, outros tumores malignos de linhagem germinativa ocorrem em associação com o gonadoblastoma, na mesma gônada ou na contralateral. São eles: o tumor de seio endodérmico, o carcinoma embrionário, o coriocarcinoma e o teratoma imaturo (RUTGERS *et al*, 1991). O gonadoblastoma desenvolve-se com mais frequência em gônadas intra-abdominais, ocasionalmente nas inguinais e raramente nas labioescrotais (RUTGERS *et al*, 1991).

A prevalência aumentada de neoplasias pode resultar da presença de tecido gonadal XY indiferenciado em um ambiente anormal (intra-abdominal). Essa hipótese é reforçada por observações de que a prevalência das neoplasias gonadais está aumentada também nas

gônadas disgenéticas 45,X/46,XY intra-abdominais, e ainda pelo achado de tumores em testículos criptorquídicos. (LIPAY *et al*, 2004).

Também pode ser destacado que durante o desenvolvimento embrionário as células germinativas XY dividem-se mais rapidamente do que as XX. Desse modo, as células germinativas XY, programadas inicialmente para um local de temperatura mais amena (na bolsa escrotal) e sob uma taxa metabólica mais baixa, devem responder a essa posição intra-abdominal anormal com um aumento na taxa metabólica e, conseqüentemente, com propensão a transformação neoplásica. (LIPAY *et al*, 2004). Os cariótipos mais frequentemente encontrados nos pacientes com gonadoblastomas são 46,XY, 45,X/46,XY e 45,X. Fenotipicamente, 80% dos pacientes são mulheres, mas em geral há discordância entre fenótipo e genótipo como nas insensibilidades androgênicas completas. A prevalência exata do gonadoblastoma não é conhecida, havendo descrições de incidência em torno de 55% nos pacientes com Disgenesias Gonadais Mistas, variando de 30 a 66% nas insensibilidades androgênicas e outras anomalias do desenvolvimento sexual com cariótipo XY. Cerca de 39% das pacientes com síndrome de Turner apresentam evidências moleculares do cromossomo Y quando pesquisadas por PCR (*polimerase chain reaction*) e a presença do Y predispõe os indivíduos a um risco de 7-10% de apresentarem gonadoblastomas. (LAU *et al*, 1999; MENDES *et al*, 1999; BRANT *et al*, 2006).

Em 1986, Troche e Hernandez encontraram gonadoblastoma ou disgerminomas em pacientes com menos de 10 anos com gônadas disgenéticas e também encontraram comprometimento bilateral em 38,6% dos 140 pacientes com disgenesia gonadal (TROCHE *et al*, 1986).

Quando Canto *et al* (2004) usaram a técnica da PCR para investigar sequências específicas do cromossomo Y em pacientes com síndrome de Turner e com cariótipo 45,X obtido a partir de cultura de linfócitos por punção de sangue periférico, eles identificaram material do cromossomo Y em 9,3% dos casos. Foi indicada gonadectomia profilática e das seis pacientes que concordaram em se submeter a este procedimento cirúrgico, duas (das seis pacientes que tiveram as gônadas retiradas) apresentaram gonadoblastoma na análise histopatológica, o que indicou uma incidência de 33%.

1.2 Frequência e distribuição do Gonadoblastoma em pacientes com DDS

Os gonadoblastomas são mais frequentemente observados na segunda década de vida, a menos que a neoplasia ocorra em testículos criptorquídicos. Em um caso, um disgerminoma foi diagnosticado logo após o nascimento. Cerca de 20% surgem de gônadas disgenéticas e 18% de testículos disgenéticos criptorquídicos; em 60% dos casos, a estrutura original da gônada é oculta pelo tumor e, portanto, de tipo indeterminado (SCULLY, 1970). Uma revisão da literatura mostrou que em 94% dos casos de neoplasias em gônadas disgenéticas foram diagnosticados antes dos 30 anos de idades, a maioria na secunda década de vida (TROCHE *et al*, 1986).

Os gonadoblastomas podem estar associados a disgerminomas (50%) e a outros elementos malignos de células germinativas (10%) (SCULLY, 1970; KILDAL, *et al*, 2003), e o prognóstico clínico está relacionado à presença ou não desses elementos. Os gonadoblastomas puros não produzem metástases, ao contrário dos disgerminomas, que, apesar disso, respondem bem à radioterapia, sendo as recorrências pouco frequentes e tardias. Por outro lado, os carcinomas embrionários, tumores endodérmicos do sino, coriocarcinoma e teratomas imaturos são extremamente malignos e geralmente letais se não tratados com quimioterapia múltipla (SCULLY, 1970).

A ocorrência de tumores gonadais (gonadoblastoma ou disgerminoma) em pacientes com Disgenesia Gonadal Pura (DGP) com cariótipo XY é de aproximadamente 30%, com base em análises retrospectivas. A prevalência em casos familiares parece ser maior. Em 62 casos familiares, 38 indivíduos (58%) apresentaram tumores gonadais, primariamente gonadoblastomas ou disgerminomas. Verp e Simpson (1987) verificaram onze casos de tumores gonadais em 45 casos não familiares (24%). Os disgerminomas são os únicos tumores de células germinativas com uma incidência substancial de bilateralidade, que ocorre em 15% dos casos. A maior incidência de tumores em pacientes com disgenesia gonadal e presença de cromossomo Y pode estar relacionada a dois fatores:

(1) o tecido gonadal indiferenciado seria, pela sua própria natureza, mais propenso à transformação neoplásica, independente do mecanismo genético de origem da disgenesia da gônada;

(2) o gene que produz a disgenesia gonadal não apenas provocaria a ausência de células germinativas, mas também conferiria propriedades malignas, ou seja, a hipoplasia e a neoplasia gonadal seriam fenômenos relacionados.

O gonadoblastoma se desenvolve quase que exclusivamente em pacientes com distúrbios da diferenciação sexual, com evidência molecular do cromossomo Y ou com este cromossomo evidente no cariótipo. (DAMIANI & GUERRA-JÚNIOR, 2007; HUGHES, *et al*, 2006). Dados da literatura americana apontam que 80% dos pacientes que apresentam gonadoblastomas têm o fenótipo feminino e cerca de 10% são fenotipicamente masculinos. A incidência é de 55% nas Disgenesias Gonadais Mistas (DGM), cujo cariótipo é 45,X/46,XY; 30-66% nas Insensibilidades Androgênicas e pseudo-hermafroditismo masculino (DDS/XY) (TROCHE *et al*, 1986; RUTGERS *et al*, 1991).

Em um estudo de 15 pacientes com disgenesia gonadal e fenótipo feminino, Wallace e Levin (WALLACE *et al*, 1990) observaram tumores gonadais em sete. Dentre as gônadas que apresentavam malignidade, foram encontrados cinco gonadoblastomas, quatro disgerminomas e uma neoplasia maligna intratubular de células germinativas. Uma das pacientes apresentou, ainda, um tumor de estroma gonadal.

Em um estudo que avaliou uma série de 13 portadores de gonadoblastoma localizados a partir do diagnóstico anatomopatológico, 5 eram do sexo masculino; destes, 3 (46,XY) eram irmãos que tinham criptorquidia bilateral e presença de derivados müllerianos; 1 [46,X,+mar(Y+)] tinha criptorquidia bilateral e 1 (cariótipo não informado) tinha seminoma e calcificação focal, além de útero e tubas. Das 8 pacientes do sexo feminino, 1 era portadora de DGP XX e 2 eram portadoras de Síndrome de Turner. (COSTA, 2002).

A síndrome de Turner (ST) merece atenção pela frequência já observada de Gonadoblastomas, além de já ter sido revelado em estudos usando técnicas moleculares, segmentos do cromossomo Y em muitos pacientes. (OLIVEIRA, *et al*, 2009). Esta síndrome deve seu nome a Henry H. Turner que, em 1938, publicou a descrição da tríade *infantilismo sexual – pescoço alado – cúbito valgo* em sete pacientes do sexo feminino com baixa estatura. Posteriormente, demonstrou-se que, nessas pacientes, as gônadas são vestigiais e ocorre aumento da excreção de gonadotrofinas hipofisárias. A incidência da ST é estimada em torno de 0,47 por 1.000 ou 1 em cada 2.130 nativas. O número de recém-nascidas corresponde, porém, a uma pequena fração do total de conceptos com ST, uma vez que, embora 1 a 2% de todas as concepções humanas tenha a constituição cromossômica 45,X, cerca de 99% dos conceptos 45,X são abortados espontaneamente (BRANT, *et al*, 2006; BIANCO, *et al*, 2009).

Pelo potencial risco de malignização do Gonadoblastoma, nos pacientes com cromossomo Y íntegro ou de fragmentos do Y, com gônadas intra-abdominais ou inguinais, está indicada a remoção profilática destas gônadas disgenéticas (CARCAVILLA, 2010).

1.3 Evidências Genéticas do Gonadoblastoma

Os gonadoblastomas são encontrados quase que exclusivamente (96%) em gônadas disgenéticas de indivíduos 46, XY, mas também têm sido observados raramente em indivíduos com ausência do cromossomo Y (três casos com cariótipo 46,XX, um 45,X, dois 45,X/46,XX, quatro com anomalias estruturais do X, um 46,XX,del(11p) e dois hermafroditas verdadeiros (SIMPSON, *et al*, 1990; KINDAL, *et al*, 2003).

A prevalência aumentada de neoplasias pode resultar da presença de tecido gonadal XY indiferenciado em um ambiente anormal (intra-abdominal). Essa hipótese é reforçada por observações de que a prevalência das neoplasias gonadais está aumentada também nas gônadas disgenéticas 45,X/46,XY intra-abdominais, e ainda pelo achado de tumores em testículos criptorquídicos. Também pode ser destacado que durante o desenvolvimento embrionário as células germinativas XY dividem-se mais rapidamente do que as XX. Desse modo, as células germinativas XY, programadas originalmente para um local de temperatura mais amena (no escroto) e sob uma taxa metabólica mais baixa, devem responder a essa posição intra-abdominal anormal com um aumento na taxa metabólica e, conseqüentemente, com propensão à transformação neoplásica (SCULLY, 1970).

