



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM**  
**ENDOCRINOLOGIA**



**AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO MOSAICISMO  
CROMOSSÔMICO E DINÂMICA DE REPLICAÇÃO CELULAR EM  
PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER**

MIRIAM BEATRIZ GOULART

Rio de Janeiro  
2024

**MIRIAM BEATRIZ GOULART**

**AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO MOSAICISMO CROMOSSÔMICO E  
DINÂMICA DE REPLICAÇÃO CELULAR EM PACIENTES COM  
SÍNDROME DE TURNER**

Tese de doutorado apresentada no Programa de Pós-graduação em Medicina, área de concentração em Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Rio de Janeiro  
2024

### CIP - Catalogação na Publicação

C586a Goulart, Miriam Beatriz Goulart  
Avaliação da distribuição do mosaicismos cromossômico e dinâmica de replicação celular em pacientes com síndrome de Turner / Miriam Beatriz Goulart Goulart. -- Rio de Janeiro, 2024.  
188 f.

Orientadora: Marcia Gonçalves Ribeiro.  
Coorientador: Maria Cecilia Menks Ribeiro.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Medicina (Endocrinologia), 2024.

1. Síndrome de Turner. 2. Mosaicismos cromossômico. 3. Hibridação in situ Fluorescente. 4. Índice de proliferação. 5. Troca de cromátides irmãs. I. Ribeiro, Marcia Gonçalves, orient. II. Ribeiro, Maria Cecilia Menks, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Aprovada em: 25 de março de 2024.

Izabel Calland R. Beserra

Prof.<sup>a</sup> Dra. Izabel Calland Ricarte

CPF: 235700913-68

Presidente da Banca

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Flavia Lucia Conceição

CPF:

---

Dra. Patrícia Santana Correia

CPF:

Sueley Rodrigues dos Santos

Dra. Sueley Rodrigues dos Santos

CPF: 701967457-72

Ana Sheila C. P. Campos

Dra. Ana Sheila Cypriano Pinto Campos

CPF: 733.579.361-00

Candidata: Miriam Beatriz Goulart

Miriam Beatriz Goulart

Ao meu orientador Doutor Eduardo Vieira Neto  
À Doutora Marília Martins Guimarães  
À Sandra Alves Peixoto Pellegrini *in memoriam*.  
E a todos que de alguma forma contribuíram para a  
conclusão deste estudo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que dá sentido a tudo em minha vida. Obrigada por essa grande conquista.

À minha família, a minha mãe Jurema Zarur Bueno pelo apoio e amor incondicional e ao meu marido Diego Moreira Leite pelo amor, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio e companheirismo.

A orientadora Professora Doutora Marcia Gonçalves Ribeiro a minha gratidão e admiração, pelo apoio e ensinamentos, pela excelente orientação, por sua dedicação e disponibilidade incansáveis e pela credibilidade depositada em mim.

A orientadora Professora Doutora Maria Cecilia Menkes Ribeiro a minha gratidão e admiração, pelo apoio e ensinamentos, pela excelente orientação, por sua dedicação e disponibilidade incansáveis e pela credibilidade depositada em mim.

Ao orientador Doutor Eduardo Vieira Neto a minha gratidão e admiração, pelo apoio e ensinamentos, pela excelente orientação, por sua dedicação e disponibilidade incansáveis e pela credibilidade depositada em mim e por ter feito tudo isso se tornar possível.

À bióloga Sandra Alves Peixoto Pellegrini *in memoriam* pela amizade, apoio, ensinamentos, orientações e valiosa ajuda durante todas as fases desse estudo.

Ao Doutor Isaías Soares Paiva pela amizade e apoio durante a execução desse estudo.

À amiga querida Daniela Ney Garcia pelo carinho, amizade e apoio.

À amiga querida Amanda Figueiredo pelo carinho, amizade e apoio.

Ao Doutor Marcelo Land pelo suporte e atenção nas questões estatísticas.

Aos meus amigos Marcia Póvoa, Eliane Guimarães, Rogério Pedra e Fabiana Goulart pelo apoio dado a mim durante a elaboração desse estudo.

Aos médicos do Serviço de Genética Clínica do IPPMG, em especial as Dra Marília Martins Guimarães, Karina de Ferran, Karine Condack Mafort e Isla Aguiar Paiva pela disponibilidade, colaboração e auxílio, principalmente, com relação à parte clínica desse estudo.

Aos colegas de laboratório, em especial minha orientanda Ana Beatriz que muito me ajudou na parte experimental.

Ao Programa de pós-graduação em Endocrinologia, pela oportunidade e auxílio financeiro que possibilitaram a realização deste estudo.

Aos funcionários de programa de pós-graduação em Endocrinologia, principalmente, à Rose por sua disponibilidade, atenção e gentileza.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

As participantes e suas famílias por gentilmente concordarem em participar deste estudo.

“Embora ninguém possa voltar atrás e  
fazer um novo começo, qualquer  
um pode começar agora e fazer um novo fim.”  
(James R. Sherman)

## RESUMO

**Introdução:** A Síndrome de Turner (ST) é uma das anomalias cromossômicas mais comuns, afetando uma em 2.500 nativas. O cariótipo típico é o 45,X, seguido de anormalidades estruturais ou numéricas dos cromossomos X ou Y na forma universal ou em mosaico. Em razão da alta letalidade de fetos com constituição 45,X foi proposto que as nativas deveriam apresentar mosaicismo cromossômico. As células monossômicas podem ter um ciclo celular mais longo, o que influenciaria a fisiopatologia e as manifestações fenotípicas comuns da ST. Os indivíduos com mosaicismo cromossômico proporcionam oportunidade de averiguar o funcionamento celular em células isogênicas que se encontram sob influência dos mesmos fatores endógenos e exógenos. **Objetivos:** Compreender os processos celulares e cromossômicos envolvidos na etiologia da ST, identificar a presença de mosaicismo oculto, caracterizar a constituição cromossômica da linhagem celular adicional. Nas participantes com mosaicismo: verificar aspectos do funcionamento celular que podem estar associados à fisiopatologia, comparando as células isogênicas monossômicas e dissômicas quanto à seleção *in vitro*, índice de proliferação (IP) e instabilidade cromossômica (IC). **Metodologia:** Estudo observacional, descritivo transversal. Análise constitucional em núcleos interfásicos de amostras de sangue periférico, mucosa oral e sedimento urinário pela FISH com sondas de enumeração dos cromossomos sexuais. Caracterização dos cromossomos estruturalmente anômalos por técnicas de bandamento cromossômico complementadas pela hibridação com sondas lócus específicas (LSI) e pintura cromossômica. Caracterização da seleção *in vitro* aferida em diferentes períodos de incubação o IP e as TCI e avaliadas pela diferenciação dos cromossomos após incorporação da 5-BrdU. Análise estatística da seleção *in vitro*, IP e TCI foi feita pela comparação intra-amostral e interamostral, entre células 45,X e 46,XN. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p$  valor menor que 0.05 ( $p < 0.05$ ). **Resultados:** No grupo 1 (participantes com monossomia do cromossomo X) foi detectada a presença de uma segunda ou terceira linhagem em 9/10 participantes. No grupo 2 (participantes com mosaicismo cromossômico) houve variação na quantidade de células das linhagens 45,X e 46,XN nos diferentes tecidos, uma participante apresentou monossomia do cromossomo X no sedimento urinário. Em amostras com cromossomos estruturalmente anômalos 11/13 eram SMC derivados do X(9/11) e do Y(2/11); uma (1/13) apresentou cromossomo em anel originário do X e outra (1/13) isocromossomo do braço curto do Y. Quanto à seleção *in vitro*, a análise intra-individual revelou que em 2/17 foram significativamente relevantes, ambas tiveram uma diminuição da linhagem 45,X em relação à linhagem com o cromossomo anômalo com o aumento do tempo de incubação. No IP, a análise intra-individual não mostrou diferenças. Quanto à instabilidade cromossômica observamos que 5/17 participantes tiveram diferença significativa na TCI entre as linhagens. As diferenças observadas podem ser atribuídas à presença de cromossomos anômalos. A análise interamostral corroborou com estes achados. **Conclusão:** O mosaicismo cromossômico foi detectado em 90% das participantes 45,X, e houve variação na quantidade de células dos diferentes tecidos no grupo 2, que foi heterogêneo em relação à constituição da linhagem complementar e distribuição das células anômalas. Nossos resultados sugerem que houve instabilidade entre as linhagens 45,X e 46,XN e uma seleção *in vitro* para a linhagem 45,X. Esses achados podem auxiliar numa melhor compreensão da fisiopatologia dessa síndrome. **PALAVRAS-CHAVE:** Síndrome de Turner, mosaicismo cromossômico, Hibridação *in situ* fluorescente, Troca de cromátides irmãs, Índice de proliferação e instabilidade cromossômica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Turner syndrome (TS) is caused by a complete or partial absence of an X or Y chromosome, including chromosomal mosaicism, affecting 1 in 2,500 female live births. The high incidence of 45,X of embryos and fetuses death proposed the necessity of mosaicism for survive. Monosomic cells may have a longer cell cycle, which would be related to the pathophysiology with most common characteristics of TS. Individuals with chromosomal mosaicism provide useful material for cell function evaluations as they grow under the influence of the same genetic background and endogenous and exogenous factors. **Objectives:** To understand the cellular and chromosomal processes involved in the etiology of Turner syndrome, to identify the presence of occult mosaicism, to characterize the chromosomal constitution of the additional cell lineage. In participants with mosaicism: to verify aspects of cell function that may be associated with pathophysiology, comparing monosomic and disomic isogenic cells in terms of in vitro selection, proliferation index and chromosomal instability (CIN). **Methodology:** descriptive, cross-sectional study utilizing cultivated samples of peripheral blood and uncultivated samples of oral mucosa, peripheral blood and urinary sediment. Chromosome analyses were performed using conventional staining, differential staining for sister chromatids after 5-bromo-2deoxyuridine (BrdU) labeling. FISH analysis with sex chromosome enumeration probes and locus specific identifier (LSI) probes and chromosome painting was used to characterize structurally anomalous chromosomes. Statistical analysis of in vitro selection, PI and SCEI was carried out by intra-sample and inter-sample comparison between the 45,X and 46,XN lines. Differences with a  $p$ -value of less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) were considered significant. **Results:** Participants In group 1 (participants with X chromosome monosomy), the presence of a second or third lineage was detected on 9/10. In group 2 (participants with chromosome mosaicism) there was a variation in the number of cells from the 45,X and 46,XN lineages in the different tissues, and one participant had X chromosome monosomy in the urinary sediment. Of the 13 samples with structurally anomalous chromosomes, 11 were SMC, which 9 were derived from X chromosome and 2 from Y chromosome; one had a ring chromosome derived from the X chromosome and another an isochromosome for the short arm of the Y chromosome. In vitro selection, the intra-individual analysis revealed significant differences in only two participants, 45,X cells presented a proliferative disadvantage in relation 46,XN cells after 72 of cultivation. In proliferation index (PI), the intra-individual analysis showed no differences. Regarding chromosomal instability, 5 participants showed significant difference in the SCE between lineages. The differences observed can be attributed to the presence of chromosomes with structural alterations. The interindividual analysis corroborated these findings. **Conclusion:** Chromosomal mosaicism was detected in 90% of the participants 45,X, there was also variation in the number of cells in the different tissues in the participants in group 2, which was heterogeneous in terms of the constitution of the complementary lineage and the distribution of the anomalous cells. Our results suggest that there was instability between the 45,X and 46,XN lineages and an in vitro selection for the 45,X lineage. These findings may help to better understand the pathophysiology of this syndrome. **KEYWORDS:** Turner syndrome, chromosomal mosaicism, fluorescent *in situ* hybridization, sister chromatid exchange; proliferation index; chromosomal instability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> : Ciclo celular	35
<b>Figura 2</b> : Fluxograma do estudo mostrando todas as análises que foram realizadas	49
<b>Figura 3</b> : Fluxograma para constituição da amostra	58
<b>Figura 4</b> : Microfotografias de núcleos interfásicos da amostra de SU da paciente 10M analisados com a sonda DXZ1(vermelha) mostrando células com 1, 2 e 3 sinais.	61
<b>Figura 5</b> :Microfotografias de núcleos interfásicos da amostra de SP, MO e SU da paciente 3MOS analisados com a sonda DXZ1 (vermelha) mostrando células com 1 e 2 sinais.	61
<b>Figura 6</b> : Microfotografias de núcleos interfásicos das amostras de SP, MO e SU da paciente 9Mos analisados com as sondas DXZ1 (verde) e SRY (vermelha) mostrando células com constituição 45,X e com constituição 46,XY.	62
<b>Figura 7</b> : Frequência das populações celulares em núcleos interfásicos em células não cultivadas de diferentes tecidos. Grupo de pacientes com monossomia do cromossomo X. Foram utilizadas as sondas de enumeração DXZ1/DYZ1 ou ENXY	64
<b>Figura 8</b> :Distribuição do resultado do cariótipo, pelo bandeamento G, das participantes com mosaicismos cromossômicos.	66
<b>Figura 9a</b> :Frequência da linhagem 45,X e 46,XN em núcleos interfásicos em diferentes tecidos das participantes (1Mos a 8Mos) com mosaicismos cromossômicos com o cromossomo íntegro ou anômalo originário do cromossomo X. Sondas de enumeração utilizadas DXZ1/DYZ1, ENXY ou DXZ1/SRY.	69
<b>Figura 9b</b> : Frequência da linhagem 45,X e 46,XN em núcleos interfásicos em diferentes tecidos das participantes (10Mos a 12Mos) com mosaicismos cromossômicos com o cromossomo íntegro ou anômalo originário do cromossomo X. Sondas de enumeração utilizadas DXZ1/DYZ1, ENXY ou DXZ1/SRY.	70
<b>Figura 9c</b> : Frequência da linhagem 45,X e 46,XN em núcleos interfásicos em diferentes tecidos das participantes (4Mos a 17Mos) com mosaicismos cromossômicos com o cromossomo íntegro ou anômalo originário do cromossomo Y. Sondas de enumeração utilizadas DXZ1/DYZ1, ENXY ou DXZ1/SRY.	71
<b>Figura 10</b> : Frequência da linhagem 45,X nas culturas de 48, 72 e 96 horas	76
<b>Figura 11</b> : Frequência das células com constituição 45,Xe 46,XN nas culturas com duração de 48, 72 e 96 horas, segundo a análise do teste de Tukey	78
<b>Figura 12</b> : Frequência das células com constituição 45, e 46,XN nas culturas com duração de 48, 72 e 96 horas, segundo análise do teste de Šidák.	79
<b>Figura 13</b> : Padrão de diferenciação das células após incorporação de BrdU (A) célula em primeira divisão da participante 3Mos (B) célula em segunda divisão da participante 9Mos (C) célula em terceira divisão da participante 3Mos.	79