Os níveis elevados de gonadotrofinas *per se* provavelmente não são oncogênicos, considerando-se as baixas taxas de neoplasia em indivíduos 45,X. O gene mutante que determina a Disgenesia Gonadal Pura (DGP) XY, por exemplo, no SRY, poderia conferir diretamente a propensão para transformação neoplásica. Essa hipótese baseia-se na idade precoce de manifestação da neoplasia e na frequência relativamente alta de bilateralidade, características de tumores associados a mutações gênicas. Observou-se que os fibroblastos de pacientes com DGP XY, mas não daqueles com mosaicismo contendo linhagem 45,X, apresentam maior susceptibilidade à transformação após exposição ao SV40 (*simian papoma virus*). Apesar do mecanismo ser desconhecido, há ao menos três hipóteses vigentes:

(1) A mutação que determina a DGP XY poderia levar também ao surgimento de linhagens celulares aneuplóides nas células germinativas;

(2) O gene *mutante* poderia alterar os antígenos de superfície celular nas células embrionárias (SCULLY, 1970). BENNETT *et al.*, em 1991, fizeram diversas observações relevantes a esse respeito em camundongos;

(3) O gene mutado pode ser um supressor tumoral, seguindo o modelo proposto por Knudson *et al*, 1987. Essa hipótese pode ser sustentada pelo fato de que praticamente todos os

gonadoblastomas ocorrem em pacientes 45,X/46,XY ou com Disgenesia Gonadal Pura XY, sendo raramente observados em indivíduos 46,XX e uma única vez em um paciente com ataxia, telangiectasia, uma anomalia caracterizada por instabilidade cromossômica. Esses casos raros podem ser resultado de duas mutações sequenciais casuais, enquanto os demais casos seriam devidos a uma mutação somática precedida de uma deleção ou mutação pré-existente. O risco aumentado de desenvolvimento de gonadoblastoma em pacientes com gônadas disgenéticas e presença de material derivado do cromossomo Y na sua constituição cromossômica está bem estabelecido (SCULLY, 1970).

Petrovic *et al* (1992), descreveram o caso de uma menina com 12 anos de idade cujo cariótipo foi realizado devido à baixa estatura, sendo encontrado o mosaicismos 45,X/46,X,+mar. Esse marcador estava presente em 58% dos linfócitos periféricos analisados. A análise molecular com sondas Y-específicas mostrou a ausência do *SRY* e a presença de material correspondente ao restante do braço curto e ao centrômero, e o estudo com FISH também demonstrou que o cromossomo marcador era derivado do cromossomo Y. Na laparotomia foram encontradas gônadas disgenéticas e disgerminoma na gônada esquerda. Esse caso demonstrou que até mesmo um pequeno marcador derivado do cromossomo Y com material pericêntrico pode predispor a transformação neoplásica da gônada disgenética.

Salo *et al* (1995), usando vários STSs (*sequence tagged sites*) do cromossomo Y, avaliaram 2 pacientes com gonadoblastoma e pequeno cromossomo derivado de Y no cariótipo, identificando uma pequena região entre o centrômero (pDP97 em um intervalo de 4B) e um intervalo 5E proximal do braço longo do cromossomo Y (sY182), em uma região compreendendo 4Mb de DNA. Essa região coincide com a região do *GBY*, gene determinante de crescimento.

1.4 Gene *TSPY*

Uma vez que o risco aumentado de desenvolvimento de gonadoblastoma em pacientes com gônadas disgenéticas e presença de material derivado do cromossomo Y estava bem estabelecido, em 1987, Page (1987) postulou a existência de um gene no locus do gonadoblastoma no cromossomo Y (*GBY*) com esta função, sugerindo sua localização próxima ao centrômero ou no braço longo do cromossomo Y, portanto distinta da localização do *SRY*.

Em 1995 foi realizado um estudo onde os autores usaram várias sondas específicas do cromossomo Y para estudar casos de sexo reverso, gonadoblastoma e presença de cromossomo Y no cariótipo e segundo os autores (TSUCHIYA *et al*, 1995) o locus GBY estaria localizado em uma pequena região próxima ao centrômero, estimada em aproximadamente 1-2Mb. A análise indicou que tanto o *TSPY* (Ypter-p11.2) como o YRRM (*Y-chromosome RNA Recognition Motif* – Yq11) estavam presentes em todos os casos. (TSUCHIYA *et al*, 1995).

Assim, em uma pequena região próxima ao centrômero do cromossomo Y, em Tsuchiya *et al*. (1995) localizaram uma região de suscetibilidade do gonadoblastoma através da análise de um painel de pacientes com gonadoblastoma e anomalias do desenvolvimento sexual. Nesta região foi mapeado o gene *TSPY* - testis-specific protein encoded (TSUCHIYA *et al*, 1995) (Figura 1).

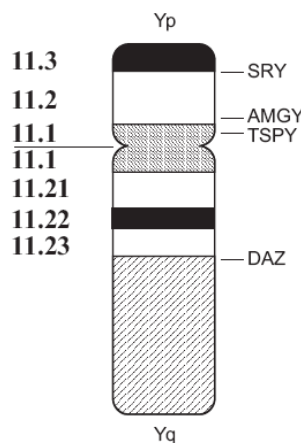


Figura 1. Representação esquemática do cromossomo Y mostrando a localização do gene *TSPY* (LAU *et al*., 1999).

O único locus oncogênico no cromossomo Y é o locus do gonadoblastoma (LAU *et al*, 2009). Estudos recentes apontam o gene *TSPY* como o gene do gonadoblastoma (LI *et al*, 2007; LAU *et al*, 2009). Parece que o gene *TSPY* expresso em indivíduos com anomalias do desenvolvimento sexual poderia ter efeito oncogênico (SU *et al*, 2006; LAU *et al*, 2009). O *TSPY* parece exercer função na proliferação e diferenciação normais de células germinativas masculinas, mas está expresso, de forma ectópica, em estágios precoces ou tardios do gonadoblastoma, do carcinoma *in situ* e dos seminomas (SU *et al*, 2006; BIANCO *et al*, 2009; LAU *et al*, 2009).

Os estudos de Lau *et al* (2009) sugerem que o gene *TSPY* desempenha funções normais na proliferação de células tronco masculinas e na meiose das células germinativas,

interagindo com ciclinas B e afetando a atividade das ciclinas B – CDK1 quinase. Estudos detalhados sugerem que o *TSPY* e as ciclinas B1 são co-expressos durante a diferenciação espermiática e exerce papel fundamental em mediar os ciclos celulares meióticos, sem que haja interfase entre os ciclos durante a espermatogênese.

Expressões ectópicas do *TSPY* aceleram a proliferação celular *in vitro* e a tumorigênese em ratos atímicos. Além disso, este gene regula positivamente a expressão de oncogenes e genes pró-crescimento celular, particularmente os do braço curto do cromossomo 12 e regula negativamente os genes inibidores do crescimento celular. (LAU *et al*, 2009).

O gene *TSPY* localiza-se numa região crítica, no braço curto do cromossomo Y, próxima ao centrômero Yp11.2, nos pares de base 9.304.563 a 9.307.357. Este gene é expresso em tumores de células germinativas ou no tecido de gonadoblastomas. Sua expressão também está correlacionada com seminomas testiculares e está envolvido na tumorigênese da próstata. Outras nomenclaturas usadas para se referir a este gene são: *TSPY*, *CT78*, *DYS14*, pJA923. (TSUCHIYA, *et al*, 1995, ZHANG, *et al*, 1992; VOGEL, *et al*, 1998).

O gene *TSPY* é uma sequência *in tandem* repetida cerca 20 a 60 vezes, constituindo um bloco com mais de 1MB de DNA de uma série de genes funcionais no braço curto do cromossomo Y. Em humanos há aproximadamente 35 cópias deste gene, havendo uma variação frequente deste número de cópias, o que sugere que a série deste gene é um ponto de alta instabilidade genética no cromossomo Y, tanto em populações normais como em várias doenças. O gene *TSPY* é composto por 6 éxons e 5 íntrons, com uma região promotora de extensão ainda não precisamente conhecida (VOGEL *et al*, 1998).

O produto do gene *TSPY* é a proteína testicular específica ligada ao cromossomo Y, sendo somente encontrada no tecido testicular, e podendo estar envolvida na espermatogênese. Esta proteína encontra-se ligada a ciclinas tipo B e intensifica a ativação da atividade quinase da ciclina B-CDK-1, além de induzir a rápida transição G(2)/M no ciclo celular. Também interfere no funcionamento normal do seu homólogo no cromossomo X, o *TSPX* (LAU *et al*, 2009).

Com estes dados é possível compreender que a expressão e a ação ectópicas do gene *TSPY* em células de linhagem não germinativas rompe a regulação do ciclo celular normal e predis põem estas células a tumorigênese (HERSMUS *et al*, 2008; LAU *et al*, 2009).

Usando imuno-histoquímica, Western blotting e PCR para analisar 171 casos de tumores de células germinativas testiculares, Li *et al* (2007) verificaram que o *TSPY* se

expressa abundantemente em precursores de carcinoma testicular *in situ*, em neoplasias de células germinativas intra-tubulares não classificadas e em seminomas; mas, é minimamente expresso ou não expresso em vários tipos de não seminomas.

Embora o gonadoblastoma seja o tumor gonadal mais frequentemente observado nas gônadas disgenéticas de pacientes com material cromossômico derivado do Y, o tumor mais temido é o disgerminoma, por sua potencial malignidade e bilateralidade. Outras neoplasias, malignas ou não, também podem ocorrer neste grupo de pacientes. Por não serem tumores metastáticos e pela possibilidade de cura com a retirada cirúrgica do mesmo, a detecção de cromossomo Y íntegro ou não por técnicas citogenéticas convencionais ou por estudo com FISH ou PCR tem sido estimulada para nortear a indicação profilática de gonadectomia.

Anteriormente, a presença do cromossomo Y no cariótipo convencional através de cultura de linfócitos de sangue periférico, por si, já era indicativa de gonadectomia profiláticas em pacientes com gônadas disgenéticas e intra-abdominais em pacientes com DDS. O avanço das técnicas de Biologia Molecular permitiu análises mais acuradas para identificação de genes e/ou produtos gênicos que pudessem ser utilizados como marcadores tumorais. A presença de gonadoblastomas em pacientes com monossomia simples do X é uma evidência de que há fragmentos do Y com genes que participassem da gênese destas neoplasias. No caso do gonadoblastoma, a pesquisa do gene *TSPY* e sua expressão gênica nos tecidos alvo deve contribuir para aumentar a precisão nas indicações das biópsias gonadais, bem como de gonadectomias em pacientes com DDS, especialmente nas que não apresentam evidências do cromossomo Y no cariótipo convencional (LAU, 1999; COOLS, *et al*, 2006; BARROS, *et al*, 2009; OLIVEIRA, *et al*, 2009; BARROS, *et al*, 2011).

1.5 Justificativa

Visto que o gene *TSPY* está envolvido com uma série de eventos que regulam o ciclo celular meiótico, sendo também, junto às ciclinas B1, coexpresso durante a diferenciação espermática, e desta forma podendo estar relacionado à formação de tumores como o Gonadoblastoma, a pesquisa deste gene em pacientes DDS seria um passo inicial para a identificação, neste universo, de pacientes com maior predisposição para desenvolver gonadoblastomas e conseqüentemente colaboraria para a indicação de gonadectomia oportunamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Verificar a prevalência de do gene *TSPY* em pacientes portadores de anomalias da diferenciação sexual no Pará.

2.2 Específicos

- Correlacionar os achados dos cariótipos com a presença ou ausência do gene *TSPY*;
- Verificar a prevalência do gene *TSPY* em pacientes com síndrome de Turner;
- Identificar os pacientes do estudo com maior risco de desenvolver gonadoblastoma e contribuir para priorizar a gonadectomia profilática nestes pacientes.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Tipo de pesquisa

O presente estudo é do tipo observacional, descritivo, prospectivo e de prevalência. Foram utilizadas amostras de sangue periférico dos pacientes com anomalia do desenvolvimento sexual atendidos no ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (HFSCMP) em Belém/PA tendo sido submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde(ICS) da Universidade Federal do Pará (UFPA), (Protocolo 80/2010). A coleta das amostras foi iniciada após aprovação do CEP e autorização dos pais ou responsáveis dos pacientes estudados através da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido(TCLE) (ANEXO I e II).

3.2 Local e período do estudo

A pesquisa foi realizada no ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará e no Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, obtendo-se dados dos prontuários dos pacientes atendidos neste ambulatório, onde foram preenchidos os termos de consentimento livre e esclarecido e as amostras de sangue serão analisadas no referido laboratório, no período de julho de 2010 a agosto de 2011.

3.3 População e amostra do estudo

A população foi composta de 47 pacientes atendidos no ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, onde foram coletadas as amostras de sangue para cariótipo e análise molecular da pesquisa. A amostra foi composta pelos pacientes que preencheram os critérios de inclusão.

3.4 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão:

- Pacientes de idade desde recém-nascidos até 50 anos com anomalias na determinação e/ou diferenciação sexual e com disgenesias gonadais, com ou sem alterações na genitália externa.

- Pacientes que concordaram em participar do estudo, tendo sua concordância expressa através da assinatura do termo de consentimento livre-esclarecido pelo seu responsável ou pelo próprio paciente quando este tiver 18 anos de idade ou mais.

Critérios de exclusão:

- Pacientes com idade superior a 50 anos.

- Pacientes com síndromes genéticas malformativas complexas

3.5 Coleta de dados

Durante o estudo foi realizado um contato prévio com cada responsável pelo paciente ou com o próprio paciente (no caso de maior idade), onde foram fornecidas informações acerca do objetivo da pesquisa, além de formulário para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido para posterior coleta do material (ANEXO I), bem como foram coletados os dados referentes ao sexo, idade e procedência do paciente.

As amostras de 10 ml de sangue periférico foram obtidas por punção venosa ou arterial periférica dos pacientes com critérios de inclusão no estudo para posterior realização das técnicas de biologia molecular.

A coleta foi realizada no ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HFSCMPA utilizando-se material estéril descartável (seringas de 10 ml e agulhas 0,55 x 20 mm) e com anti-sepsia feita no local da punção, sendo realizada por um técnico de enfermagem, acompanhado da médica pediatra Lena Stilianidi Garcia. O período em que se procedeu a coleta foi de julho de 2010 a agosto de 2011.

As amostras de sangue coletadas foram armazenadas em frascos de vidro (tipo *vacutainer* EDTA) e colocadas em um isopor de 3 litros com material congelante reutilizável ICEFOAM para o transporte até o laboratório de Citogenética Humana no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, onde foram processadas e analisadas (Figura 2).

Todos os pacientes da presente pesquisa foram estudados segundo os preceitos da Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, respeitadas as Normas de Pesquisa

Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde após aprovação de projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) da Universidade Federal Pará (UFPA) e autorização pelos pacientes ou responsáveis dos pacientes estudados, por meio de termo de consentimento livre e esclarecido.

Para a classificação quanto a faixa etária, foram considerados lactentes, os pacientes menores de 2 anos; pré-escolar foi considerado indivíduos entre 2 e 6 anos de idade; escolar como indivíduo entre 7 e 10 anos exclusive (PUCCINI & HILÁRIO, 2008), adolescentes foi definido como indivíduo entre 10 e 19 anos de idade (WHO, 2013) e adultos a partir de 19 anos de idade.

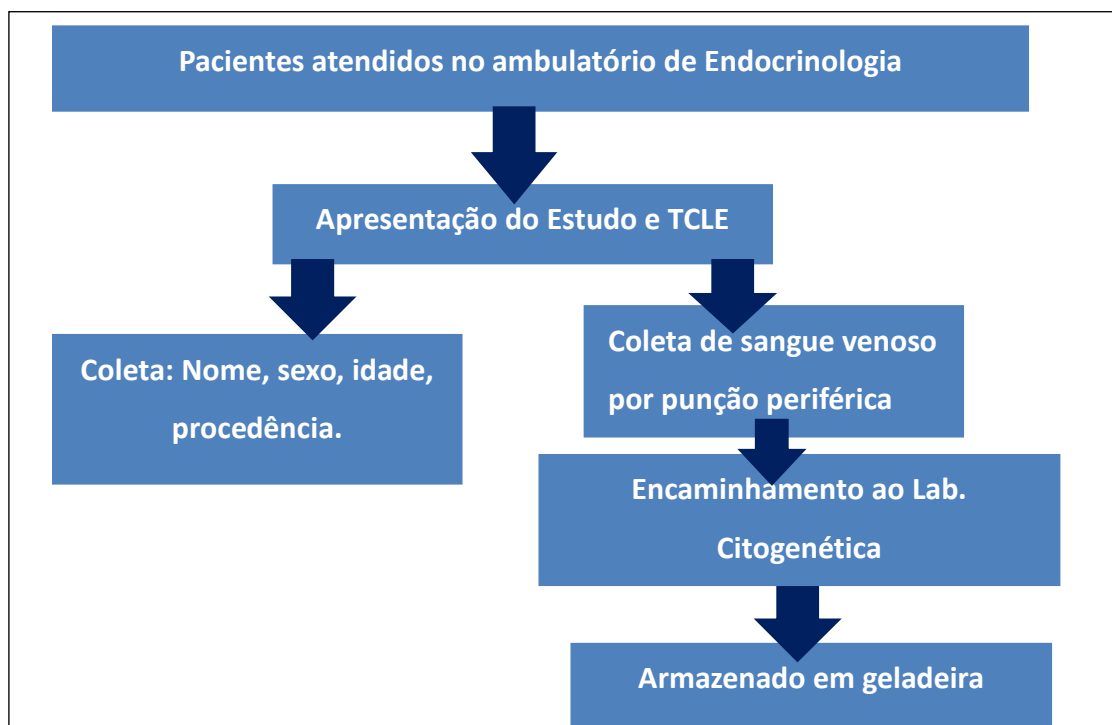


Figura 2. Fluxograma da coleta dos dados.

3.6 Cariótipo

Neste experimento, as células foram cultivadas em meio completo contendo 76,8% de meio de cultura HAM-F10 da marca Sigma, suplementado com estreptomicina (0,01 mg/ml), penicilina (0,005 mg/ml), 19,2% de soro bovino fetal (Cultilab) e 2% de fitohemaglutinina (Gibco). As preparações citológicas para a análise dos linfócitos do sangue periférico humano

em metáfase foram obtidas pela técnica de Moorhead *et al.* (1960), com modificações utilizadas no Laboratório de Citogenética Humana.

A técnica de coloração empregada foi a de obtenção de bandas GTG, descrita por SCHERES (1972) com modificações:

Lâminas secas ao ar foram imersas em solução de tripsina 0,01% diluída em tampão fosfato 0,06M durante poucos segundos, dependendo da idade das lâminas e das condições de temperatura e umidade do meio ambiente. A ação da tripsina foi interrompida mergulhando-se a lâmina em água destilada gelada. Após este procedimento as preparações foram coradas em Giemsa tampão fosfato 0,006M (1:30) durante 5 minutos, lavadas em água corrente e secas ao ar.

A análise das preparações cromossômicas submetidas ao bandamento GTG foi realizada ao microscópio óptico com objetiva de 100X. A análise das bandas GTG foi feita nas metáfases que apresentaram cromossomos com bandas que permitissem a sua identificação, as quais foram também fotografadas. (ANEXOS III e IV)

3.7 Extração de DNA

A extração de DNA a partir das amostras de sangue periférico foram realizadas conforme o protocolo estabelecido pelo kit da QiaAmp (Qiagen®). Posteriormente, o DNA extraído será armazenado no freezer -80°C.

3.8 Determinação da presença do gene *TSPY* pela técnica de PCR

Para detecção da presença do gene *TSPY*, a partir das amostras com marcadores moleculares do cromossomo Y, foi empregada a técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando iniciadores ou *primers* específicos para o éxon 1 do gene *TSPY*. (Tabela 2 e Figura 3)

Primer	Sequence		Annealing temperature
1f	5' CGGCACAAGTTCCAAG 3'	forward	58 °C
1r	5' TCCCCAAAGAGTCACATC 3'	reverse	

Tabela 2. Apresentação dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *TSPY*, com a respectiva temperatura de anelamento (SVACINOVA, *et al.*, 2011).

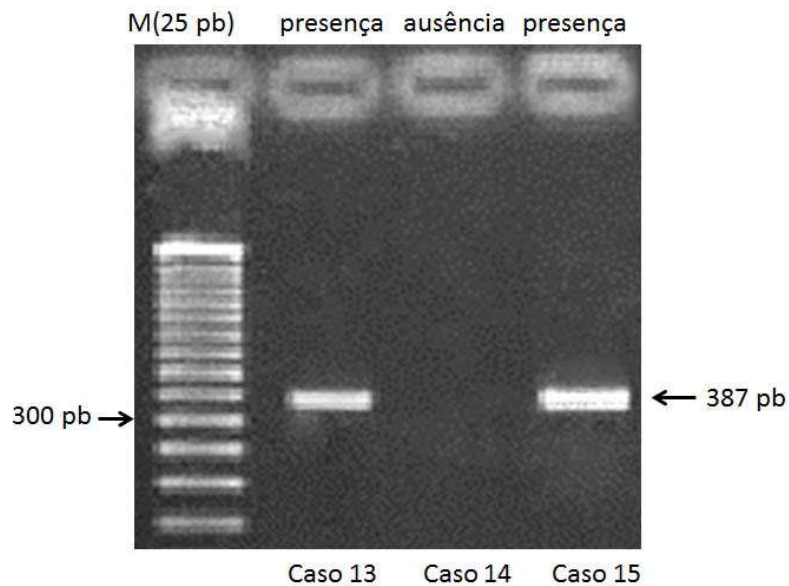


Figura 3. Análise da amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase. Os casos 13 e 15 apresentam a amplificação de um fragmento de 387 pares de bases do exon 1 do gene *TSPY*. M: marcador de peso molecular de DNA de 25 pb.