<b>Figura 14:</b> IP nas diferentes linhagens celulares das participantes com mosaicismos cromossômico.	80
<b>Figura 15:</b> Regressão Linear do IP das linhagens 45,X e 46,XN	83
<b>Figura 16:</b> Metáfases em segunda divisão, após incorporação com BrdU, das pacientes com mosaicismos. As setas indicam: as TCIs; o cromossomo marcador, quando presente pela letra (m); (r) para cromossomo em anel, o (Y) para cromossomo Y e o i(Yq) isocromossomo do braço longo do cromossomo Y.	84
<b>Figura 17:</b> Média das da TCI e DP nas diferentes linhagens obtidas das participantes com mosaicismos cromossômico	85
<b>Figura 18:</b> Quantidade média de TCI entre as linhagens celulares das amostras com mosaicismos cromossômico	87
<b>Figura 19:</b> Regressão linear da TCI das linhagens 45,X e 46,XN	89
<b>Figura 20:</b> Análise interindividual da TCI entre as linhagens 45,X e 46,XN das amostras com mosaicismos cromossômico.	90

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1:</b> Participantes com monossomia do cromossomo X incluídos no estudo	59
<b>Quadro 2:</b> Constituição cromossômica do grupo de participantes com mosaicismos cromossômicos	60
<b>Quadro 3:</b> Caracterização citomolecular dos cromossomos anômalos nas participantes do grupo 2	67
<b>Quadro 4:</b> Variação da quantidade de células 45,X entre os tecidos das participantes com mosaicismos cromossômicos e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo X	72
<b>Quadro 5:</b> Variação da quantidade de células 46,XN entre os tecidos das participantes com mosaicismos cromossômicos e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo X	73
<b>Quadro 6:</b> Variação da quantidade de células 45,X entre os tecidos das participantes com mosaicismos cromossômicos das pacientes com mosaicismos cromossômicos e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo Y	74
<b>Quadro 7:</b> Variação da quantidade de células 46,XN entre os tecidos das participantes com mosaicismos cromossômicos das pacientes com mosaicismos cromossômicos e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo Y	74
<b>Tabela 1:</b> Sondas utilizadas para FISH indicando as regiões e coordenadas cromossômicas.	56
<b>Tabela 2:</b> Frequência de células com a linhagem 45,X de cada indivíduo nos diferentes tempos de cultura	77
<b>Tabela 3 :</b> Análise de dinâmica de proliferação das linhagens 45,X e 46,XN de cada participante	81
<b>Tabela 4 :</b> Teste t pareado entre as médias do IP das linhagens 45,X e 46,XN	82
<b>Tabela 5:</b> Correlação Pearson para o IP das linhagens 45,X e 46,XN do grupo amostral	82
<b>Tabela 6:</b> Diferenças da TCI entre as linhagens das participantes	87
<b>Tabela 7:</b> Teste <i>t</i> pareado para as médias de TCI das linhagens 45,X e 46,XN	88
<b>Tabela 8:</b> Correlação de Pearson para a troca de cromátides irmãs (TCI) das linhagens 45,X e 46,XN do grupo amostral	88
<b>Tabela 9:</b> Análise interamostral da TCI entre as linhagens 45,X e 46,XN das pacientes com mosaicismos cromossômicos	89

## LISTA DAS ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>APC/C</b>	(do inglês <i>Anaphase-promoting complex cyclosome</i> ) Complexo promotor de anáfase/ciclossomo
<b>BE</b>	Baixa estatura
<b>BrdU</b>	(do inglês <i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i> ) 5-Bromo-2'-deoxiuridina
<b>°C</b>	grau Celsius
<b>CDKs</b>	(do inglês <i>Cyclin-dependent kinases</i> –Cdks) Cinases dependentes de ciclinas
<b>CDC20</b>	proteína ativadora do complexo APC
<b>CEP X</b>	(do inglês <i>X chromosome centromere probe</i> ) Sonda centromérica do cromossomo X
<b>CEP Y</b>	(do inglês <i>Y chromosome centromere probe</i> ) Sonda centromérica do cromossomo Y
<b>CHRF</b>	proteína ligase de ubiquitina
<b>CIN</b>	(do inglês <i>Chromosomal Instability</i> ) Instabilidade cromossômica
<b>cm</b>	Centímetro
<b>COA</b>	Coarctação da aorta
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
<b>DI</b>	Deficiência intelectual
<b>DNA</b>	(do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> ) Ácido desoxirribonucléico
<b>DNPM</b>	Desenvolvimento neuropsicomotor
<b>DXZ1</b>	sonda CEP X (centrômero do cromossomo X)
<b>DYZ3</b>	sonda CEP Y (centrômero do cromossomo Y)
<b>ENXY</b>	sonda pericentromérica centrômero do X e do Y
<b>FISH</b>	(do inglês <i>Fluorescence in situ Hybridization</i> ) Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
<b>G0</b>	Estágio quiescente ou de repouso no ciclo celular
<b>G1</b>	Fase 1 do ciclo de divisão celular das células eucarióticas
<b>G2</b>	Fase 2 do ciclo de divisão celular das células eucarióticas
<b>GH</b>	Hormônio de crescimento
<b>GTG</b>	Giemsa Tripsina Giemsa
<b>HUCFF</b>	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
<b>IC</b>	Instabilidade cromossômica
<b>i(Xq)</b>	Isocromossomo do braço longo do cromossomo X
<b>i(Yp)</b>	Isocromossomo do braço curto do cromossomo Y
<b>IGFBP2</b>	(do inglês <i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i> ) Proteína 2 Ligante de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
<b>IP</b>	Índice de proliferação
<b>IPPMG</b>	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
<b>ISCN</b>	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>

<b>Kb</b>	Kilobase
<b>KDM5C</b>	demetilase lisina-específica 5C,
<b>LSI</b>	sonda locus específica (do inglês <i>locus specific indicator</i> )
<b>M</b>	Massa molecular
<b>M</b>	Fase mitótica do ciclo celular
<b>MCC</b>	(do inglês <i>Mitotic checkpoint complex</i> ) Complexo do checkpoint mitótico
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase multiplex
<b>n-CIN</b>	(do inglês, <i>numerical chromosome instability</i> ) Instabilidade cromossômica numérica)
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>p</b>	p valor
<b>p</b>	braço curto
<b>PAR</b>	Região pseudo-autossômica
<b>PCR</b>	(do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) Reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>QFQ</b>	banda Q por fluorescência e quinacrina
<b>qPCR</b>	(do inglês <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ) Reação em cadeia da polimerase quantitativa
<b>r</b>	Cromossomo em anel
<b>rDNA</b>	DNA ribossômico
<b>RNA</b>	(do inglês <i>ribonucleic acid</i> ) Ácido ribonucléico
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>S</b>	Fase S do ciclo de divisão celular das células eucarióticas
<b>SAC</b>	(do inglês <i>Spindle Assembly Checkpoint</i> ) Checkpoint mitótico ou de fuso mitótico
<b>SB</b>	Síndrome de Bloom
<b>s-CIN</b>	(do inglês, <i>structural chromosome instability</i> ) instabilidade cromossômica estrutural
<b>SD</b>	Síndrome de Down
<b>Ser</b>	Serina
<b>SHOX</b>	Homeobox contendo gene para baixa estatura
<b>sSMC</b>	Cromossomos marcadores pequenos supranumerários
<b>SNP</b>	(do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i> ) polimorfismos de um único nucleotídeo
<b>SRY</b>	do inglês <i>sex determining region Y chromosome</i> , região determinante do sexo no cromossomo Y
<b>ST</b>	Síndrome de Turner
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecimento
<b>TCI</b>	Troca entre cromátides irmãs
<b>Thr</b>	Cinase de treonina
<b>TIMP1</b>	Inibidor tecidual de metaloproteinase 1

<b>UFRJ</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<b>UI/ml</b>	Unidade internacional por mililitro
<b>UPD</b>	(do inglês <i>Uniparental disomy</i> ) dissomia uniparental
<b>UV</b>	Radiação ultravioleta
<b>wcp</b>	(do inglês <i>whole X chromosome painting</i> ) pintura cromossômica do cromossomo X
<b>wcp</b>	(do inglês <i>whole Y chromosome painting</i> ) pintura cromossômica do cromossomo Y
<b>VAB</b>	Válvula aorta bicúspide
<b>Xp</b>	Braço curto do cromossomo X
<b>Xq</b>	Braço longo do cromossomo X
<b>XIST</b>	transcrito específico do cromossomo X inativo
<b>(X<sup>M</sup>)</b>	Cromossomo X materno
<b>(X<sup>P</sup>)</b>	Cromossomo X paterno
<b>ZFX</b>	Fator de transcrição

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1. HISTÓRICO DA SÍNDROME DE TURNER.....	22
2.2. ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS NA SÍNDROME DE TURNER.....	23
2.3. MANIFESTAÇÕES FENOTÍPICAS DA SÍNDROME DE TURNER.....	25
2.5. MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	29
2.6. MOSAICISMO CROMOSSÔMICO NA SÍNDROME DE TURNER.....	32
2.6. CICLO CELULAR.....	35
2.6.1 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR APÓS A INCORPORAÇÃO DE 5-BROMO-2´-DEOXIURIDINA (BrdU), (TROCAS ENTRE CROMÁTIDES IRMÃS - TCI).....	38
2.7. INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA.....	41
3. JUSTIFICATIVA.....	44
4. OBJETIVOS.....	46
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4.2.1. Pacientes com monossomia 45,X.....	46
4.2.1.1. Verificar a presença de mosaicismo oculto.....	46
4.2.2. Pacientes com mosaicismo cromossômico.....	46
4.2.2.1. Caracterizar a constituição cromossômica da linhagem celular adicional.....	46
4.2.2.2. Comparar o comportamento em cultura das linhagens quanto à seleção <i>in vitro</i> , índice de proliferação e instabilidade cromossômica (TCI).....	46
5. METODOLOGIA.....	47
5.1. TIPO DE ESTUDO.....	47
5.2. LOCAL DE ESTUDO.....	47
5.3. AMOSTRA.....	47
5.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	47
5.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	47
5.4. DESENHO EXPERIMENTAL.....	48
5.4.1. DESCRIÇÃO DO ESTUDO.....	49
5.4.2. ESTUDO CITOGENÉTICO.....	50
5.4.3. CULTURA DE LINFÓCITOS E OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS.....	50
5.4.4. COLORAÇÃO CONVENCIONAL.....	51
5.4.5. OBTENÇÃO DE BANDAS GTG.....	51
5.4.6. CULTURA DE LINFÓCITOS, INCORPORAÇÃO DA 5-BrdU NAS CULTURAS E OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS.....	51
5.4.7. COLORAÇÃO DIFERENCIAL DAS CROMÁTIDES IRMÃS.....	52
5.4.8. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO URINÁRIO PARA FISH.....	53
5.4.9. PROCESSAMENTO DE AMOSTRA DE MUCOSA ORAL PARA FISH.....	54

5.4.10. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO SEM CULTIVO PARA FISH.....	54
5.4.11. HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).....	55
5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5.6. QUESTÕES ÉTICAS.....	57
6. RESULTADOS.....	58
6.1. GRUPO AMOSTRAL.....	58
6.2. AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES EM DIFERENTES TECIDOS PELA TÉCNICA DE FISH .....	60
6.2.1. GRUPO DS PARTICIPANTES COM MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO X.....	63
6.2.2. Pesquisa de mosaïcismo oculto no grupo de pacientes com monossomia.....	63
6.3. ESTUDO CONSTITUCIONAL.....	65
6.3.1. AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES EM DIFERENTES TECIDOS PELA TÉCNICA DE FISH.....	65
6.4. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MONOSSÔMICAS EM DIFERENTES TECIDOS NO GRUPO DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	68
6.5. SELEÇÃO <i>IN VITRO</i> , FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MONOSSÔMICAS DE ACORDO COM A DURAÇÃO DAS CULTURAS (48, 72 e 96 horas).....	75
6.5.1. ANÁLISE INTRA-INDIVIDUAL.....	75
6.5.2. ANÁLISE INTERAMOSTRAL.....	78
6.6. DINÂMICA DE PROLIFERAÇÃO.....	79
6.7. ANÁLISE INTRA-AMOSTRAL DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (IP) NAS PACIENTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	81
6.7.1. ANÁLISE INTERAMOSTRAL DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (IP) NAS PACIENTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	82
6.8. AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA ATRAVÉS DA FREQUÊNCIA DE TROCAS E CROMÁTIDES IRMÃS (TCI).....	83
6.8.1. ANÁLISE INTRA-AMOSTRAL DA QUANTIDADE TROCA DE CROMÁTIDES IRMÃS (TCI) NAS PACIENTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	85
6.8.2. ANÁLISE INTERAMOSTRAL TROCA DE CROMÁTIDES IRMÃS (TCI) NAS PACIENTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	87
7. DISCUSSÃO.....	91
7.1. AVALIAÇÃO DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS EM DIFERENTES TECIDOS.....	91
7.1.1. GRUPO DE PARTICIPANTES COM MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO X.....	91
7.1.1.1. Presença de mosaïcismo oculto.....	91
7.2. GRUPO DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	94
7.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO CROMOSSÔMICA NO GRUPO COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	94
7.2.2. AVALIAÇÃO DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS EM DIFERENTES TECIDOS NO GRUPO DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....	97
7.3. CONSEQUÊNCIAS CELULARES DA MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO X.....	100
7.4. SELEÇÃO <i>IN VITRO</i> , FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MONOSSÔMICAS DE ACORDO COM A DURAÇÃO DAS CULTURAS.....	102