As reações de amplificação das regiões analisadas foram otimizadas para um volume final de 25 mL contendo, 100ng de DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 50 mM KCl, H₂O 1,5 mM MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 1,25 mM de cada primer e 1 unidade de Taq DNA polimerase e incubadas em termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf). A amplificação foi realizada a 94° C por 3 minutos, 92° C por 1 minuto (50° C, 58° C e 61° C/ 1min), 72° C por 1 min e a extensão final a 72° C por 7 minutos. A reação de PCR teve 35 ciclos.

3.9 Análise de dados

Os resultados obtidos foram organizados em planilhas do Microsoft Excel® 2003 e foram analisadas nos programas Epi Info versão 3.5.2 e SPSS Statistics 17.0. Realizou-se análise descritiva dos dados, apresentando-se a frequência absoluta, frequência relativa e medidas de tendência central (média aritmética, mediana, moda, mínimo e máximo) e medidas de dispersão (desvio-padrão).

Realizou-se análise estatística inferencial para duas amostras, através dos testes Exatos de Fisher e G com correção de Williams. Fixou-se como nível alfa de significância valores iguais ou menores a 0,05 (5%) para rejeição da hipótese de nulidade.($p < 0,05$)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da procedência dos pacientes que foram atendidos no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica no Hospital da Santa Casa de Misericórdia do Pará mostrou que 48,9% dos pacientes residiam na região Metropolitana de Belém, 42,6% foram provenientes de outros municípios do Pará e 6,4% vieram de outros Estados, mas que já residiam no Pará para o tratamento. Não há na literatura científica outra publicação sobre esta prevalência no Estado do Pará, sendo estes dados bastante relevantes para incluir o Pará na estatística nacional onde os dados referem-se predominantemente a região Sudeste do Brasil (Tabela 3).

Estas informações devem ser analisadas para o incremento de políticas de Saúde Pública no Pará no sentido de viabilizar políticas sociais que facilitem o atendimento deste pacientes com DDS e suas famílias. Sobretudo porque no período de definição etiológica, estes pacientes são orientados a não fazer o registro civil até que se conclua de comum acordo com a família e a equipe multidisciplinar que os atendem (Endocrinologia Pediátrica, Geneticista Clínico, Cirurgião Pediátrico, Psicólogos, Radiologista e Patologista Clínico). Não há na Legislação Brasileira registro de nascimento temporário com sexo indeterminado. Neste, ínterim, então, não têm identidade, nem são cidadãos brasileiros, ficam à margem dos direitos primários como vacinação, teste do pezinho, sem direito ao pagamento de tratamento fora do domicílio, dificuldade para viagens intermunicipais em transportes públicos onde é obrigatória a apresentação da certidão de nascimento de crianças e adolescentes (Tabela 3).

Todos estes transtornos sociais “obrigam” os pais a registrarem seus filhos portadores de DDS. Assim, os resultados, segundo o sexo de criação nesta amostra estudada, são de 68,1% indivíduos criados como mulheres e 31,9% como homens (Tabela 3). Na literatura se observam citações em que 80% dos pacientes com risco para gonadoblastoma têm fenótipo feminino (Looijenga, *et al.*, 2007; Trevas-Guerra, *et al.*, 2010).

No presente estudo foi possível observar que 44,7 % dos pacientes estão na adolescência, período no qual a hipovirilização ou hipervirilização são motivos que levam estes pacientes a procurar os serviços de referência (Tabela 3). Esta distribuição por faixa etária na amostragem estudada é semelhante à descrita em outros trabalhos na literatura como (Saravage, *et al.*, 1990; Cools *et al.*, 2005; Cools, *et al.*, 2006).

Tabela 3. Características demográficas dos pacientes em estudo, Belém/PA.

Variáveis demográficas	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Sexo de criação		
Masculino	15	31,9
Feminino	32	68,1
Total	47	100,0
Faixa etária		
Pré-escolar	7	14,9
Escolar	13	27,7
Adolescente	21	44,7
Adulto	6	12,8
Total	47	100,0
Procedência		
Região Metropolitana de Belém	23	48,9
Outros municípios paraenses	20	42,6
Outros Estados	3	6,4
Dado ausente	1	2,1
Total	47	100,0

Baseando-se nos riscos de pacientes com DDS de desenvolverem gonadoblastoma, segundo os critérios propostos por Looinjenga em 2007, notou-se que mesmo de alto risco para esta neoplasia, a casuística do presente trabalho apresenta apenas 8,5% de pacientes com Disgenesia Gonadal. Este viés, certamente, deve-se ao limitado número de pacientes submetidos à biópsia gonadal, procedimento cirúrgico cercado de burocracia na Saúde Pública no Pará que limita os números de leitos de Cirurgia Pediátrica e um único Serviço especializado (Figura 4).

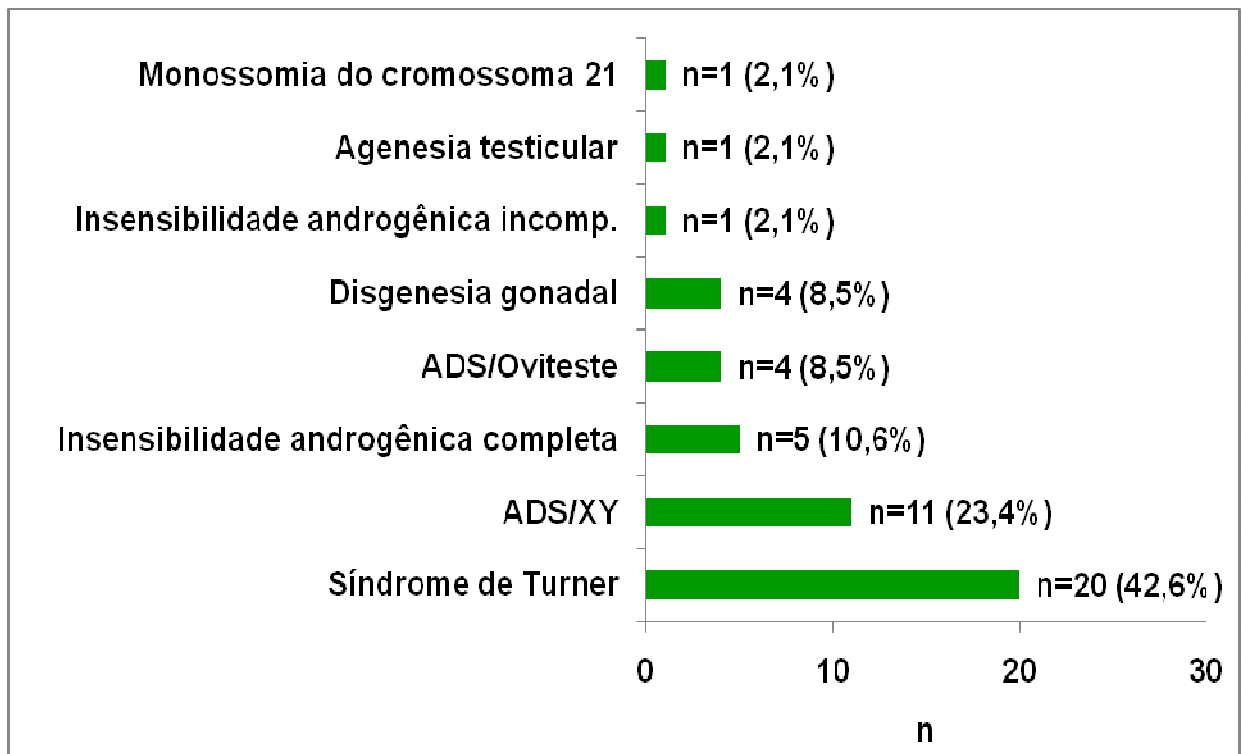


Figura 4. Distribuição dos pacientes em estudo de acordo com a anomalia do desenvolvimento sexual (ADS) apresentada, Belém/ PA.

Os portadores de Insensibilidade Androgênica Completa (DDS/XY), também de alto risco para desenvolvimento de tumores gonadais nas células germinativas, correspondem a 10,6% deste estudo. Dos pacientes com DDS/XY 23,4%, sem diagnóstico etiológico definitivo por limitado suporte laboratorial, em especial de técnicas de genética molecular, são de alto ou médio risco para apresentarem gonadoblastomas (Figura 4).

As pacientes com síndrome de Turner representaram 42,6% da amostra estudada. Os casos que apresentam *TSPY* positivo no genoma são considerados de risco intermediário para desenvolver gonadoblastomas, segundo Looinjenga (2007). Das 20 pacientes com síndrome de Turner analisadas, 10 foram *TSPY* positivas. As pacientes com síndrome de Turner correspondem a uma grande percentagem de pacientes DDS, variando entre os serviços, porém nos grandes centros como na UNICAMPI em Campinas, e no Instituto da Criança-USP em São Paulo (Trevas-Guerra, *et al.*, 2010; Damiani, *et al.*, 2011) há coincidência da prevalência de síndrome de Turner como encontrado no presente estudo (Figura 4; Tabela 4). No presente estudo, das pacientes com monossomia do X nos linfócitos periféricos (11 pacientes), 54,5% foi positivo para o *TSPY*, fato este que evidencia a presença de material do cromossomo Y oculto no genoma, que também podem estar presentes em outros tecidos não analisados, como as gônadas, por exemplo (OLIVEIRA, *et al.*, 2009).

Tabela 4. Associação entre as Patologias dos pacientes em estudo e a presença ou ausência do gene *TSPY*, Belém/PA.

Diagnóstico	<i>TSPY</i>	
	Positivo	Negativo
	n (%)	n (%)
Síndrome de Turner	10 (28,6)	10 (83,3)
ADS/XY	11 (31,4)	-
Insensibilidade androgênica completa	5 (14,3)	-
ADS/Oviteste	2 (5,7)	2 (16,7)
Disgenesia gonadal	4 (11,4)	-
Insensibilidade androgênica incompleta	1 (2,9)	
Agenesia testicular	1 (2,9)	-
Monossomia do cromossoma 21	1 (2,9)	
Total	35 (100,0)	12 (100,0)

Observou-se na amostra estudada de 47 pacientes que 12% foram negativos na pesquisa do gene *TSPY* por PCR e 74,5% foram positivas, ou seja, a maioria é portadora do gene do gonadoblastoma e, no caso deste gene estar expresso, poderá apresentar esta neoplasia ao longo de suas vidas, merecendo seguimento permanente e considerando possibilidade de indicação de gonadectomia profilática nestes casos. Destaca-se aqui a importância da análise molecular em pacientes portadores de anomalias do desenvolvimento sexual (Figura 5).

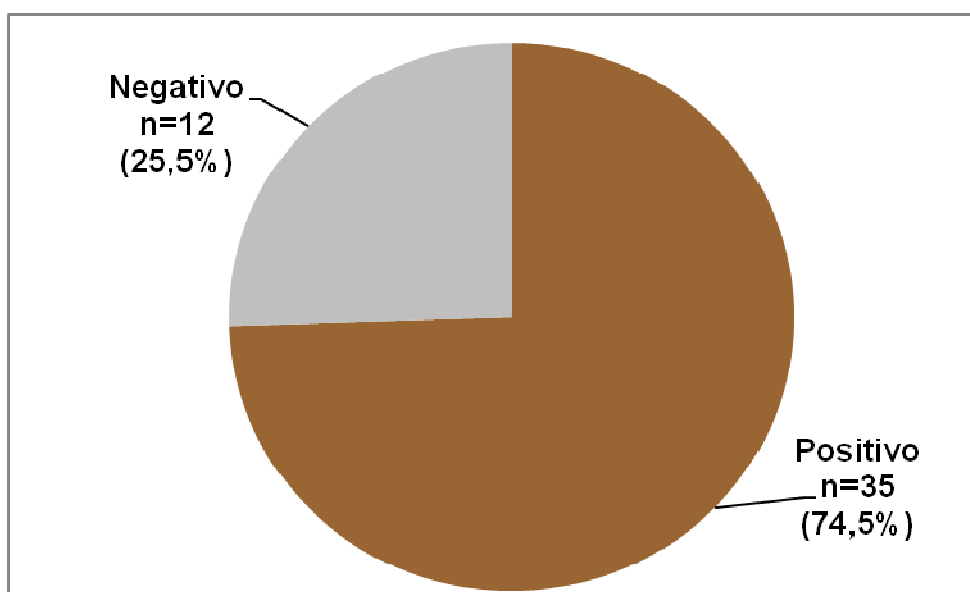


Figura 5. Percentual de pacientes com *TSPY* positivos.

DDS/XY sem a etiologia especificada engloba diagnósticos que só podem ser concluídos com análise molecular de alto custo, ainda não disponíveis na rotina de Hospitais Públicos no Pará, como os defeitos de biossíntese de testosterona, defeitos de receptores de LH, deficiência de 5-alfa-redutase, mutações do gene *SRY*, ente outros.

A análise dos cariótipos por cultura de linfócitos periféricos mostrou que havia mosaicismos no cariótipo em 12 (25,5%) dos casos (Tabela 5). Dos 20 cariótipos compatíveis com síndrome de Turner, 9 tinham mosaicismos, 45% das amostras que correspondem à Síndrome de Turner. Como o gene *TSPY* foi positivo em 50% do total de pacientes com síndrome de Turner (Tabela 4), evidencia-se que 5% destas pacientes tinham o gene *TSPY* positivo, mesmo com cariótipo 45,X, enfatizando-se que a análise foi somente em linfócitos de sangue periférico. No trabalho de BIANCO *et al.* (2009) em 87 pacientes com Síndrome de Turner estudadas os dados apresentados foram de 18,5% de cromossomo Y não evidente no cariótipo convencional.

Tabela 5. Características genéticas dos pacientes em estudo, Belém/PA.

Variáveis genéticas	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Cariótipo		
46,XY	16	34,0
45,X	11	23,4
46,XX	4	8,5
45,X/46,X,i(X)(q10)	3	6,4
45,X/46,XX	2	4,3
45,X/46,X,?dic(Y?)	1	2,1
45,X/46,Xr(X)(p22,3q28)	1	2,1
45,Xr(Y?)	1	2,1
45,XY-21	1	2,1
46,X,del(X)(q21.3)	1	2,1
46,X,I(X)(q10)/45,X	1	2,1
46,XX,inv(X)(?q11.1q27.3)	1	2,1
46,XY inv(9)(p1?q2?)/45,X,inv(9)(p1?q2?)	1	2,1
46,XY, 1qh+	1	2,1
46,XY,9qh+	1	2,1
47,XYY/46,XX e 45,X	1	2,1
Total	47	100,0
Mosaico – Cariótipo		
Sim	12	25,5
Não	35	74,5
Total	47	100,0

Na amostra de Canto, *et al*, em 2004, das 107 pacientes com Síndrome de Turner com cariótipo de monossomia simples do cromossomo X, foi identificado material do cromossomo Y em 9,3% dos casos, quase o dobro do observado no presente trabalho. Esta diferença pode ser explicada provavelmente pelo reduzido tamanho da amostra com síndrome de Turner, utilizada neste trabalho (20 pacientes) quando comparado com o tamanho da amostra utilizada por Canto (107) pacientes. Neste mesmo estudo de Canto, acima referido, a gonadectomia profilática foi indicada, porém, somente 6 se submeteram a este procedimento, sendo que em

2 casos foram encontrados gonadoblastomas, indicando uma incidência de 33% (CANTO *et al*, 2004).

Na tabela 6 é possível notar a positividade do *TSPY* em 57,1% dos pacientes com sexo de criação feminino e em 42,9% dos criados como homens. A análise estatística não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes faixas etárias, nem em relação à procedência no estado do Pará.

Tabela 6. Associação entre o sexo de criação dos pacientes estudados e a presença ou ausência do gene *TSPY*.

Variáveis demográficas	<i>TSPY</i>		<i>P</i>
	Positivo	Negativo	
	n (%)	n (%)	
Sexo de criação			
Masculino	15 (42,9)	-	0,0048*
Feminino	20 (57,1)	12 (100,0)	
Total	35 (100,0)	12 (100,0)	
Faixa etária			
Pré-escolar	6 (17,1)	1 (8,3)	0,4077**
Escolar	11 (31,4)	2 (16,7)	
Adolescente	13 (37,1)	8 (66,7)	
Adulto	5 (14,3)	1 (8,3)	
Total	35 (100,0)	12 (100,0)	
Procedência			
Região Metropolitana de Belém	17 (48,6)	6 (50,0)	0,4758**
Outros municípios paraenses	15 (42,9)	5 (41,7)	
Outros Estados	3 (8,6)	-	
Dado ausente***	-	1 (8,3)	
Total	35 (100,0)	12 (100,0)	

Nota: *Teste Exato de Fisher; ** Teste G com correção de Williams; ***Valores não utilizados na análise inferencial.

Ao avaliar a frequência do gene *TSPY* nas diferentes faixas etárias estabelecidas no trabalho, é de se notar que a pesquisa do referido gene foi negativa predominantemente na faixa etária de adolescentes, devendo-se à frequência de indivíduos com cariótipo 46X e /ou 45,X neste grupo.

Entre os *TSPY* positivos, nota-se frequência semelhante entre indivíduos com idades escolares e adolescentes. Talvez porque com idades em que se costuma socializar a criança que passa a frequentar a escola, haja maior procura pelos serviços especializados o que contribuiu para inclusão na amostra, onde eles correspondem a 27,7% do total de pacientes estudados. Quanto a positividade no grupo dos adolescentes (44,7% dos pacientes com DDS avaliados, encontramos o genoma com *TSPY* em 37,1% do total de 35 pacientes positivos para o gene. Também é válido considerarmos que na adolescência, os próprios pacientes com DDS cobram de seus responsáveis a resolução de suas problemáticas orgânica-psico-sociais, o que interfere na maior frequência nesta faixa etária (figura 6 e tabela 4).

A literatura pertinente não dispõe de trabalhos com distribuição demográfica, por idade e sexo de criação em pacientes com *TSPY* para comparação.

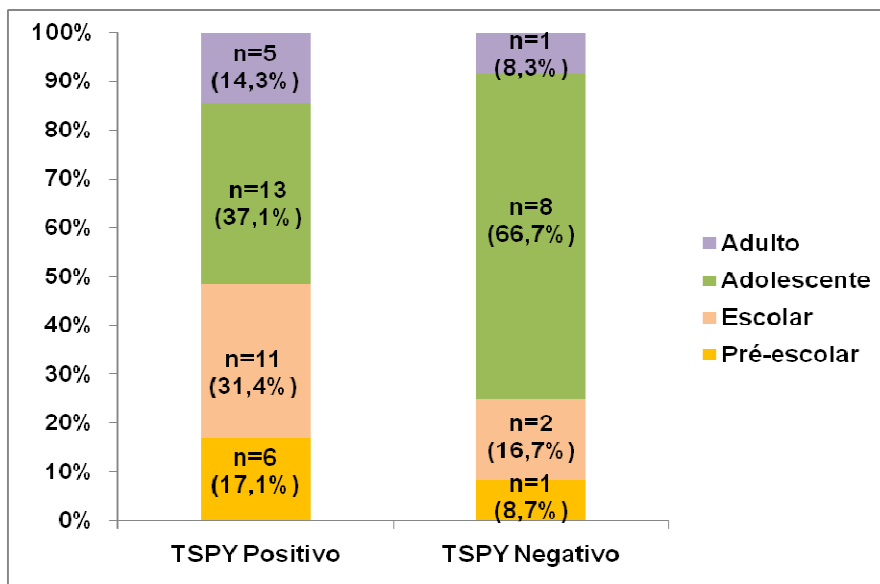


Figura 6. Percentual de pacientes com *TSPY* conforme a faixa etária.

Quando se analisa os cariótipos encontrados na investigação, observa-se na amostra que nos 21 pacientes com cromossomo Y há a presença do gene *TSPY*, compatível com a literatura, uma vez que se trata de um gene componente deste cromossomo sexual. É recomendável, nesta amostra, um estudo molecular que possa evidenciar a presença ou ausência de expressão do *TSPY*, já que se trata de um gene cuja expressão é adequada

somente em estágios embriológicos do desenvolvimento. Haverá necessidade de armazenar estas informações num banco de dados para que posteriormente, em situações de biópsia gonadal ou retirada das gônadas disgenética, possa-se avaliar a expressão gênica nos tecidos a serem estudados (Tabela 7).

Tabela 7. Associação entre características genéticas dos pacientes em estudo e a presença do gene *TSPY*, Belém-PA.

	<i>TSPY</i>	
	Positivo n(%)	Negativo n (%)
Cariótipo		
46,XY	16 (45,7)	-
45,X	6 (17,1)	5 (41,7)
46,XX	2 (5,7)	2 (16,7)
45,X/46,X,i(X)(q10)	1 (2,9)	2 (16,7)
45,X/46,XX	1 (2,9)	1 (8,3)
45,X/46,X,?dic(Y?)	1 (2,9)	-
45,X/46,Xr(X)(p22,3q28)	-	1 (8,3)
45,Xr(Y?)	1 (2,9)	-
45,XY-21	1 (2,9)	-
46,X,del(X)(q21.3)	-	1 (8,3)
46,X,I(X)(q10)/45,X	1 (2,9)	-
46,XX,inv(X)(?q11.1q27.3)	1 (2,9)	-
46,XY	1 (2,9)	-
inv(9)(p1?q2?)/45,X,inv(9)(p1?q2?)		
46,XY, 1qh+	1 (2,9)	-
46,XY,9qh+	1 (2,9)	-
47,XYY/46,XX e 45,X	1 (2,9)	-
Total	35 (100,0)	12 (100,0)
Mosaico - Cariótipo*		
Sim	7 (20,0)	5 (41,7)
Não	28 (80,0)	7 (58,3)
Total	35 (100,0)	12 (100,0)

Nota: *Teste Exato de Fisher; p = 0,2479.