<b>7.5. ANÁLISE DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (IP) NAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....</b>	103
<b>7.6. ANÁLISE DAS TCI NAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....</b>	105
<b>7.7. LIMITAÇÃO DO ESTUDO.....</b>	109
<b>7.8. CONCLUSÃO.....</b>	110
<b>7.9. PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	112
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	113
<b>APÊNDICE 1: TERMO DE ASCENTIMENTO</b>	128
<b>APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	131
<b>APÊNDICE 3: MICROFOTOGRAFIAS DAS METÁFASES PARCIAIS DAS PARTICIPANTES COM OS CROMOSSOMOS ANÔMALOS ANALISADAS PELA FISH.....</b>	133
<b>APÊNDICE 4: PERCENTUAL DAS LINHAGENS NOS DIFERENTES TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO X</b>	146
<b>APÊNDICE 5: PERCENTUAL DE CÉLULAS DE CADA LINHAGEM NOS DIFERENTES TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO. LINHAGEM 45,X 1 SINAL; LINHAGEM 46,XN- 2 SINAIS E 47,XNN – 3 SINAIS.....</b>	147
<b>APÊNDICE 6A: VARIAÇÃO ENTRE OS TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO COM CROMOSSOMO ÍNTEGRO OU ANÔMALO DERIVADO DO CROMOSSOMO X.....</b>	148
<b>APÊNDICE 6B: VARIAÇÃO ENTRE OS TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO COM CROMOSSOMO ÍNTEGRO OU ANÔMALO DERIVADO DO CROMOSSOMO X.....</b>	149
<b>APÊNDICE 6C: VARIAÇÃO ENTRE OS TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO COM CROMOSSOMO ÍNTEGRO OU ANÔMALO DERIVADO DO CROMOSSOMO Y.....</b>	150
<b>APÊNDICE 7: FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS 45,X NOS DIFERENTES TEMPOS DE CULTURA NAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.....</b>	151
<b>ANEXO I.....</b>	152
<b>PRODUÇÕES.....</b>	157
<b>GLOSSÁRIO.....</b>	181

## 1. INTRODUÇÃO

A compreensão do genoma e sua organização são decisivas para a compreensão dos fenômenos relacionados à herdabilidade e evolução. Eventos universais como a replicação, reparo e recombinação do DNA, transposição de elementos genéticos móveis, transcrição, tradução, mitose e meiose permeiam a herdabilidade e variabilidade dos seres vivos (LI *et al.*, 2011; VOET; VOET, 2011).

A constituição cromossômica de uma espécie é constante não somente quanto ao número de cromossomos, como também à sua morfologia e ao seu conteúdo informacional, pois nos organismos eucarióticos cada cromossomo contém um conjunto característico de genes. A continuidade das espécies depende da capacidade de transmitir esse conjunto de informações às gerações seguintes (NELSON; COX, 2017).

Dessa forma, existe grande pressão seletiva em relação aos processos que mantêm o número de cromossomos inalterado. Ao mesmo tempo, dada à sua magnitude, as alterações do número (aneuploidias) e estrutura dos cromossomos, produzem efeitos celulares devastadores, pois impactam o funcionamento celular e quando constitucionais, o desenvolvimento do organismo. Deste modo, a sobrevivência das células e organismos afetados pode ser limitada ou nula. As aneuploidias compatíveis com a vida extrauterina despertam grande interesse científico, pois ajudam a compreender o impacto das alterações do número de cromossomos no funcionamento celular e do organismo (NUSSBAUM *et al.*, 2016).

As anomalias cromossômicas constituem uma ferramenta importante para a compreensão da plasticidade genômica, tendo em conta que ocorrem naturalmente em processos fisiológicos e evolutivos (BAPTISTA *et al.*, 2005; BAPTISTA *et al.*, 2008).

A Síndrome de Turner (ST) é caracterizada por baixa estatura, disgenesia gonadal e atraso do desenvolvimento puberal. A monossomia do cromossomo X, cariótipo 45,X, é a característica citogenética da ST. É uma das aneuploidias mais comuns em humanos, sendo a única monossomia observada em nativos (BIANCO *et al.*, 2008; MARZUKI *et al.*, 2011). Paradoxalmente, observa-se alta frequência de perda gestacional espontânea dos conceitos 45,X. Tem-se postulado que a presença de um segundo cromossomo sexual seria essencial para o

desenvolvimento embrionário e, por conseguinte, virtualmente todas as pessoas com ST deveriam ter mosaicismos cromossômicos com a presença de mais de uma linhagem celular (MARZUKI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2013; BISPO *et al.*, 2014).

A compreensão dos processos celulares que produzem aneuploidia e sua repercussão no funcionamento celular e orgânico é uma área de grande interesse, embora os recursos experimentais sejam limitados e complexos (ÁLVAREZ-NAVA e, SOTO-QUINTANA, 2022). A avaliação das linhagens nas participantes com mosaicismos é uma oportunidade espetacular de averiguar aspectos do funcionamento celular.

Perante o exposto acima nosso estudo teve como objetivos identificar a presença de mosaicismos ocultos, caracterizar a constituição cromossômica da linhagem celular adicional em mosaico, e comparar o comportamento em cultura das linhagens quanto à seleção *in vitro*, índice de proliferação e instabilidade cromossômica (TCI) entre as linhagens 45,X e 46,XN em indivíduos com ST.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. HISTÓRICO DA SÍNDROME DE TURNER

A ST foi primeiramente descrita pelo anatomista italiano Morgagni em 1749 (*Apud JUNG et al.*, 2009). Posteriormente, Funke (1902) relatou o aparecimento do *pterygium colli* (pescoço alado) em uma adolescente de 15 anos (*Apud HANSON et al.*, 2001). Em 1938, Henry Turner descreveu um grupo de sete adolescentes do sexo feminino com amenorreia primária, infantilismo sexual e baixa estatura (BE). Estas pacientes apresentavam também *cubitus valgus*, pescoço alado, hipertelorismo mamário, implantação baixa das orelhas e linfedema em mãos e pés (TURNER, 1938). Albright *et al.* (1942) comprovaram a falência ovariana ao relatarem a elevação de gonadotrofinas urinárias nas mulheres com ST. Em 1944, Wilkins e Fleischmann examinaram pacientes com essa anomalia e observaram a presença de ovários rudimentares.

Ullrich (1949) observou que as anomalias descritas por ele em 1930, em uma paciente do sexo feminino, foram as mesmas referidas por Turner. A síndrome passou a ser conhecida como Síndrome de Ullrich-Turner, sendo posteriormente o nome Ullrich gradualmente abandonado na denominação da doença. Em 1949, Polani, Hunter e Lennox observaram que em algumas pacientes com ST havia coarctação da aorta. Entretanto, a etiologia desta condição era desconhecida (*Apud JUNG et al.*, 2009).

Barr e Bertram (1949) descreveram uma estrutura observada somente nos neurônios de gatas, conhecida como satélite nucleolar, que foi denominada corpúsculo de Barr ou cromatina sexual. Esses autores concluíram que a presença dessa estrutura de localização perinucleolar em células de mamíferos poderia caracterizar o sexo feminino.

Décourt *et al.* (1954) avaliaram o sexo nuclear em biópsias de pele e de outros órgãos, em pacientes com ST; duas apresentaram cromatina sexual, sugerindo o sexo feminino, mas nas outras duas, essa estrutura não foi observada, caracterizando um padrão nuclear masculino.

Após o desenvolvimento de metodologias para estudo cromossômico, Ford *et al.* (1959) avaliaram uma paciente de 14 anos que apresentava as características da ST como baixa estatura, amenorreia primária, disgenesia gonadal, ausência de

caracteres sexuais secundários e cromatina sexual negativa. Foi observado o cariótipo 45,X, relacionando a monossomia do cromossomo X à ST.

## 2.2. ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS NA SÍNDROME DE TURNER

A identificação da monossomia do cromossomo X na ST é um marco na citogenética humana por tratar-se da primeira monossomia cromossômica identificada na espécie (JUNG *et al.*, 2009).

A monossomia do cromossomo sexual (45,X) é considerada a característica citogenética da ST. Estima-se que ocorra em 1-2% de todos os conceptos humanos, sendo que mais de 99% dos embriões com constituição 45,X são abortados espontaneamente antes de 13 semanas de vida intrauterina (JUNG *et al.*, 2009; MARZUKI, *et al.*, 2011; ALVES, *et al.*, 2013). A alta letalidade dos conceptos com constituição 45,X é intrigante, pois não se observam consequências fenotípicas limitantes nas pessoas com esta constituição cromossômica (GRAVHOLT *et al.*, 2019).

A constituição cromossômica na ST é heterogênea. Jacobs *et al.* (1997) estudaram, pela citogenética convencional e pela FISH, 211 pacientes com ST e observaram alterações cromossômicas numéricas e estruturais nos cromossomos sexuais. Quarenta e seis por cento (46%) apresentaram o cariótipo 45,X; em 7% das pacientes houve mosaïcismo, estando também presente uma segunda linhagem celular com constituição 46,XX. Também foram observadas anomalias estruturais do cromossomo X, sendo que a mais frequente foi o isocromossomo do braço longo do cromossomo X, i(Xq), presente em 18%; 16% apresentaram cromossomo em anel (r) e 5% deleções do braço curto (p) do cromossomo X. Além disso, em 6% foi detectada a presença de cromossomo Y anormal e 2% das pacientes apresentaram outras anormalidades.

Na revisão realizada por Oliveira *et al.* (2009) as alterações estruturais do cromossomo X (isocromossomo do braço longo, cromossomo dicêntrico, deleções do braço curto e cromossomo em anel) ocorreram em torno de 30% das pacientes, sendo estas alterações universais ou em mosaico, acompanhadas de uma linhagem 45,X. Em aproximadamente 5% das pacientes foram observadas alterações estruturais do cromossomo Y (isocromossomo do braço longo e cromossomo

dicêntrico) e mosaicismo, no qual uma linhagem celular estava acompanhada por outras linhagens com o cromossomo Y, íntegro ou não.

Bispo *et al.* (2014) avaliaram uma amostra de 74 pacientes, utilizando técnicas de biologia molecular, 50 a 60% das pacientes apresentaram cariótipo 45,X, enquanto que as demais apresentaram um cromossomo X anormal, incluindo deleção Xp ou Xq, isocromossomo de braço longo do cromossomo X e cromossomo em anel. Estudos realizados no Brasil demonstraram que aproximadamente 40-60% das pacientes com ST apresentaram monossomia do cromossomo X (JUNG *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2010; MIGUEL *et al.*, 2011).

Gravholt *et al.* (2023), numa revisão recente, compilaram que aproximadamente 40 a 50% das mulheres com ST possuíam cariótipo 45,X, 15-25% apresentaram mosaicismo com cariótipo 45,X/46,XX. Os cariótipos com variações estruturais do cromossomo X, como o isocromossomo Xq, deleções parciais de Xp ou Xq estão presentes em 10% dos casos; outros cariótipos, como deleções, inversões e cromossomo em anel, ocorrem em 24% dos indivíduos. Além disso, 10-12% apresentaram materiais derivados do cromossomo Y; em cerca de 4%, o cariótipo 45,X/46,XY estava presente.

Outra alteração citogenética recorrente na ST é a presença de cromossomos marcadores que ocorrem numa frequência estimada de 3% (BONDY, 2005).

Liehr *et al.* (2007) revisando 512 pacientes com cromossomos marcadores pequenos supranumerários (sSMC) na ST, através da técnica de FISH, verificaram que mais de 99% foram derivados dos cromossomos sexuais. Foram observados três diferentes grupos de sSMC na ST. A maioria foi originada do cromossomo Y (72,6%), o segundo grupo foi formado por sSMC derivados do cromossomo X (27%) e ainda foi detectado um pequeno grupo de sSMC derivados de autossomos (0,4%).

Recentemente, Chen *et al.* (2021) realizaram uma análise retrospectiva de uma coorte de 244 pacientes com desordem sexual (DSD) e encontraram 69 pacientes com ST. Destas, 13 apresentaram sSMC, 11 foram testadas para o gene SRY, que foi detectado em 10, uma foi negativa para SRY e duas não foram testadas.

A presença de sequências do cromossomo Y em pacientes com ST é considerada um fator de risco para o desenvolvimento do gonodblastoma (BIANCO *et al.*, 2009; de MARQUI *et al.*, 2016; BUCERZAN *et al.*, 2017; GRAVHOLT *et al.*,

2019; GRAVHOLT *et al.*, 2023). Gravholt *et al.* (2017) propuseram que o risco de gonadoblastoma é de aproximadamente 10%. Assim sendo, a gonadectomia profilática é recomendada em pacientes com ST que apresentam sequências do cromossomo Y (RASOULI *et al.*, 2019; GRAVHOLT *et al.*, 2023).

### 2.3. MANIFESTAÇÕES FENOTÍPICAS DA SÍNDROME DE TURNER

O aspecto fenotípico da ST é muito diversificado, a baixa estatura (BE) e a insuficiência ovariana são os achados clínicos mais comumente encontrados (LARANJEIRA; BORGES, 2010; GRAVHOLT *et al.*, 2019; GRAVHOLT *et al.*, 2023).

O cariótipo 45,X em mulheres com ST está associado a uma alta incidência de mortalidade e de comorbidades, como o hipotireoidismo, cardiopatias e outras condições fenotípicas. No cariótipo 45,X, ocorre a perda de um dos cromossomos X, acarretando haploinsuficiência dos genes desse cromossomo, podendo causar um fenótipo mais grave nesses indivíduos (CAMERON-PIMBLETT, *et al.*, 2017; LEE; WU, 2019; MONDAL *et al.*, 2020; GRAVHOLT *et al.*, 2019).

Cariótipos com isocromossomo do braço longo do cromossomo X (Xq) e com o cromossomo em anel r(X) têm sido correlacionados à perda auditiva, a doenças autoimunes, a cardiopatias congênitas e ao diabetes (CAMERON-PIMBLETT, *et al.*, 2017; LEE ; WU, 2019; NOORDMAN *et al.*, 2021; MONDAL *et al.*, 2020; GRAVHOLT *et al.*, 2019).

Nos indivíduos que possuem mosaïcismo cromossômico as manifestações fenotípicas podem ser mais brandas, ou seja, com poucas características típicas da ST, com baixa incidência de problemas cardiovasculares e a ocorrência, embora em baixa frequência, de puberdade espontânea (NOORDMAN *et al.*, 2021).

Uma das principais características da ST é a BE, acometendo em torno de 88 a 100% das pacientes com ST (ACOSTA; STEINMAN; WHITE, 2019; GRAVHOLT *et al.*, 2019); é o principal sinal para a suspeita da ST (GUIMARÃES *et al.*, 2001; SKUSE; PRINTZLAU; WOLSTENCROFT, 2018; ACOSTA; STEINMAN; WHITE, 2019; GRAVHOLT *et al.*, 2019).

Na região pseudoautosômica (PAR1) dos cromossomos sexuais foi identificado um gene denominado *SHOX* (*short stature homeobox-containing gene*), situado em X(Xp22.3) e Y(Yp11.3), fundamental na determinação da altura normal

(RAO *et al.*, 1997). A haploinsuficiência desse gene está associada a algumas dismorfias em pacientes com ST, como a BE, bem como anomalias esqueléticas, incluindo o palato ogival, *cubitus valgus*, *genu valgum*, metacarpos curtos e as anomalias auditivas, decorrentes de alterações esqueléticas da orelha interna (OLIVEIRA; ALVES, 2011; FUKAMI; SEKI; OGATA, 2016; CUI *et al.*, 2018; ACOSTA; STEINMAN; WHITE, 2019; GRAVHOLT *et al.*, 2023).

A estatura final raramente ultrapassa média de 142 a 146,8 cm, ou seja, 20 cm abaixo da média da população feminina adulta, sendo mais baixa do que mulheres que apresentam a haploinsuficiência isolada do gene *SHOX*, sugerindo que outros fatores como o gene *IGFBP2* (proteína 2 ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina; (do inglês *insulin like growth factor binding protein 2*), ou outros mecanismos genéticos e epigenéticos possam estar envolvidos na BE das mulheres com ST (GRAVHOLT *et al.*, 2023).

As anomalias esqueléticas mais comumente encontradas na ST são o *cubitus valgus* (aproximadamente 27 a 75%), atraso da idade óssea (85%), quarto metacarpo curto e *genu valgum* (35%) (GONZALES; WITCHEL, 2012; GRAVHOLT *et al.*, 2019; MONDAL *et al.*, 2020; KILINC; YILDIZ; GUVEN, 2020). Além disso, em 50 a 80% das mulheres com ST pode ocorrer diminuição da mineralização óssea, o que aumenta em 25% o risco para a ocorrência de fraturas osteoporóticas. Esse risco é elevado durante a infância, particularmente a fratura de punho, e após os 45 anos em decorrência da osteoporose franca, presente em 55 a 64% das mulheres com ST (GRAVHOLT *et al.*, 2019; AUGOULEA; ZACHOU; LAMBRINOUDAKI, 2019; MONDAL *et al.*, 2020).

As alterações cardiovasculares são a principal causa de mortalidade precoce e redução da expectativa de vida na ST, contribuindo em especial as cardiopatias congênitas e adquiridas com 8 e 41% da mortalidade por todas as causas, respectivamente (MORTENSEN *et al.*, 2012; SYBERT, 1998; BONDY, 2007; PINSKER, 2012; GRAVHOLT *et al.*, 2019, NOORDMAN *et al.*, 2021). As cardiopatias mais comuns são as que acometem o lado esquerdo do coração, válvula aórtica bicúspide (VAB) (14 a 34%) e coarctação da aorta (CoA) (6 a 16%) (SYBERT, 1998; PINSKER, 2012; DAVIS; GEFFNER, 2019; GRAVHOLT *et al.*, 2019; NOORDMAN *et al.*, 2021; McCARRISON *et al.*, 2023).

Um dos principais fatores de risco para eventos cardiovasculares é a hipertensão, que acomete 40% das crianças e jovens e 50 a 60% das adultas com ST (CUI *et al.*, 2018; DAVIS; GEFNER, 2019; McCARRISON *et al.*, 2023).

Gravholt *et al* (2019) relataram que a VAB e a CoA apresentaram uma maior incidência nas mulheres com ST e cariótipo 45,X (sem mosaicismo). Sybert (1998), observou que as malformações cardíacas foram mais prevalentes no subgrupo de pacientes com cariótipo 45,X (39%) em relação aos demais subgrupos, que incluem isocromossomo de braço longo do cromossomo X i(Xq) (11-12%) com ou sem mosaicismo.

Em um estudo recente, realizado por Nordmann *et al* (2021) foi observado que as pacientes com ST e cariótipo 45,X (sem mosaicismo) apresentaram uma maior prevalência de malformações cardíacas, como a VAB ou CoA e anomalias ao eletrocardiograma (ECG), em relação às demais pacientes. Corbitt *et al* (2018) sugeriram que a haploinsuficiência do gene *TIMP1* (inibidor tecidual da metaloproteinase da matriz 1), que escapa da inativação do cromossomo X, localizado no braço curto do cromossomo X, locus Xp11.3, devido à falta de um segundo cromossomo X completo, associada ao polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) de seu parálogo, o gene *TIMP3*, situado no braço longo do cromossomo 22, locus 22q12.3, aumentam sinergicamente o risco de VAB e dilatação da aorta torácica nas mulheres com ST. Além disso, a haploinsuficiência do gene *TIMP1* está associada à maior incidência de aneurisma da aorta na ST (GRAVHOLT *et al.*, 2019). Entretanto, ainda não está bem esclarecido o papel da perda de material do cromossomo X no desenvolvimento de anomalias cardíacas (GRAVHOLT *et al.*, 2023).

O hipogonadismo hipergonadotrófico está presente em mais de 90% das mulheres com ST, acarretando atraso puberal, esterilidade e mais tardiamente osteoporose (GUIMARÃES *et al.*, 2001; BONDY, 2009; DÖGER *et al.*, 2015; REDEL; BACKELJAUW, 2018; GRAVHOLT *et al.*, 2019). Embora o mecanismo responsável por esse fenótipo ainda seja desconhecido, uma perda considerável de oócitos dos ovários ocorre durante a vida intrauterina (OGATA; MATSUO, 1995; SKUSE; PRINTZLAU; WOLSTENCROFT, 2018; GRAVHOLT *et al.*, 2019). Entretanto, 15-30% podem apresentar desenvolvimento puberal espontâneo. Ademais, o desenvolvimento puberal está fortemente relacionado ao cariótipo, por

exemplo, apenas 2 a 3% das mulheres com o cariótipo 45,X apresentam períodos menstruais regulares; nos poucos casos onde ocorre, geralmente há o surgimento da amenorreia secundária, alguns anos depois (GRAVHOLT *et al.*, 2019).

O desenvolvimento neuropsicomotor é habitualmente normal na ST. No entanto, 25 a 40% dos indivíduos com ST apresentam algumas dificuldades neurocognitivas específicas, como distúrbios de memória visual, atenção e raciocínio matemático, em consequência de problemas na percepção espacial e temporal, além de dificuldades psicossociais, déficit psicomotor e neurofisiológico (GONZALEZ; MITCHEL, 2012; GRAVHOLT *et al.*, 2017, GRAVHOLT *et al.*, 2019). Pacientes com ST com cromossomo X em anel com tamanho pequeno ou cromossomo marcador podem apresentar deficiência intelectual acentuada associada a um quadro dismórfico não usual dessa síndrome, incluindo graves malformações congênitas (TOMKINS *et al.*, 2002; LEPPIG *et al.*, 2004; LIEHR *et al.*, 2013; MAZZASCHI *et al.*, 2014; GRAVHOLT *et al.*, 2019).

Mazzaschi *et al.* (2014) propuseram que cromossomos marcadores ou em anel com ausência do gene *XIST* (transcrito específico do cromossomo X inativo) funcional, produzem dissomia funcional de vários genes, comprometendo o mecanismo de compensação de dose e o balanceamento da expressão gênica, levando a fenótipo mais grave inclusive com deficiência intelectual nas mulheres com ST.

Avaliações neurológicas realizadas em indivíduos com aneuploidia dos cromossomos sexuais sugerem que a inativação do cromossomo X e os genes que escapam da inativação desempenham contribuições importantes para a função e o desenvolvimento do cérebro. De fato, as aneuploidias do cromossomo X podem causar transtornos cognitivos, emocionais e/ou comportamentais, como observado na síndrome de Klinefelter, síndrome do triplo X ou mesmo na ST (BERLETCH *et al.*, 2011). Trolle *et al.* (2016) sugeriram que o gene *KDM5C* que codifica uma demetilase lisina-específica 5C, localizado no braço curto do cromossomo X (Xp11.22) e que participa da repressão da transcrição de genes neuronais, poderia ter um papel importante no perfil neurocognitivo da ST, porém esta questão ainda não está totalmente esclarecida.

Estudos prévios sugeriram que a origem parental do cromossomo X na ST pode influenciar o fenótipo de acordo com o cromossomo X conservado (CHU *et al.*,

1994; SKUSE *et al.*, 1997; SKUSE *et al.*, 2018). As diferenças epigenéticas entre meninas com o cromossomo X de origem materna ( $45,X^M$ ) e o de origem paterna ( $45,X^P$ ), demonstraram que há variações fenotípicas consideráveis em relação às funções cognitivas, indicando a possibilidade de um *imprinting* genético na expressão de alguns genes do cromossomo X (SKUSE *et al.*, 1997; SKUSE *et al.*, 2018). Entretanto, ainda não está totalmente elucidado se o *imprinting* parental do cromossomo X produz algum efeito sobre o fenótipo da ST (DEVERNAY *et al.*, 2012; LEPAGE *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2014).

Outros achados clínicos prevalentes na ST são: anomalias renais, o diabetes mellitus, hipotireoidismo, hiperlipidemia, doenças reumáticas e autoimunes, perturbações inflamatórias no intestino, otite média e obesidade (GONZALEZ; MITCHEL, 2012; CAMERON-PIMBLETT *et al.*, 2017, GRAVHOLT *et al.*, 2019).

## 2.4. MOSAICISMO CROMOSSÔMICO

O mosaicismismo cromossômico é um evento pós-zigótico decorrente de erros nas primeiras divisões do zigoto, resultando em uma ou mais linhagens celulares. Ele é definido pela presença de duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes em um único indivíduo. Em humanos, tem sido detectado em embriões, e fetos abortados espontaneamente, em crianças com malformações congênitas ou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (LAURIE *et al.*, 2011). Tem sido frequentemente documentado em casos de pacientes com cromossomos marcadores (sSMC) (WOLF *et al.*, 1994; LIEHR; CLAUSSEN; STARKE, 2004; IOUROV; VORSANOVA; YUROV, 2008).

Iourov *et al.* (2019) sugeriram que o mosaicismismo cromossômico e a instabilidade cromossômica são mecanismos ou elementos de uma cascata de eventos que participam de um grande espectro de patologias, que atuam como mediadores da diversidade genética interindividual, do desenvolvimento pré-natal e do envelhecimento.

Correlacionado inicialmente a fenótipos anômalos, o mosaicismismo cromossômico parece ser um evento comum, associado aos processos de proliferação celular, ação de agentes mutagênicos e senescência. Há também uma

relação do mosaicismos com eventos normais do desenvolvimento, sendo que a caracterização destes processos se amplia exponencialmente; são exemplos desta situação os rearranjos presentes nos linfócitos B e T, as aneuploidias em células cerebrais, e poliploidias em diferentes tecidos (LAURIE *et al.*, 2012; McCONNELL *et al.*, 2013; FORSBERG; GISSELSSON; DUMANSKI, 2017).

O mosaicismos pode envolver células somáticas ou células germinativas, dependendo do momento do desenvolvimento que ocorre erro na divisão celular. A presença de células anômalas numa linhagem de células somáticas pode ser limitada a uma pequena região do organismo, caso a mutação ocorra após a diferenciação celular (TAYLOR *et al.*, 2014; FORSBERG; GISSELSSON; DUMANSKI, 2017).

Segundo Miller *et al.*, 2010, o mosaicismos cromossômico, pode resultar de erros de divisão celular que levam a perda de um cromossomo normal ou anômalo, ou ainda, no caso dos cromossomos autossomos, ser decorrente de resgate funcional, ou seja, da tentativa de normalização de células aneuploides. Geralmente, o ganho ou perda de um cromossomo inteiro ocorre durante a anáfase (DE, 2011). A perda cromossômica pós-zigótica é um mecanismo comum que pode acarretar aneuploidia em mosaico nos estágios primordiais do embrião, e na sequência um maior risco de ganho de cromossomos e mais raramente não-disjunção mitótica (DE, 2011).

A aneuploidia em mosaico é a presença de duas ou mais linhagens celulares que diferem em número de cromossomos, resultante do ganho ou perda de um cromossomo durante o desenvolvimento do embrião (ROBINSON *et al.*, 1995). A aneuploidia em mosaico é comum nos humanos e está associada a diversas manifestações fenotípicas, principalmente em relação a síndromes envolvendo cromossomos sexuais com a ST, síndrome de Klinefelter, Triplo X, entre outras (TAYLOR, *et al.*, 2014; SKUSE; PRINTZLAU; WOLSTENCROFT, 2018). Iourov *et al.* (2019) sugeriram que a monossomia do cromossomo X e outras aneuploidias dos cromossomos sexuais (principalmente em cariótipos femininos ou masculinos com mosaicismos envolvendo o cromossomo X) podem estar envolvidas na etiologia de doenças mentais e autoimunes.