Ainda em relação aos cariótipos e a prevalência do gene estudado, observa-se a monossomia simples 45,X (11 pacientes da amostra), compatível com a síndrome de Turner, tendo uma positividade do *TSPY* no genoma em 6 (54,5%) dos casos, ou seja, sem evidência de cromossomo Y íntegro ou fragmentado no cariótipo. A literatura é vasta no que concerne aumento do risco destas pacientes com risco de desenvolverem gonadoblastomas quando têm cromossomos Y no cariótipo convencional. A revisão de Oliveira *et al.* (2009), conclui que a detecção de sequências cromossomo-Y específicas (entres as citadas, a do gene *TSPY*), nas portadoras de síndrome de Turner, independente de seu cariótipo, é necessária para prevenir o desenvolvimento de lesões gonadais. A observação dos resultados do presente estudo colabora para evidenciar a necessidade de se considerar a importância da investigação molecular do gene *TSPY* nestes casos (CANTO *et al.*, 2004) (Tabela 7).

Dos 12 cariótipos com mosaïcismo que compuseram a amostra, 7 foram positivos para o gene *TSPY* e 4 foram negativos na pesquisa deste gene. A análise correlacionando os cariótipos com mosaïcismo e a presença ou ausência do gene *TSPY* evidenciou um $p < 0,247$, portanto, sem significância estatística. Das diferentes composições destes mosaicos encontrados, observa-se que em apenas dois tinham evidência do cromossomo Y no cariótipo em linfócitos por banda G. Assim, mesmo na ausência do cromossomo Y, íntegro ou fragmentado no cariótipo, é importante ampliar-se a investigação com técnicas de Biologia Molecular para detecção e/ou expressão gênica do *TSPY* nos pacientes com DDS onde a neoplasia mais frequentemente encontrada é o gonadoblastoma (Tabela 7 e figura 7).

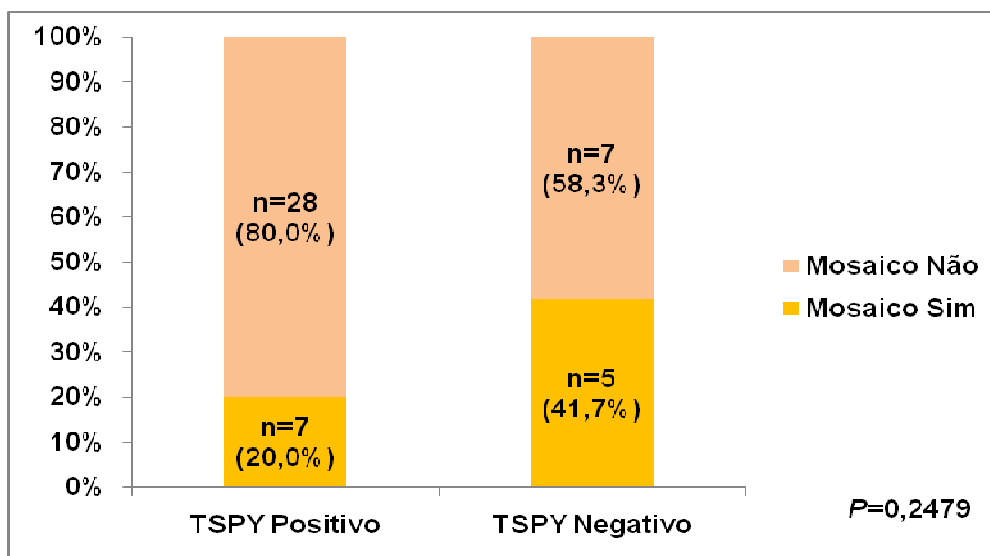


Figura 7. Percentual de pacientes com *TSPY* positivos relacionado ao cariótipo com mosaico.

5 CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesta pesquisa, dentro das condições experimentais utilizadas, foi possível concluir o seguinte:

➤ Dos pacientes com DDS 48,9% residem na região metropolitana de Belém, o que facilita o incremento de políticas públicas a fim de facilitar o atendimento de pacientes e suas famílias;

➤ Nos achados deste estudo onde foram avaliados 47 pacientes a prevalência do gene *TSPY* foi de 74,% e como este gene está vinculado à evolução de gônadas disgenéticas, sobretudo, intra-abdominais para o gonadoblastoma, sua alta prevalência em pacientes com anomalias do desenvolvimento sexual evidencia que estes portadores de anomalias do desenvolvimento sexual sempre deveriam ser avaliados por biologia molecular;

➤ Do total da amostra com *TSPY* positivo, 57% são do sexo de criação feminino.

➤ Quase metade dos pacientes (44,7%) encontra-se na adolescência, período no qual a evidência de hipo ou hipervirilização são motivos que levam estes pacientes a procurar serviços de referência.

➤ 50% de indivíduos com Síndrome de Turner foram positivos para *TSPY*, sendo que destes 45% eram mosaicos. Destas 9 pacientes com síndrome de Turner e com mosaicismo 2 (22,2%) tinham fragmentos sugestivos de Y no cariótipo convencional e 7 (77,8) % tinham mosaico sem Y. Estes, dada a presença de *TSPY* em 18 casos (90%), devem conter fragmentos de cromossomo Y, não identificados pelo exame do cariótipo.

➤ Do total da amostra estudada 12 foram negativos para *TSPY* e em nenhum deles havia cromossomo Y no cariótipo convencional por Banda G.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-NAVA, F.; SOTO, M.; SANCHEZ, M.A.; FERNANDEZ, E.; LANES, R.;
Molecular analysis in Turner syndrome. **J. Pediatr.**, vol.142, p.336-40, 2003.
- ASSUMPCÃO, J.G.; BAPTISTA, M.T.M, *et al.* Morphometry and histology of gonads from
13 children with dysgenetic male pseudohermaphroditism. **Arch. Pathol. Lab. Med.**,
vol.4, n.125, p.652-6, 2001.
- BARROS, B.A., MORAES, S.G., COELI, F.B., ASSUMPCÃO, J.G., De Mello, m.p.,
MACIEL-GUERRA, A.T., CARVALHO, A.B., VIGUETTI-CAMPOS, N., VIEIRA,
T.A.P., AMSTALDEN, E.M.I., ANDRADE, J.G.R., ESQUIAVETO-AUN, A.M.,
MARQUES-DE-FARIAS, A.P., D'SOUZA-LI, L.F.R., LEMOS-MARINI, S.H.V.,
GUERRA-JUNIOR,G. OCT4 imunohistochemistry may be necessary to identify the
real risk of gonadal tumors in pacientes with Turner syndrome and Y chromosome
sequences. **Human Reproduction**, VOL.26, N.12,P. 3455-3455, 2011.
- BARROS, B.A., MORAES, S.G., COELI, F.B., ASSUMPCÃO, J.G., De MELLO, M.P.,
MACIEL-GUERRA, A.T., CARVALHO, A.B., MARQUES-DE-FARIAS, A.P.,
LEMS-MARINI, S.H.V., GUERRA-JUNIOR,G. The inclusion of new techniques of
chromosome analysis has improved dhe cytogenetic profile of Turner syndrome. **Arq.**
Bras. Endocrinol. Metab., vol.53, n.9, p.1137-1142, 2009.
- BIANCO, B.; LIPAY, M.; GUEDES, A.; OLIVEIRA, K.; VERRESCHI, I.T.. SRY gene
increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoral gonadal lesions in
Turner syndrome. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, vol.28, n.2, p.192-202, 2009.
- BOSINSKI, H. A. Psychological sexual aspect of intersex syndromes. *Der. Urologe.*, vol.45,
n.81, p. 981-991, 2006.
- BRANT, W.O.; RAJIMWALE, A.; LOVELL, M.A.. Gonadoblastoma and Turner syndrome.
J. Urol., vol.175, n.5, p.1858-60, 2006. One tissue, two paths: molecular genetics
events that underlie testis versus ovary development. **Nat. Rev. Genet.**, vol.5, p. 509-
21, 2004.
- CANTO,P.; KOFMAN-ALFARO, S.; JIMÈNEZ,A.L.. Gonadoblastoma in Turner syndrome
patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences. **Cancer**
Genet. Cytogenet., vol.150, n.1, p. 70-2, 2004.
- CARCAVILLA, I.A.; ALONSO,M.; EZQUIETA, B.; GARCIA-GALLOWAY, E.;
BARRITO, R.; NISTAL, M.. An XX male with an intratubular undifferentiated germ
cell neoplasia. **Fertil. Steril.**, vol.90, n 5, p. 2005-3-5, 2008.

- CARCAVILLA, I.A.. In Neoplasias Associadas aos Distúrbios da Diferenciação do sexo. **MENINO OU MENINA**, cap. 10, Ed..RUBIO, 2010.
- CASENAVE, F.; SAUREL, J.; BOUTET, G.; PAMEIX, I.; BRUN, G.. Gonadoblastoma. Review of the literature. Apropos of a case. **J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.**, vol.15, n. 6, p. 757-63, 1986.
- COOLS, M.; DROP, S.L.S.; WOLFFENBUTTEL, K.P.; OOSTERHUIS, J.W.; LOOIJENGA, L.H.J.. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. **Endocrine Reviews.**, vol.27, n.5, p. 468-484, 2006.
- COSTA, J.R.T.M. Expressão imunohistoquímica da inibina, do p53, de testosterona, do WT1 e da substância inibidora de Müller em células de gonadoblastoma, disgerminoma e seminoma. Tese de Doutorado. São Paulo:UNIFESP; 2002.
- DAMIANI, D.; GUERRA-JUNIOR, G.. As novas definições e classificações dos estados intersexuais: o que o Consenso de Chicago contribui para o estado da arte? **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, vol.51, n.6, p. 1013-1017, 2007.
- DE MELLO, M.P.; ASSUMPÇÃO, J.G.; HACKEL, C.. Genes envolvidos na determinação diferenciação do sexo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, vol.49, n.1, p. 15-25, 2005.
- DE-MELLO, M.P., SOARDI, F.C.. Genes envolvidos na determinação sexual. In: MACIEL-GUERRA, A.T., GUERRA-JÚNIOR, G.. EDITORES. **Menino ou menina? Os distúrbios da determinação do sexo. 2ª Ed.**São Paulo. Rubio, 2010, p. 3-14.
- DOMINIUS, S., COSTA, E.M.F, CORREA, R.V., MENDONÇA, B.B. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, vol.46, n.4, p.433-443, 2002.
- FALLAT, M.E., DONAHOE, P.K.. Intersex genetic anomalies with malignant potencial. **Curr. Opinion Pediatr.**, vol.18, p. 305-11, 2006.
- GOURLAY, W.A.; JOHNSON H.W.; PANTZAR, J.T. Gonadal tumors in disorders of sexual differentistion. **Urology**, vol.43, n.4, p.537-40, 1994.
- GOODFELLOW, P.N., DARLING, S.M.. Genetics of sex determination development. Vol.102, n.2, p.251-8.
- GUERRA-JÚNIOR, G., MACIEL-GUERRA, A.T.. The role of the pediatrician in the management of children wit genital ambiguities. **J. Pediat.**, vol.83 9 5 suppl.) , n.5, p. 184-91., 2007.