O cromossomo X é um cromossomo peculiar. Para a compensação de dose nas células com mais de um cromossomo X, ocorre a inativação aleatória de um desses cromossomos. Este fenômeno ocorre no início do desenvolvimento embrionário, o que torna o embrião feminino um mosaico celular com células que inativaram o cromossomo X paterno e células que inativaram o cromossomo X materno (ROSS *et al.*, 2005; KOREN, 2014). Os cromossomos inativos apresentam replicação tardia, o que os torna particularmente susceptíveis a erros de divisão celular, já que as regiões de heterocromatina apresentam replicação desorganizada e aleatória, acarretando uma resposta diferencial a lesões do DNA, o que facilitaria o aumento da taxa de mutação (KOREN, 2014).

Durante o envelhecimento feminino se observa perda dos cromossomos sexuais, principalmente do cromossomo X inativo. Por este motivo, em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos existe uma maior probabilidade de aparecerem linhagens celulares com monossomia X (mosaicismo de baixa frequência) mesmo que não apresentem diagnóstico de infertilidade (CATALÁN *et al.*, 2000).

Um estudo analisou por PCR quantitativo (qPCR) e *array* de metilação 33 mulheres selecionadas de um conjunto de quase 40.000 mulheres, detectou mosaicismos para o cromossomo X em 124 mulheres. Os autores observaram que a taxa de mosaicismos do cromossomo X aumentou com a idade (0,11% aos 50 anos; 0,45% aos 75 anos). Os resultados obtidos sugeriram que os eventos envolvendo monossomia do cromossomo X são mais prováveis de ocorrer no cromossomo X inativo, podendo ser fenotipicamente neutros. Tal como acontece no mosaicismos de cromossomos autossômicos e do cromossomo Y, o mosaicismos do cromossomo X aumenta com a idade (MACHIELA *et al.*, 2016).

A detecção do mosaicismos depende de quatro fatores: o tipo e o número dos tecidos analisados, o número de células estudadas, a sensibilidade das técnicas utilizadas e a possibilidade de seleção, a qual pode resultar no desaparecimento da linhagem celular anômala (OLIVEIRA *et al.*, 2009). De acordo com Forsberg *et al.* (2017), a escolha de quais tecidos ou células que serão avaliados é de suma importância.

O estudo citogenético geralmente é realizado em células cultivadas, sendo que fatores *in vitro* podem influenciar a proporção das diferentes linhagens. Células

com constituição anômala podem ser selecionadas *in vitro* e *in vivo* por apresentarem velocidade de proliferação e capacidade de sobrevivência distinta (LAURIE *et al.*, 2012).

A população de linfócitos do sangue periférico representa células advindas da expansão clonal de células progenitoras, cuja expansão é decorrente de diferentes fatores ambientais e fisiológicos, e não reflete a composição do tecido que as originou. Assim, o estudo de células provenientes de diversos tecidos, especialmente as células do sedimento urinário, pode ser mais informativo a respeito da constituição embrionária do que a análise das células sanguíneas (LAURIE *et al.*, 2012).

A citogenética molecular e as técnicas de escaneamento genômico demonstraram que nos indivíduos com cromossomos estruturalmente anômalos, o mosaicismo estava presente em 1,7-4% dos indivíduos (YOUSSEFIAN; PYERITZ, 2002; IOUROV *et al.*, 2010; IOUROV *et al.*, 2019). Logo, a utilização de técnicas moleculares como a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) melhoram substancialmente a detecção de linhagens celulares de baixa frequência (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

## 2.5. MOSAICISMO CROMOSSÔMICO NA SÍNDROME DE TURNER

Considerando a alta incidência de perda gestacional nos embriões com constituição 45,X, Hook e Warburton (1983) sugeriram que a presença de dois cromossomos sexuais seria essencial nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário; assim, todas as nativas com ST deveriam apresentar uma segunda linhagem celular além da monossômica. Hassold, Benham e Leppertt (1988) demonstraram, através da análise em material de aborto, uma taxa de 7,4% de mosaicismo dos cromossomos sexuais. No entanto, os autores observaram que 77% dos abortos espontâneos ocorreram em fetos 45,X, sugerindo que os nativos com cariótipo 45,X devem apresentar mosaicismo.

A hipótese do mosaicismo para a sobrevivência dos fetos com ST é apoiada pelo argumento de que existiria um efeito feto-protetor produzido por um ou mais genes dos cromossomos sexuais X ou Y. Segundo esse conceito, duas cópias desses genes devem estar presentes no feto ou nos tecidos extra embrionário

(FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2000). Os autores ainda sugeriram que devido à alta porcentagem de abortos dos fetos com monossomia pura (45,X), o mosaicismo seria necessário para a sobrevivência dos fetos com ST, já que o número de abortos espontâneos é muito menor quando há a presença de uma segunda linhagem celular, como por exemplo, 46,XX. Contudo, um elevado percentual das pacientes com constituição 45,X/46,XX podem ser diagnosticadas como 45,X erroneamente.

Se esta hipótese for verdadeira, é possível que uma linhagem celular com frequência no sangue menor que 10% não seja detectada pela citogenética tradicional (PREMI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Held, Keber e Kaminsky (1992) utilizando técnicas de biologia molecular, avaliaram 87 pacientes com ST e detectaram uma alta frequência de mosaicismo em linfócitos e fibroblastos: 58 pacientes (66,7%). Das pacientes com mosaicismo, 16 pacientes (18,4% do total) apresentavam uma segunda linhagem com cromossomo marcador. De acordo com esses autores, somente 18 (20,7%) pacientes apresentavam constituição cromossômica 45,X, enquanto 11 pacientes (12,6%) possuíam anomalias estruturais.

Em humanos, quase todas as monossomias com ou sem mosaicismo presentes em aproximadamente mais de 30% das células são incompatíveis com a vida, exceto a monossomia do cromossomo X (IOUROV *et al.*, 2019). Isso sugere que os nativos com monossomia do cromossomo X poderiam apresentar mosaicismo (mosaicismo críptico), visto que fetos com monossomia universal do cromossomo X são achados comuns em abortos espontâneos nos primeiros estágios da gestação (HOOK; WARBURTON, 2014).

Quanto à presença de sequências específicas do cromossomo Y em pacientes com ST, López *et al.* (1998) detectaram através de PCR e *Southern blot* estas sequências em 12% de 50 pacientes com ST e cariótipos diversos, com mosaico ou não. Mendes *et al.* (1999) em um estudo de 36 pacientes com ST e cariótipos diversos, sem comprovação prévia de materiais do cromossomo Y, encontraram duas pacientes com sequências de Y por PCR, no sangue periférico e nas gônadas.

A técnica de FISH aumentou a detecção de mosaicismo cromossômico em pacientes com ST.

Nazarenko *et al* (1999) também observaram que a análise citogenética é insuficiente para detectar a presença de mosaicismos cromossômicos em pacientes com ST. A análise adicional de células de tecidos de diferentes origens embrionárias (linfócitos mesodérmicos e células ectodérmicas do epitélio oral, por exemplo) permitiu maior precisão na definição do diagnóstico citogenético. A análise pela FISH com sonda para o cromossomo X permitiu um resultado mais preciso, mostrando que 29% dos 50 pacientes com monossomia pura do cromossomo X detectada pelo cariótipo convencional apresentavam mosaicismos. Além disso, de acordo com esses autores, foi observada uma constituição cromossômica distinta em diferentes tecidos do mesmo indivíduo, destacando assim a possibilidade de que anormalidades cromossômicas ou a presença de um segundo cromossomo sexual possam estar ausentes no sangue, mas presentes em outros tecidos de origem embrionária diferente.

Um estudo realizado em células de mucosa oral de 63 pacientes com ST, pela técnica de FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y, detectou mosaicismos em 19 (30,2%), sendo que em cinco as linhagens adicionais continham derivados do cromossomo Y. Os autores sugeriram que, a análise da mucosa oral pela técnica de FISH ou pelo PCR em tempo real, deveria ser considerada como rotina para investigar pacientes com ST que apresentam cariótipo 45,X nos linfócitos do sangue periférico (FRERIKS *et al.*, 2013).

Em 2019, Thunström *et al.* compararam, pela técnica de FISH utilizando sondas centroméricas para o cromossomo X, o grau de mosaicismos entre os lados direito e esquerdo da mucosa oral em 20 mulheres com ST. Os autores observaram que pode ter ocorrido o mosaicismos intra-orgânico, com diferença acima de 38% proporção de células com mosaicismos entre os dois lados da mucosa oral.

Barbosa *et al.* (2021) estudaram 109 pacientes com ST pela Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (mPCR). Avaliaram células de mucosa oral e sangue periférico, para investigar a presença de mosaicismos ocultos para o cromossomo Y; observaram que em 12,8% das pacientes o cromossomo Y estava presente em ambos tecidos e concluíram que a citogenética convencional pode não detectar a presença de uma linhagem minoritária. Logo, a utilização de métodos mais sensíveis, como a mPCR, é mais preciso para verificar a presença de mosaicismos crípticos com derivados do cromossomo Y em pacientes com ST.

Ainda não está clara a relação entre a prevalência de células de cada linhagem celular e a manifestação fenotípica observada. Admite-se também que a distribuição do mosaicismo nos diferentes tecidos possa contribuir para a variabilidade da manifestação fenotípica (LIEHR *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014; WU e SUN, 2016).

## 2.6. CICLO CELULAR

O ciclo celular é uma sequência de eventos, no qual o crescimento da célula ocorre pela replicação de todos componentes celulares, originando duas células filhas geneticamente idênticas (WENZEL; SINGH, 2018).

Estes fenômenos são visualizados citologicamente, períodos com o núcleo delimitado, denominado interfase, e a fase cinética da divisão onde ocorre a condensação dos cromossomos, ruptura do núcleo e distribuição das cromátides entre as células filhas, denominada mitose (SCHAFER, 1998). Compreende estas fases subsequentes onde ocorrem eventos distintos. A interfase é subdividida nas fases G1, S, G2; e a mitose (M), (Figura 1), (SCHAFER, 1998; WILSON; THOMPSON, 2007; WENZEL; SINGH, 2018).

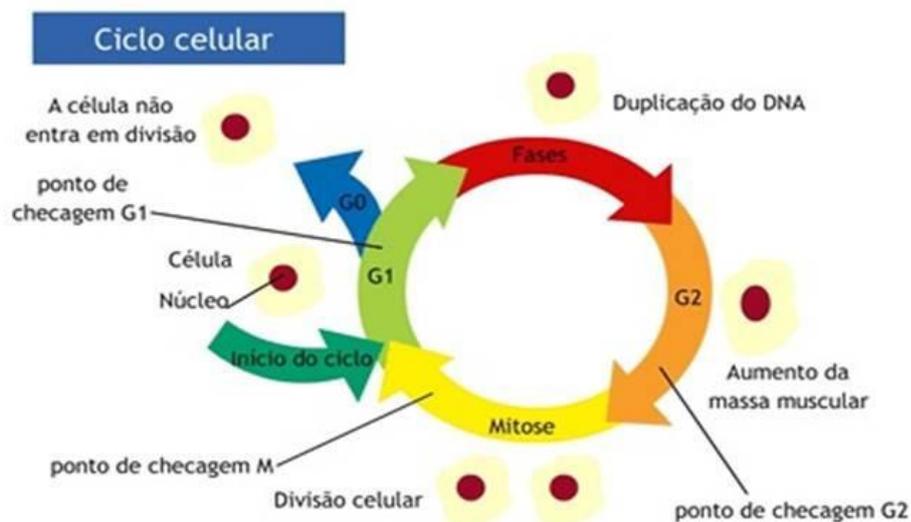


Figura : 1. Ciclo celular.

Fonte: Modificado de Só Biologia (<https://www.sobiologia.com.br>), 2008.

Nota: ponto de checagem M é denominado também de ponto de checagem do fuso mitótico (SAC)

As fases da intérfase são morfologicamente indistinguíveis e compreendem diversos eventos moleculares. As fases G1 e G2 representam intervalos (gaps) que ocorrem entre a síntese de DNA (fase S) e a mitose (SCHAFER, 1998).

O primeiro intervalo, conhecido como fase G1, tem duração variável, é o período entre o final da citocinese da divisão anterior, e o início da fase S; as células em G1 podem deixar temporariamente ou permanentemente o ciclo celular e entrar em um estágio quiescente ou de repouso conhecido como G0 (WENZEL; SINGH, 2018). A síntese de DNA ocorre num período denominado de fase S, durante esse processo cada cromossomo se duplica em duas cromátides irmãs, que se mantêm unidas firmemente ao centrômero (WILSON; THOMPSON, 2007; WENZEL; SINGH, 2018). A fase G2, segundo intervalo, ocorre entre o final da síntese de DNA e o início da mitose ou fase M (SCHAFER, 1998). A fase M ou mitose pode ser visualizada citologicamente, é subdividida em cinco etapas: prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese (SCHAFER, 1998; WILSON; THOMPSON, 2007; WENZEL; SINGH, 2018).

Os mecanismos de regulação do ciclo celular são essenciais para o desenvolvimento e reprodução da célula, e envolvem muitas proteínas reguladoras, tais como as ciclinas e as cinases dependentes ciclinas (do inglês *Cyclin-dependent kinases* -Cdks) (SCHAFER, 1998; BARNUM; O'CONNELL, 2014; WENZEL; SINGH, 2018).

As (CDKs) são pequenas proteínas cinases de treonina (Thr) e serina (Ser), que são ativadas por um conjunto complexo de proteínas e enzimas, principalmente pela associação transitória das CDKs com ciclinas. Elas promovem a síntese de DNA e a segregação cromossômica através fosforilação de grupos de substratos protéicos (SCHAFER, 1998; HEUVEL, 2005; BARNUM; O'CONNELL, 2014; GAO; LIU, 2019).

Existem diferentes tipos de ciclinas, mas somente algumas estão envolvidas na regulação do ciclo celular. Os principais membros das ciclinas que estão diretamente envolvidos no controle e na progressão do ciclo celular são: as classes A (A1 e A2), B, D (D1, D2 e D3) e E (E1 e E2). Em relação às CDKs, dependendo das funções que desempenham, podem ser subdivididas em dois grupos principais: CDKs do ciclo celular (CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6) e as CDKs transcricionais (CDK7, CDK8 e CDK9) (VENTURA; GIORDANO, 2019).

O ciclo celular é monitorado por uma rede de mecanismos complexos denominados *checkpoints* (pontos de checagem) (RADONOVA *et al.*, 2019). Esse monitoramento controla a transição entre as fases, possibilitando a fiel e completa replicação do DNA e a manutenção da estabilidade genômica (SCHAFER, 1998; RADONOVA *et al.*, 2019).

No ciclo celular existem três *checkpoints*: o *checkpoint* de G1/S, o de G2/M e o de montagem do fuso mitótico (SCHAFER, 1998; BARNUM; O'CONNELL, 2014; WENZEL; SINGH, 2018; RADONOVA *et al.*, 2019).

Quando ocorrem danos na estrutura do DNA *checkpoint* G1 ou G1/S e o da fase G2/M bloqueiam a transição para a fase subsequente, ativando processos de reparo de DNA, e evitando a transmissão de cromossomos danificados ou incompletos para as células filhas (SCHAFER, 1998; KASTAN; BARTEK, 2004; BARNUM; O'CONNELL, 2014; POON, 2016). Além disso, caso o dano seja irreparável, a célula interrompe o seu crescimento e entra em apoptose (KASTAN; BARTEK, 2004).

O *checkpoint* da transição G1/S impede que as células que possuem DNA danificado entrem na fase S do ciclo celular (VENTURA; GIORDANO, 2019; RADONOVA *et al.*, 2019). Quando são detectadas lesões no DNA, a proteína p53 é ativada, e através da transcrição de diversos genes induzida pela p53, o reparo de DNA é conduzido (VENTURA; GIORDANO, 2019).

O *checkpoint* da fase G2, também conhecido como G2/M inibe a ação da ciclina Cdk 1-B impedindo que células com danos no DNA, provenientes das G1 e S ou da fase G2 entrem em mitose (MURRAY, 2004; BARNUM; O'CONNELL, 2014; POON, 2016; RADONOVA *et al.*, 2019). Esse mecanismo é regulado pela proteína ligase de ubiquitina, a CHFR (PRIVETTE; PETTY, 2008).

A CHFR regula os *checkpoints* durante a pró-metáfase, controlando a condensação e a ruptura do invólucro nuclear e impossibilitando a progressão do ciclo celular, se for o caso, durante o stress mitótico. Além disso, ela assegura a integridade genômica, pela ativação mecanismos de reparo e proteção cromossômica e impedindo anomalias cromossômicas (PRIVETTE; PETTY, 2008).

O *Checkpoint* mitótico ou *checkpoint* do fuso mitótico (SAC, do inglês *Spindle Assembly Checkpoint*) evita a separação prematura das cromátides irmãs durante a mitose, assegurando a correta segregação dos cromossomos na transição

metáfase-anáfase, bloqueando a progressão para a anáfase até que todos os cromossomos estejam corretamente ligados aos microtúbulos do fuso mitótico e alinhados na placa equatorial (LARA-GONZALEZ *et al.*, 2012; BASTIANS, 2015; MUSACCHIO, 2015; RADONOVA *et al.*, 2019). O SAC envolve diversas proteínas, tais como a MAD1, MAD2, BUB1, BUBR1, BUB3 e a MSP1, que são recrutadas para os cinetocoros, quando estes estão ligados incorretamente aos microtúbulos do fuso. A ação conjunta dessas proteínas com outros componentes do cinetócoro promovem a formação do complexo do *checkpoint* mitótico (MCC, do inglês *Mitotic Checkpoint Complex*), constituído pelas proteínas BUB3, MAD2, BUBR1 e CDC20 (LARA-GONZALEZ *et al.*, 2012; BASTIANS, 2015; IZAWA; PINES, 2015; MUSACCHIO, 2015; RADONOVA *et al.*, 2019; WILHELM; SAID; NAIN, 2020). O MCC se liga e sequestra a proteína CDC20, uma subunidade ativadora do complexo promotor de anáfase/ciclossomo (APC/C, do inglês *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), impedindo a ativação do APC/C e o início da anáfase (BASTIANS, 2015). Após o correto alinhamento dos cromossomos na placa equatorial, o MCC é desagregado e o SAC é silenciado, a CDC20 fica livre para ativar o APC/C, que marca a securina e a ciclina B para serem degradadas pelo proteossoma (IZAWA; PINES, 2015). A degradação da ciclina B libera a CDK1 que fica inativa, possibilitando a célula sair da mitose (LARA-GONZALEZ *et al.*, 2012; IZAWA; PINES, 2015; MUSACCHIO, 2015).

O SAC pode ocorrer também quando células com DNA danificado entram em mitose (NITTA *et al.*, 2004). Segundo Holland e Cleveland (2009), a inativação do SAC pode acarretar uma má segregação dos cromossomos e aneuploidia.

### **2.6.1 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR APÓS A INCORPORAÇÃO DE 5-BROMO-2'-DEOXIURIDINA (BrdU), (TROCAS ENTRE CROMÁTIDES IRMÃS - TCI)**

Durante a fase S do ciclo celular o DNA é replicado de maneira semiconservativa, e cada cromossomo se duplica em duas cromátides irmãs, as quais são unidas firmemente ao centrômero. As cromátides irmãs são visualizadas durante a mitose no final da prófase e no início da metáfase, antes da segregação, originando células filhas (WILSON; THOMPSON, 2007).

A incorporação de análogos de bases durante a proliferação celular permite diferenciar o número de divisões celulares *in vitro* pelo padrão de incorporação durante a replicação semiconservativa do DNA (WILSON; THOMPSON, 2007).

A caracterização das divisões celulares *in vitro* é realizada através do padrão de marcação das cromátides, que se apresentam pálidas após a substituição pela BrdU nas duas fitas, assim as células em primeira divisão apresentam ambas as cromátides escuras, as células em segunda divisão apresentam uma cromátide clara e outra escura, e as células em terceira divisão apresentam  $\frac{3}{4}$  das cromátides claras (GERMAN; ALHADEFF, 2001).

Esta marcação diferencial das cromátides mostra a ocorrência de trocas entre cromátides irmãs (TCI). As TCI são trocas recíprocas que ocorrem naturalmente como eventos associados à replicação normal do DNA, onde as cromátides irmãs sofrem quebras com subsequente reunião e troca recíproca dos segmentos homólogos. Geralmente, esse processo é considerado conservativo e livre de erros, uma vez que nenhuma informação é alterada pela recombinação homóloga, apenas troca de posição (WILSON; THOMPSON, 2007).

As TCI são facilmente observadas ao microscópio óptico em células tratadas com 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). A Figura 2 mostra a incorporação de BrdU.

Durante o segundo ciclo de crescimento em meio de cultura contendo BrdU, as duas cromátides irmãs se diferenciam sendo que uma cromátide contém a fita do DNA original e outra com incorporação da BrdU; e a outra cromátide, as duas fitas contém incorporação de BrdU (WILSON; THOMPSON, 2007; PAYNE; HICKSON, 2009; DAFA *et al.*, 2015). A análise cromossômica utilizando o BrdU pode ser em qualquer tipo de célula cultivada, contudo, a cultura de linfócitos é a mais utilizada (DAFA *et al.*, 2015).

Em indivíduos normais, as TCI ocorrem em baixa frequência observando-se 3 a 4 trocas por célula, entretanto em algumas condições onde há defeito no processo de reparo de DNA, como na síndrome de Bloom (SB), há um aumento espontâneo desse fenômeno, podendo ocorrer mais de 50 a 100 trocas por célula (WILSON; THOMPSON, 2007; PAYNE; HICKSON, 2009).

Teoricamente, a indução das TCI pode ser influenciada pelos processos de remoção ou modificação das lesões do DNA antes das células começarem sua replicação (TICE; HOLLAENDER, 1984).

As TCI são muito utilizadas como biomarcadores para a instabilidade cromossômica espontânea (SALAWU *et al.*, 2018) . Alguns estudos relataram que a TCI é um método muito sensível capaz de detectar mutagênicos, carcinogênicos e a instabilidade cromossômica (BUTLER, 1981; WILSON; THOMPSON, 2007; PAYNE; HICKSON, 2009; DAFA *et al.*, 2015).

Nos pacientes com mosaicismos cromossômicos, esta metodologia pode ser utilizada para comparar a duração do ciclo celular das células com diferentes constituições cromossômicas e as diferenças na instabilidade cromossômica. A avaliação das TCI em indivíduos com mosaicismos cromossômicos permite avaliar a contribuição de cromossomos específicos para este fenômeno, pois essas células se encontram sob influência dos mesmos fatores endógenos e exógenos (RIBEIRO e MELARAGNO, 1987).

Melaragno *et al.* (1988) avaliaram a frequência de TCI nas linhagens de um paciente com retinoblastoma e mosaicismos, com uma linhagem normal e outra com deleção do cromossomo 13 e não verificaram diferenças na frequência de TCI espontânea entre a linhagem com deleção do cromossomo 13 e a linhagem normal ( $p > 0.05$ ). Além disso, a exposição das células à mitomicina C (MMC) produziu aumento na frequência de TCI tanto na linhagem normal como na com deleção do cromossomo 13 ( $p < 0.01$ ), esse aumento foi similar em ambas as linhagens ( $p > 0.05$ ).

Em 2001, Bortolai e Melaragno realizaram um estudo de TCI em cinco pacientes com mosaicismos cromossômicos com diferentes aneuploidias (dois com o cariótipo 46,XY/47,XY,+21, um com o cariótipo 46,XX/47,XX,+21, um com o cariótipo 45,X/46,XX e um com o cariótipo 46,XY/47,XXY). Não houve diferenças no percentual das células de cada linhagem em culturas de 48, 72 e 96 horas de duração, nem diferenças na proliferação entre as células com aneuploidia e as células com complemento cromossômico normal do mesmo indivíduo.

## 2.7. INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

A instabilidade cromossômica (IC), do inglês, *chromosomal instability*, CIN) é definida pelo aumento da taxa de alterações cromossômicas (WILHELM; SAID; NAIM, 2020). As células cancerosas, usualmente, apresentam dois tipos de CIN. A

CNI numérica (n-CIN – do inglês, *numerical chromosome instability*) que envolve ganho ou perda de cromossomos inteiros e a estrutural (s-CIN – do inglês, *structural chromosome instability*) que se refere ao aumento na taxa de cromossomos estruturalmente anômalos (THOMPSON; BAKHOUM; COMPTON, 2010; WILHELM; SAID; NAIM, 2020).

Um estudo relatou que o estresse replicativo é a principal causa das CIN. O termo estresse replicativo é referido a qualquer condição que envolva retardo ou impedimento na progressão da forquilha de replicação ou comprometimento da dinâmica de replicação durante a fase S do ciclo celular. O estresse replicativo pode ocorrer por vários fatores exógenos ou endógenos, incluindo lesões no DNA ou em resposta a adutos de DNA decorrentes de compostos químicos; radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante e agentes oxidantes (SINAI; KEREN, 2018). Outro causador potencial do estresse replicativo é a associação de fatores genéticos e epigenéticos em determinados *loci*, tais como telômeros, centrômeros, em *loci* de DNA ribossômico (rDNA) ou a sítios frágeis, os quais são intrinsecamente difíceis de replicar devido à presença de sequências repetidas que podem formar estruturas secundárias (SINAI; KEREN, 2018; WILHELM; SAID; NAIM, 2020). O estresse replicativo pode provocar instabilidade cromossômica nos estágios iniciais das neoplasias (THOMPSON; BAKHOUM; COMPTON, 2010), como também erros mitóticos que podem resultar em má segregação cromossômica acarretando a n-CIN e a aneuploidia (WILHELM; SAID; NAIM, 2020).

A associação da CIN com a tumorigênese é bem estabelecida, principalmente envolvendo tumores, já que 90% tumores sólidos e 75% dos hematopoiéticos são aneuplóides (GEILG *et al.*, 2008; THOMPSON; BAKHOUM; COMPTON, 2010; PARIENTE, 2012; NEWMAN; THURGOOD; GREGORY, 2019).

Instabilidade cromossômica que leva à aneuploidia é uma característica presente tanto no implante embrionário como na invasividade tumoral. Experimentos realizados em embriões sugeriram que a aneuploidia pode ser, paradoxalmente, um indicativo de melhoria no potencial de implantação, uma teoria apoiada devido às altas taxas de nativivos, mesmo após transferências de embriões com algum DNA aneuplóide (GLEICHER *et al.*, 2022).

O processo de aneuploidia ocorre devido a erros na segregação cromossômica durante a divisão celular (TAYLOR *et al.*, 2014). Estudos prévios

sobre a etiologia das aneuploidias observaram que ela pode ocorrer por dois mecanismos principais: pela segregação precoce das cromátides irmãs durante a divisão celular e pela segregação conjunta de um cromossomo em uma única cromátide de seu homólogo durante a meiose I (TAYLOR *et al.*, 2014; RODANOVA; SVOBODOVA; ANGER, 2019). Outros mecanismos, eventualmente observados em embriões, que também podem gerar aneuploidia são: a divisão prematura de cromossomos não replicáveis; falhas durante a citocinese, que podem resultar em tetraploidias; fusão celular; endoreduplicação e quebras cromossômicas (RODANOVA; SVOBODOVA; ANGER, 2019).

Admite-se que a aneuploidia comprometa o *fitness* celular, repercutindo na taxa proliferativa da célula (SHELTZER; AMON, 2011). Experimentos sobre aneuploidia e divisão celular realizados em fibroblastos de indivíduos com síndrome de Down (SD), demonstraram que as células aneuplóides apresentaram uma desvantagem proliferativa em relação as células de controle euplóides (SHELTZER; AMON, 2011; TAYLOR *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2018; RODANOVA; SVOBODOVA; ANGER, 2019).