- GRAVHOLT, C.H.; FEDDER, J.; NAERAA, R.W.; MULLER, J.. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, vol.85, n.9, p.3199-202.
- GRUMBACH, M.M., HUGHES, I.A., CONTE, F.A. Disorders of sex differentiation. In: Laesen PR, Krogenberg HM, Melmed, S, Polonsky KM, eds. Williams textbook of endocrinology. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders (Elsevier); p. 842-1002.
- HANSON, L.; BRYMAN, I.; JANSON, P.O.; JAKOBSEN, A.M.; HANSON, C.; Fluorescence *in situ* hybridisation analysis and ovarian histology of women with Turner syndrome presenting with Y-chromosomal material: a correlation between oral epithelial cells, lymphocytes and ovarian tissue. **Hereditas** 137:1-6, 2002.
- HERMUS, R.; DE LEEUW, B.H.; WOLFFENBUTTEL,K.P.; DROP, S.L.; OOXTRHUIX, J.W.; COOLS, M.; LOOIJENGA, L.H. New insights into type II germ cell tumor pathogenesis bases on studies of patients with various forms of disorders of sex development (DDS). **Mol. Cell Endocrinol.**, vol.291, n.1-2, p.1-10, 2008.
- HERTEL, J.D.; HUETTNER, P.C.; DEHNER, L.P.; PFEIFER, J.D.. The chromosome Y-linked testis-specific protein locus *TSPY* is characteristically present in gonadoblastoma. **Human Pathology**,; vol.41, n.11, p.1544-9 , nov.2010.
- HONECKER, F., STOOP, H., DE KRIJGER, R.R.. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by germ cells. The Journal of Pathology , vol.203, p. 849-857, 2004.
- HOUK, C.P.; LEE, P.A.. Intersex states: diagnosis and management. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, vol. 34, p.791-810, 2005.
- HUGHES, I.A.; HOUK, C.; AHMED, S.F.; Lee, P.A.; Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES)/European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE) Consensus Group; **Archives of Disease in Childhood.**, vol.91, p. 554-563, 2006.
- HUGHES, I.A.; NIHOUL-FÉKÉTÉ, C.; THOMAS, B.; COHEN-KETTENIS, P.T.. Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.**, vol.21, n.3, p.351-365, 2007.
- JACOBS, P.A., BAIKIE, A.G., COURT-BROWN, W.N., FOREST, H. ROY, J.R., STUART, J.S., *et al.* Chromosomal sex in the syndrome of testicular feminization. **Lancet**, vol.2, p.591-2, 1959.

- KILDAL, W.; KRAGGERUD, S.M.; ABELER, V.M.; HEIM, S.; TROPE, C.G.; KRISTENSEN, G.B.. Genome profiles of bilateral dysgerminomas, a unilateral gonadoblastoma, and a metastasis from a 46,XY phenotypic female. **Hum Pathol.**, vol.34: n.946-9, 2008.
- LARSEN, T.; GRAVHOLT, C.H.; TILLEBECK, A.; LARSEN, H.; JENSEN, M.B.; NIELSEN, J.; *et al.* Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening for “hidden” Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. **Clin Genet**, vol.48, p.6-11, 1995.
- LAU, Y.F.. Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the *TSPY* gene. **American J. Hum. Genet.**, vol.64, n.4, p.921-7, 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**, vol.87, n.1, p.114-22, 2009.
- LEVIN, H.S. Tumors of the testis in intersex syndromes. **Urol. Clin. North Am.**, vol.27, n.3, p.543-51, 2000.
- LI Y.; TABATABAI, Z.L.; LEE, T.L.; HATAKEYAMA, S.; OHYAMA, C.; CHAN, W.Y.; CHAN, W.Y.; LOOIJENGA, L.H.; LAU, Y.F.. The Y-encoded *TSPY* protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors. **Human Pathol.**, vol.38, n.10, p.147-81, 2007.
- LI, Y.; LAU, Y.F.. *TSPY* and its X-encoded homologue interacts with cyclin B but exert contrasting functions on cyclin-dependent kinase 1 activities. **Oncogene**, vol.30, p., 2008.
- LIPAY, M.V.N.; BIANCO, B.; VERRESCHI, I.T.N.. Disgenesias gonadais e tumores; aspectos genéticos e clínicos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, vol. 49, n. 1, p. 60-70, 2005.
- LOOIJENGA, L.H.; HERSMUS, R.; OOSTERHUIS, J.W.; COOLS, M.; DROP, S.L.; WOLFFENBUTTEL, K.P.. Tumor risk in disorders of sex development (DDS). **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, vol.21, n.3, p.480-95, 2007.
- LUKUSA, T.; FRYNS, J.P.; KLECZKOWSKA, A.; VAN DEN BERGHE, H.. Role of gonadal dysgenesis in gonadoblastoma induction in 46,XY individuals. **Genet. Couns.**, vol.2, p.9-16, 1991.
- MACIEL-GUERRA, A.T., GUERRA-JÚNIOR, G.. Menino ou Menina? Os distúrbios da Diferenciação do sexo. 2. Ed. Rubio. 2010.

- MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA-JÚNIOR, G.. Intersexo: entre o gene e o gênero. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, vol.49, n.1 São Paulo Jan./Feb. 2005.
- MACLAUGHLIN, D.T., DANAHOL, P.K. Mechanisms of disease: sex determination and differentiation. **N. Engl. J. Med.**, vol.350, p. 367-78, 350, 2004.
- MENDES, J.R.; STRUFALDI, M.W.; DELCELO, R.; MOISES, R.C.; VIEIRA, J.G.; KASAMATSU, T.S.; *et al.* Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism. **Clin. Endocrinol.**, vol.50, p.19-26, 1999.
- MOORHEAD, P.S.; NOMELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell. Res.**, vol.20, p.613-116, 1960.
- OOSTERHUIS, J.; LOOIJENGA, L.A.. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. **Nature reviews. Cancer.**, vol. 5, p. 210-222, 2005.
- OLIVEIRA, R.M.R., VERRESCHI, I.T.N., LIPAY, M.V.N., EÇA, L.P., GUEDES, A.D., BIANCO, B.. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. **Sao Paulo Med. J.**, vol.127, n.6, p.373-8.
- PAGE, D.C.. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. **Development.**, vol. 101(suppl), p. 151-5, 1987.
- PATSALIS PC, SISMANI C, HADJIMARCOU MI, KITSIOU-TZELI S, TZEZOU A, HADJIATHANASIOU CG, *ET AL.* Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients. **Clin. Genet.**, vol.53, p.249-57, 1998.
- PETROVIC, V.; NASIOULAS, S.; CHOW, C.W.; VOULLAIRE, L.; SCHMIDT, RAJPERT-De, M.E.. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspect. **Human Reproduction Update**, vol.12, n.3, p.303-23, 2006.
- RUTGERS, J.L., SCULLY, R.E.. Pathology of the testis in intersex syndromes. **Semin. Diagn. Pathol.**, vol.4, n.4, p.275-91, 1987.
- RUTGERS, J.L.. Advances in the pathology of intersex conditions. **Human Pathol.**, vol.22, p.884-91, 1991.

- SALLAI, A.; SÓLYOM, J.; DOBOS, M.; SZABÓ, J.; HALÁSZ, Z.; SÁGODI, L.; NIERDERLAND, T.; KORZÁRI, A.; BERTALAN, R.; UGOCSAI, P.; FEKETE, G.. Y-chromosome Markers in Turner syndrome – Screening of 130 patients. **J. Endocrinol. Invest.**, vol.21, (Jul Epub ahead of print), 2009.
- SALO, P.; KAARIAINEN, H.; PETROVIC, V.; PELTOMAKI, P.; PAGE, D.C.; DE LA CHAPELLE, A.. Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome. **Gen Chrom Cancer**, vol.14, p.210-4, 1995.
- SCHERES, V.M.J.C. Identification of two Robertsonian translocations with a Giemsa-Banding technique. *Human Genet.*, 15: 253-256, 1972.
- SCOLFARO, M.R.; CARDINALI, I.A.; STUCHI-PEREZ, E.G.; DE MELLO, M.P.; SCULLY, R.E.. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. **Cancer**, vol.25, n.6, p. 1340-1356, 1970.
- SCULLY, R.E.. Neoplasia associated with anomalous sexual development and abnormal sex chromosomes. **Pediatr. Adolesc. Endocrinol.**, vol.8, p. 203-17, 1981
- SIMPSON, J.L. Dysgenesis gonadal type XX. In: Buyse ML, editor. **Birth defects.** Cambridge:Blackwell Scientific Publications;p.805-6, 1990.
- studies. **J. Med. Genet.**, vol.29, p.542-6, 1992.
- SU, M.T.; LEE, I.M.W.; KUO, P.L.. Presence of *TSPY* transcript and absence of transcripts of other Y chromosomal genes in a case of microscopic gonadoblastoma. **Gynecol. Oncol.**, vol.103, n.1, p.357-60, 2006.
- SULTANA. R.; MYERRSON, D.; DISTECHE, C.M. In situ hybridization analysis of the Y chromosome in gonadoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer**, vol.95, n.1, p.128-33.,1992.
- SURANI, M.A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. **Cell**, vol.93, p.1338-1444, 1998.
- SVACINOVA V., VODICKA R., VRTEL R., GODAVA M., KVAPILOVA M., KREJCIRIKOVA E., DUSEK, L., BORTLICEK, B., SANTAVY, J. SEQUENCE RECOMBINATION IN EXON 1 OF THE *TSPY* GENE IN MEN WITH IMPAIRED FERTILITY. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, vol.155,n.3,p.287-298, 2011.