Estudos prévios que investigaram as consequências das aneuploidias decorrentes da supressão genética do ponto de controle da montagem do fuso (SAC) verificaram que as células com o SAC comprometido apresentaram CIN e um cariótipo que varia continuamente (SHELTZER; AMON, 2011). Falhas na replicação, tais como diminuição ou parada na forquilha de replicação contribui para que ocorra o estresse replicativo associado à aneuploidia (ZHU *et al.*, 2018). Alguns estudos sugeriram que a aneuploidia pode causar falhas no tempo normal de replicação celular (ZHU *et al.*, 2018). Parece existir uma diferença no tempo de replicação das células tumorais aneuplóides em relação às células normais. No entanto, ainda há necessidade de análises mais precisas das diferenças do tempo de replicação entre as células euplóides e aneuplóides isogênicas para uma melhor compreensão desse mecanismo. Nas células de mamíferos, o efeito da aneuploidia sobre a fidelidade mitótica ainda não está totalmente esclarecido (ZHU *et al.*, 2018).

De acordo com, Geilg *et al.*, (2008) a aneuploidia em si, não é sinônimo de instabilidade cromossômica. No entanto, ela pode gerar instabilidade cromossômica tanto em células tumorais como nas não tumorais (GEILG *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2014; SANSREGRET; VANHAESEBROECK; SWANTON, 2018). Desse modo,

diversas trissomias e tetrassomias acarretam má segregação cromossômica nas linhagens celulares oriundas ou não de células neoplásicas (SCHUKKEN; FOIJER, 2017).

A aneuploidia de um único cromossomo pode desencadear o retardo no crescimento fetal e anormalidades cerebrais, conforme foi observado em diferentes síndromes, inclusive na ST (ZHU *et al.*, 2018; NEWMAN; THURGOOD; GREGORY, 2019; RODANOVA; SVOBODOVA; ANGER, 2019).

Um estudo prévio sugeriu que a presença de aneuploidia não contribui necessariamente para um aumento na taxa de CIN, pois a presença da aneuploidia nem sempre é uma representação precisa do nível de CIN, tampouco de uma maior incidência de má segregação cromossômica, porém ainda há controvérsias de que a aneuploidia possa induzir, isoladamente, instabilidade cromossômica (SCHUKKEN; FOIJER, 2017).

### 3. JUSTIFICATIVA

A Síndrome de Turner caracteriza-se pela ausência total ou parcial do cromossomo X (SYBERT; McCAULEY, 2004). Citogeneticamente, a síndrome é associada ao cariótipo 45,X observado em 50% a 60% dos casos; as demais apresentam alterações estruturais do cromossomo X ou Y e / ou mosaïcismo cromossômico (OLIVEIRA *et al.*, 2009; BISPO *et al.*, 2014; HOOK ; WARBURTON, 2014).

A hipótese da necessidade do mosaïcismo para a sobrevivência dos fetos com constituição 45,X, já que aproximadamente 99% dos conceptos com constituição universal 54,X são abortados espontaneamente (MARZUKI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2013), é apoiada pelo argumento de que existiria um efeito fetoprotetor produzido por mais um ou mais genes dos cromossomos sexuais X e Y (FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2000). Hook e Warburton (2014) sugeriram que todos os indivíduos 45,X com ST apresentariam mosaïcismo oculto e a perda do cromossomo X seria decorrente de erros mitóticos.

As linhagens celulares com frequência inferior a 10% nas células sanguíneas podem não ser detectadas pela avaliação citogenética tradicional, e a utilização de técnicas moleculares como a FISH e a PCR aumenta substancialmente e detecção das linhagens com baixa frequência (HOOK; WARBURTON, 1983; HELD; KEBER; KAMINSKY, 1992; PREMI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; MARZUKI *et al.*, 2011; HOOK; WARBURTON, 2014). Ademais, uma constituição cromossômica distinta pode estar limitada a alguns tecidos, acentuando assim a possibilidade de detecção de anomalias cromossômicas ou da presença de um segundo cromossomo sexual quando são avaliados tecidos de origens embrionárias diferentes (NAZARENKO, TIMOSHEVSKY e SUKHANOVA, 1999; PREMI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; RASOULI *et al.*, 2019; THUNSTRÖM *et al.*, 2019).

Neste estudo buscamos esclarecer estas questões, através de uma avaliação criteriosa, utilizando células de diferentes tecidos, para detectar a presença de mosaïcismo nas pacientes com monossomia universal e comparar a proporção das células monossômicas nas pacientes com mosaïcismo. A avaliação de células da mucosa oral (origem ectodérmica) e do sedimento urinário (origem endodérmica), sendo que o sedimento urinário reflete mais a constituição a

constituição do sistema geniturinário que a mucosa oral. A análise em outros tecidos de origem embrionária distinta complementa a avaliação, tradicionalmente, realizada em células sanguíneas, que são de origem mesodérmica.

O estudo da dinâmica de proliferação nas pacientes com mosaicismo também possibilita averiguar se existem diferenças celulares intrínsecas nas células com diferentes constituições, como seleção *in vitro* e alteração do ciclo celular, de forma a influenciar a proporção das células com cada constituição. Paralelamente também avaliamos a instabilidade genômica, comparando, as TCIs nas células de cada linhagem celular.

Baseado no exposto acima, este estudo se justifica, pois pretende contribuir para a compreensão dos fenômenos celulares associados à etiologia da ST, possibilitando também aprimorar a abordagem diagnóstica no Laboratório de Genética do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), com repercussão na qualidade da atividade assistencial.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Compreender os processos celulares e cromossômicos associados à fisiopatologia da síndrome de Turner.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **4.2.1. Pacientes com monossomia 45,X**

4.2.1.1 Verificar a presença de mosaïcismo oculto.

#### **4.2.2. Pacientes com mosaïcismo cromossômico**

4.2.2.1 Caracterizar a constituição cromossômica da linhagem celular adicional.

4.2.2.2 Comparar o comportamento em cultura das linhagens quanto à seleção *in vitro*, índice de proliferação e instabilidade cromossômica (TCI).

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. TIPO DE ESTUDO**

Estudo observacional, descritivo e transversal.

### **5.2. LOCAL DE ESTUDO**

Laboratório de Genética do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), contando com o apoio do Serviço de Genética Médica (IPPMG) e de Endocrinologia.

### **5.3. AMOSTRA**

Amostra de conveniência composta por pacientes com ST acompanhadas no Serviço de Genética e Endocrinologia do IPPMG e de Endocrinologia do HUCFF, no período de 1989 até 2022.

A avaliação em núcleos interfásicos proveniente de diferentes tecidos foi realizada em 10 pacientes com cariótipo 45,X (grupo 1) e em 17 pacientes com mosaicismos cromossômico com alteração numérica ou estrutural (grupo 2).

A avaliação da dinâmica de proliferação para verificação da ocorrência de seleção e/ou alteração do ciclo celular e a quantificação das TCI foi realizada em 17 pacientes com mosaicismos cromossômico com alteração numérica ou estrutural.

#### **5.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Pacientes com cariótipo 45,X (grupo 1) e pacientes com mosaicismos cromossômico (grupo 2) que concordaram em participar do estudo ou obtiveram concordância do responsável para participar do estudo (Apêndices 1 e 2).

#### **5.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Associação de outras alterações cromossômicas e/ou gênicas. Uso de medicamentos ou exposição ambiental a fatores tais como, o uso de metotrexato, tabagismo e exposição recente a radiação ionizante, que podem influenciar as características avaliadas.

#### 5.4. DESENHO EXPERIMENTAL

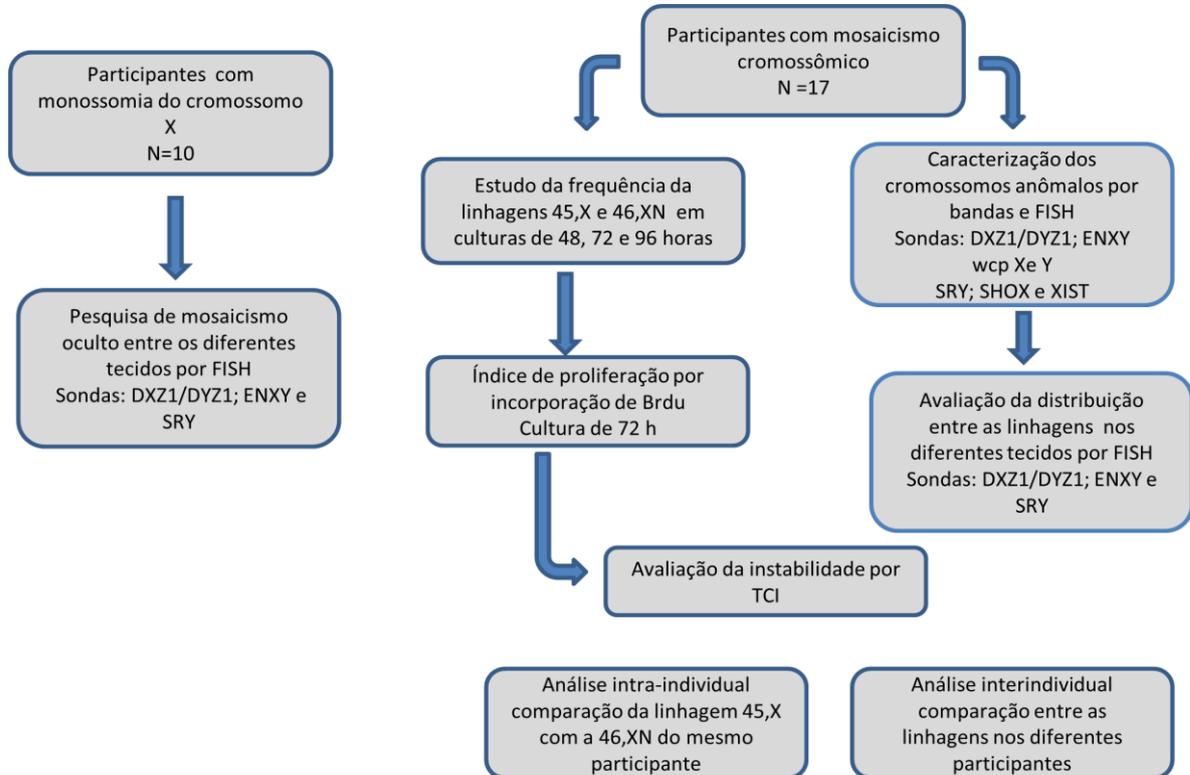
Nas participantes do grupo 1, com monossomia do cromossomo X (45,X), para a averiguação de mosaicismo oculto, foram avaliadas células de diferentes tecidos (mucosa oral, células do sedimento urinário e células sanguíneas).

Nas participantes do grupo 2, com mosaicismo cromossômico, com a presença de cromossomo X normal e anômalo, a frequência de células de cada linhagem foi comparada nos núcleos interfásicos de diferentes tecidos (mucosa oral, células do sedimento urinário, células sanguíneas).

Paralelamente, o estudo do ciclo celular nas células cultivadas nas participantes do grupo 2, com mosaicismo, visou averiguar a ocorrência seleção *in vitro*, e diferenças na proliferação celular das células com diferentes constituições. Adicionalmente, esta metodologia possibilitou o cômputo das TCI, e a comparação da frequência das TCI nas células com constituição diferente pode evidenciar diferenças na estabilidade genômica.

### 5.4.1. DESCRIÇÃO DO ESTUDO

A Figura 2 mostra a descrição do estudo.



**Figura 2:** Fluxograma do estudo mostrando todas as análises que foram realizadas. Nota: N = número de participantes; FISH = hibridação in situ fluorescente; BrdU = 5 bromo-2' deoxiuridina; TCI = troca de cromátides irmãs; 45 ou 46,XN =linhagens.

- a- Pesquisa de mosaicismos ocultos em núcleos interfásicos obtidos de sangue periférico sem cultivo, mucosa oral, sedimento urinário em pacientes com monossomia do cromossomo X.
- b- Avaliação da distribuição das linhagens 45,X e 46,XN em núcleos interfásicos de sangue periférico sem cultivo, mucosa oral, sedimento urinário em pacientes com mosaicismos cromossômicos.

- c- **Avaliação da seleção *in vitro* de células 45,X em culturas de 48, 72 e 96h.**
- d- **Avaliação do ciclo celular após incorporação de BrdU, em culturas de 72 horas, comparando a velocidade de proliferação *in vitro* das linhagens celulares.**
- e- **Avaliação da frequência de TCI em células em segunda divisão *in vitro*, em culturas de 72 horas, comparando as células das linhagens.**

#### **5. 4. 2. ESTUDO CITOGENÉTICO**

A análise foi realizada utilizando microscópio óptico Olympus BX 45. A captura de imagens e a análise cromossômica das imagens foi realizada pelo programa *Applied Spectral Imaging (version 6.0)*. Os resultados foram avaliados de acordo com a nomenclatura proposta pelo *International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2020)*.

#### **5.4.3. CULTURA DE LINFÓCITOS E OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS**

Foi utilizada a técnica modificada de Moorhead *et al.* (1960), para realização de cultura temporária de linfócitos e obtenção de metáfases para avaliação cromossômica.

As amostras de sangue periférico foram obtidas a partir da punção venosa de em tubos vacuntein® com heparina.

Para o preparo das culturas, em capela de fluxo laminar, foram adicionados: 4 ml de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO), 1 ml de soro fetal bovino (GIBCO®), 0,1 ml de fito-hemaglutinina (CULTILAB) e 500 µl de sangue total. Os frascos de cultura foram incubados em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48, 72 e 96 horas.

Decorrido esse período de cultivo, adicionou-se a cada frasco de cultura, 50 µl de MAS (Mitotic Arrest Solution- Genial Genetics). As culturas foram novamente incubadas a 37°C por mais uma hora.

Ao término da incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e adicionados 5 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M) a 37°C e incubado em estufa a 37°C por 15 minutos.

Após a hipotonização, foi adicionado 0,5 ml de fixador Carnoy (Metanol + Ácido acético glacial 3:1) recém-preparado, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. A seguir, foi retirado o sobrenadante e adicionados 5 ml de fixador; o sedimento foi ressuspenso delicadamente para evitar a formação de grumos e centrifugado por 10 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes.

O material obtido foi gotejado em lâminas de microscopia limpas e secas ao ar.