- TALERMASN, A.; ROTH, L.M.. Recent advances in the pathology and classification of gonadal neoplasms composed of germ cells and ses cord derivatives. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, vol.26, n.3, p.313-21, 2007.
- TROCHE, V.; HERNANDEZ, E.. Neoplasia arising in dysgenetic gonads. **Obstet. Gynecol.**, vol.41, n.2, p.74-9, 1986.
- TSUCHIYA, K.; REIJO, R.; PAGE, D.C.; DISTECHE, C.M.. Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. **Am. J. Hum. Genet.**, vol.57, n.6, p.1400-7, 1995.
- TURNER, H.H. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and culbitus valgus. Classic pages in obstetrics and gynecology. **Endocrinology**. vol.23, p.566-574, 1938. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, vol113, n. 113, -p. 279, 1972.
- VERP, M.S.; SIMPSON, J.L.. Abnormal Sexual differentiation and neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, vol.25, p.191-218., 1987.
- VLASAK, I.; PLOCHL, E.; KRONBERGER, G. Scree. WHO, 2013. 10 facts on adolescent health. [http://www.who.int/features/factfiles/adolescent_ health/en/index.html](http://www.who.int/features/factfiles/adolescent_health/en/index.html). Acessado em 28 de março de 2013.
- VOGEL, T., DITTRICH, O., MEHRAEIN, Y., DECHEND, F., SCHNIEDERS, F., SCHMIDTKE, J.. structure and function of *TSPY*, the Y-chromosome gene coding for the “testis specific protein”. **Cytogenet. Cell Genet.**, vol.81, n.3-4, p.265-70, 1998.
- WALLACE, T.M.; LEVIN, H.S.. Mixed gonadal dysgenesias: a review of 15 pacients reporting single cases og malignantintratubular germ cell neoplasia of the testis, endometrial carcinoma and a complex vascular anomaliy. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, vol. 114, p. 679-88, 1990.
- WALTER, J.; PAULSEN, M.. Imprinting and desease. **Seminars in Cell & developmental Biology**, vol.14, p.101-110, 2003.
- ZANG, J.S., YANG-FENG, T.L., MULLER, U., MOHANDAS, T.K., de JONG, P.J., LAU, Y.F. Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome. **Hum. Mol. Genet.**, vol.1,n.9,p.7117-26.

ANEXOS

ANEXO I- Termo de Consentimento

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO

Tendo sido satisfatoriamente informado(a) sobre o trabalho de pesquisa intitulado: **PREVALÊNCIA DO GENE TSPY EM PACIENTES COM MARCADORES GENÉTICOS DO CROMOSSO Y E ANOMALIAS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL ATENDIDAS NO AMBULATÓRIO DE ENDOCRINOLOGIA PEDIÁTRICA DO HOSPITAL FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ.**

: estudo descritivo e transversal”, realizado sob a responsabilidade do Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano e da Médica Lena Stilianidi Garcia, concordo que....., criança/adolescente pela qual sou responsável, participe do mesmo. Fui esclarecido(a) de que deverei responder a questões referentes à idade, sexo e procedência do paciente e de que será coletada amostra de sangue periférico para pesquisa dos marcadores genéticos do cromossomo Y e do gene TSPY, e que os resultados destes exames serão utilizados para análise na pesquisa. Estou ciente de que o Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano e a Médica Lena Stilianidi Garcia estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e de que posso retirar este meu consentimento a qualquer tempo. Estou, também, ciente de que o tratamento continuará a cargo do ambulatório de anomalias do desenvolvimento sexual do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, não tendo pois o Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano e a Médica Lena Stilianidi Garcia quaisquer responsabilidades em relação ao mesmo.

Belém,de.....de 2010

.....
Assinatura dos pais ou responsável

ANEXO II



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



Carta Provisória: 080/10 CEP-ICS/UFPA

Belém, 06 de julho de 2010.

Ao Prof. Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa **PREVALÊNCIA DO GENE TSPY EM PACIENTES COM MARCADORES MOLECULARES DO CROMOSSOMO Y E ANOMALIAS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL ATENDIDAS NO AMBULATÓRIO DE ENDOCRINOLOGIA PEDIÁTRICA DO HOSPITAL FUNDAÇÃO SANTA CASA DO PARÁ** de 0025.0.073.000-10 e parecer nº 035/10 - CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 30 de junho de 2010.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar a este CEP, no dia 20 novembro de 2011, um relatório indicando qualquer alteração que possa ocorrer após a aprovação do protocolo.

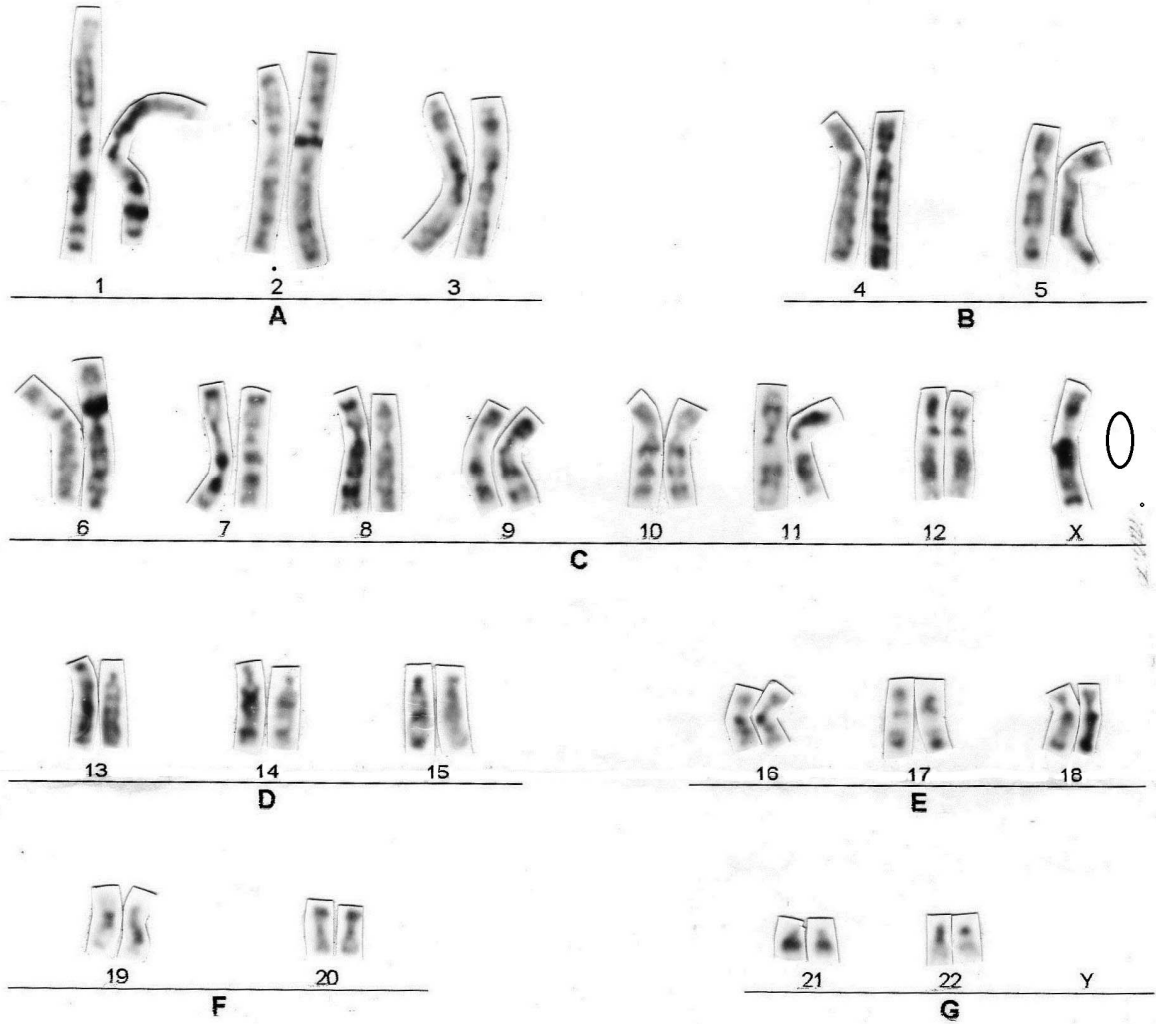
Atenciosamente,


Prof. Dr. Wallace Raimundo Araujo dos Santos.
Coordenador do CEP-ICS/UFPA



ANEXO III

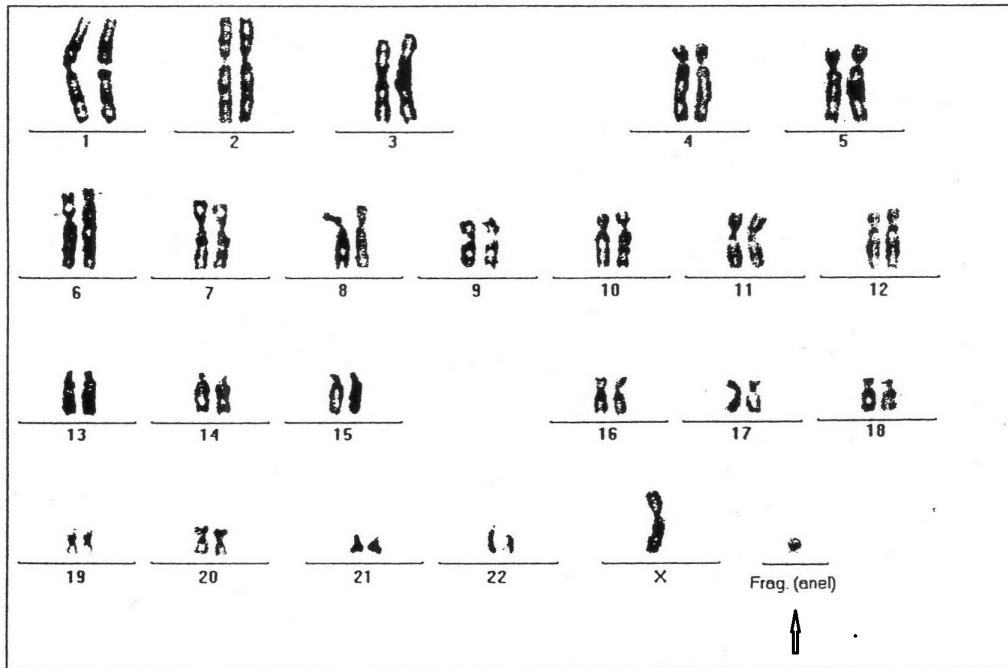
CARIÓTIPO



Cariótipo de una paciente portadora de Síndrome de Turner: 45,X.

ANEXO IV

CARIÓTIPO



Cariótipo de uma paciente portadora de Síndrome de Turner: 45,X,r(Y?).