#### **5.4.4. COLORAÇÃO CONVENCIONAL**

As lâminas foram imersas durante 10 minutos em corante Giemsa 5% diluído em tampão fosfato. Após, foram lavadas com água destilada e secas ao ar, posteriormente analisadas em microscópio óptico com lentes de imersão (100x), discriminando-se as células 45,X das 46,XN. Foi analisado um total de 100 células em cada cultura.

#### **5.4.5. OBTENÇÃO DE BANDAS GTG**

As bandas GTG foram obtidas através do pré-tratamento das lâminas por tripsina (SEABRIHGT, 1971).

As lâminas recém-preparadas foram deixadas em estufa a 37°C por 5 dias. A seguir as lâminas foram imersas em solução de tripsina 0,05% (GIBCO) diluída em tampão Dulbeco durante 15 a 45 segundos. O tratamento proteolítico foi interrompido imergindo as lâminas em tampão fosfato. A seguir as lâminas foram coradas durante 15 minutos em corante Giemsa 5% diluído em tampão fosfato.

#### **5.4.6. CULTURA DE LINFÓCITOS, INCORPORAÇÃO DA 5-BrdU NAS CULTURAS E OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS**

A dinâmica do ciclo celular e a troca das cromátides irmãs foi investigada através da incorporação por BrdU (5 bromo-2' deoxiuridina) (Sigma) durante o

cultivo celular. Foram adicionadas às culturas 50g/ml da BrdU em culturas com duração de 72 horas.

Decorrido esse período foi acrescentado a cada tubo de cultura 50 µl de MAS (Mitotic Arrest Solution - Genial Genetics). As culturas foram novamente incubadas a 37°C por mais uma hora.

Ao término da incubação, as culturas foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 5 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M) a 37°C e foi incubado no banho-maria a 37°C por 15 minutos.

Após a hipotonização as culturas foram fixadas com fixador Carnoy (Metanol + Ácido acético glacial 3:1). O fixador foi trocado três vezes até o sobrenadante ficar límpido e observar-se um botão de células brancas no fundo do tubo. Esta suspensão celular diluída no fixador Carnoy foi armazenada a -20°C.

#### 5.4.7. COLORAÇÃO DIFERENCIAL DAS CROMÁTIDES IRMÃS

A coloração diferencial após incorporação de BrdU foi obtida pelas técnicas modificadas de Perry e Wolf (1974) e Korenberg e Freedlender (1974), as lâminas foram recobertas com um filme de corante Hoechst 33258 (SIGMA®) na concentração de 5g/ml e expostas à luz ultravioleta germicida (254nm) a uma distância de 10 cm, por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante 10 minutos em banho-maria a 87-89° C em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1M pH 8,0-8,3. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com Giemsa a 5% durante 8 minutos (RIBEIRO e MELARAGNO, 1987).

Essa metodologia possibilita determinar o número de divisões *in vitro* e a frequência de cada linhagem em 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> divisão *in vitro*, após incorporação de BrdU em culturas de 72 horas. A análise foi feita em microscópio óptico com lente de imersão (100x), sendo avaliadas 50 células em cada amostra. Para a o cálculo do índice de proliferação (IP) foi utilizada a seguinte fórmula abaixo (PAWAR; NAIK; KUMARI, 2014):

**IP= 1x(nº células em 1ª divisão) +2x(nº células em 2ª divisão) + 3x (nº células em 3ª divisão)/ número total de células.**

Nas células em segunda divisão “*in vitro*” foi realizado o cômputo das TCI foram avaliadas 20 células de cada constituição. Foram consideradas as descontinuidades de coloração nas cromátides, excluíram-se as descontinuidades na região centromérica, pois poderiam refletir torções do cromossomo.

#### **5.4.8. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO URINÁRIO PARA FISH**

O sedimento urinário foi coletado em um recipiente apropriado. A amostra foi transferida para um tubo Falcon de 15 ml e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspenso em 10 ml de solução salina 0,9% e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes.

Após, a amostra foi ressuspendida em 10ml de solução salina 0,9% e adicionado 100µl de antibiótico/antimicótico (GIBCO - New York/USA) e incubadas *overnight* em temperatura ambiente.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm e ressuspendida com 5ml de solução salina 0,9% novamente centrifugada. Esse procedimento foi repetido uma vez. A seguir, foi retirado o sobrenadante e adicionados 5ml do fixador Carnoy (Metanol + Ácido acético glacial 3:1); o sedimento foi ressuspendido e centrifugado por 5 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes.

#### **5.4.9. PROCESSAMENTO DE AMOSTRA DE MUCOSA ORAL PARA FISH**

O processamento das amostras de mucosa oral foi realizado conforme a técnica modificada de Liehr (2017).

Antes da coleta da amostra, foi realizada assepsia bucal para diminuir a possibilidade de contaminação por bactérias.

Após, foram coletados aproximadamente 2ml de amostra de saliva em tubos Falcon estéreis de 15ml.

A amostra foi ressuspensa em 10 ml de solução salina 0,9% e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 3ml de tripsina/EDTA (CULTILAB- Campinas/Brasil).

A amostra foi ressuspensa e incubada durante 15 minutos a 37°C em banho maria. Ao final deste tempo foram adicionados 5ml de solução salina 0,9% ao tubo e a amostra foi novamente centrifugada. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

Após, o material foi ressuspensa em 10ml de soro fisiológico e adicionado 100µl de antibiótico/antimicótico (GIBCO - New York/USA) e incubados *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido uma vez.

Em seguida, foram adicionados 5ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M); a amostra foi incubada por 15 minutos a 37°C, no banho-maria. Após, foram adicionados lentamente 2 ml de fixador Carnoy a 4°C, e os tubos foram novamente centrifugados.

A seguir, foi retirado o sobrenadante e adicionados 3 ml de fixador Carnoy (Metanol + Ácido acético glacial 3:1) a 4°C. A amostra foi armazenada a -20°C.

#### **5.4.10. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO SEM CULTIVO PARA FISH**

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa em tubos com heparina. Após, as amostras foram transferidas para o tubo Falcon e centrifugadas durante 10 minutos a 1500rpm, a seguir o *buffy-coat* foi removido e colocado em

frasco contendo 5 ml de solução salina 0,9% e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos.

A seguir, o sobrenadante foi retirado, adicionando novamente a solução salina 0,9% com 0,5 ml de fixador Carnoy (Metanol + Ácido acético glacial 3:1). O sedimento foi ressuspendido e centrifugado por 5 minutos. Foram realizadas sucessivas lavagens com o fixador Carnoy até a amostra ficar límpida. A amostra foi armazenada à - 20°C.

#### **5.4.11. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)**

A análise citogenética molecular foi realizada utilizando a técnica de FISH.

As amostras celulares processadas foram gotejadas em lâminas de microscopia silanizadas e secas ao ar. A seguir as lâminas foram imersas em 2xSSC durante 2 minutos, e desidratadas imergindo em série de etanol, 70%, 90% e 100%, por 2 minutos cada; a seguir colocadas na placa aquecida a 65 °C por 15 minutos.

Nas lâminas secas foi colocado 4 µl da solução de hibridação contendo a sonda sobre a amostra, recoberta com lamínula 18x18mm e selada com cola de látex. As lâminas foram colocadas no hibridizador (Thermobrite - Statspin) para a condensação, realizada durante 5 minutos na temperatura de 72°C para as sondas (DXZ1/DYZ1/DYZ3) ou 6 minutos na temperatura 75°C para as sondas (ENXY e DXZ1/SRY). As lâminas foram mantidas a 37°C *overnight* para hibridação.

Após a hibridação as lâminas foram lavadas por três vezes em solução de lavagem (ZYTIVISION) a 37°C e novamente desidratadas em série de etanol, 70%, 90% e 100%, por 2 minutos cada. A contra coloração foi realizada com 5µl de solução DAPI/ *antifade* na concentração de 0,125µg/ml (CYTOCELL). As lâminas foram cobertas com lamínula 22x22mm, vedadas e visualizadas em microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

Já para análise de distribuição das células com sSMC nos diferentes tecidos, foi utilizada sonda informativa para o sSMC, e 100 núcleos interfásicos de cada tecido foram avaliados.

Para a caracterização quanto à origem dos cromossomos anômalos, foram avaliadas 10 metáfases de boa qualidade contendo o cromossomo anômalo, sendo utilizadas sondas de enumeração para os cromossomos X e Y - CEP X (DXZ1) /

CEP Y (DYZ1) (VYSIS/ABBOTT ou ZYTOVISION). Os cromossomos anômalos que apresentaram hibridação com o cromossomo X, também foram avaliados com a sonda LSI-*XIST* (VYSIS/ABBOTT ou CYTOCELL) e LSI-*SHOX* (CYTOCELL). Os cromossomos anômalos que apresentaram hibridação com o cromossomo Y foram avaliados com as sondas de pintura cromossômica *wcpX* e *wcpY* (CYTOCELL), DYZ3 (ZYTOVISION), sonda locus específica LSI-*SHOX* (CYTOCELL) e sonda locus específica LSI-*SRY* (VYSIS/ABBOTT). Para análise de distribuição das células com as linhagens 45,X e 46,XN nos diferentes tecidos, foram utilizadas sondas informativas para as regiões dos cromossomos X e Y (Tabela 1).

Na análise dos diferentes tecidos foram utilizadas lâminas codificadas por dois ou mais observadores separadamente, sendo avaliadas no mínimo 200 células de cada tecido (MASCARELLO *et al.*, 2011).

As imagens foram capturadas através do sistema de análise *Applied Spectral Imaging* (versão 6.0). Os achados foram descritos utilizando-se a nomenclatura proposta pelo ISCN (2020).

Tabela 1: Sondas utilizadas para FISH indicando as regiões e coordenadas cromossômicas.

Sonda	Região cromossômica	Coordenada genômica (GRCh38)
<b>DXZ1</b>	<b>Xp11</b>	<b>região centromérica</b>
DYZ1	Yp12	região centromérica
DYZ3	Yp11	região centromérica
ENXY	Xq11.1 Yq1.221	região peri-centromérica
<i>XIST</i>	Xq13.2	X:73,820,650-73,852,752
<i>SRY</i>	Yp11.2	Y:2,786,854-2,787,740
<i>SHOX</i>	Xp22.33	X:624,343-659,410
<i>wcp</i>		pintura cromossômica

## 5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística do índice de proliferação (IP) e das TCI foi realizada através dos programas Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e Stata (StataCorp, College Station, TX, EUA). Foram consideradas significativas as diferenças com *p* valor menor que 0.05 ( $p < 0.05$ ).

Foram realizadas análises intra-individuais e análises interindividuais para cada parâmetro avaliado. A análise intra-individual foi realizada comparando-se a linhagem 45,X e a 46,XN no mesmo indivíduo, enquanto que a análise interindividual

foi realizada comparando-se as linhagens 45,X e 46,XN de um conjunto de indivíduos diferentes.

Para as análises intra-individuais das frequências de TCI das linhagens 45,X e 46,XN foi utilizado teste *t* não-pareado de duas caudas; enquanto para o IP, foi utilizado o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher. Para as análises interindividuais das frequências de TCI foi utilizada ANOVA unidirecional com o teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunnett. Para as análises interindividuais do IP, foi utilizado o teste *t* pareado de duas caudas.

O coeficiente de correlação de Pearson (*r*) e a regressão linear foram utilizados para medir a associação das frequências de IP e TCI das linhagens 45,X e 46,XN.

Para comparar as frequências das linhagens 45,X e 46,XN após diferentes tempos de cultivo numa mesma paciente (análise intra-individual) foram utilizados o teste de  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher.

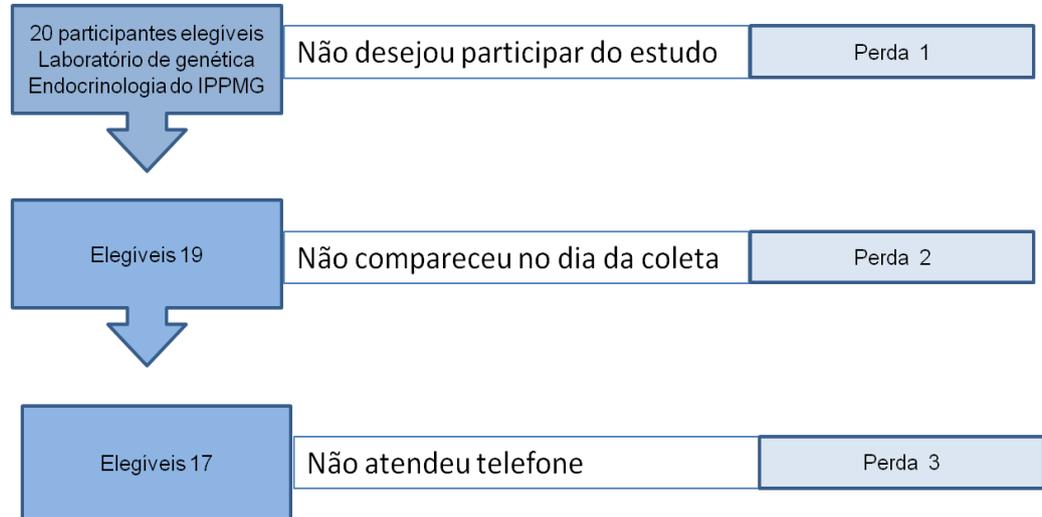
Os testes de comparações múltiplas de Tukey e Šídák foram aplicados para comparar as frequências das linhagens 45,X e 46,XN após diferentes tempos de cultivo, intra-linhagens e inter-linhagens, respectivamente.

## 5.6. QUESTÕES ÉTICAS

O projeto que deu origem a este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), sob número 2.768.383 em 12 de julho de 2018 (Anexo 1).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. GRUPO AMOSTRAL



**Figura 3:** Fluxograma para a constituição da amostra

As participantes foram selecionadas a partir dos registros do laboratório de Genética do IPPMG e do Serviço de Endocrinologia, ao longo de mais de 30 anos de assistência. Inicialmente seriam vinte participantes com mosaicismos cromossômicos, entretanto ocorreram perdas de algumas participantes, as quais estão descritas na Figura 3.

Neste estudo, foram avaliados dois grupos de participantes com ST: o grupo 1 de 10 participantes com monossomia do cromossomo X (Quadro 1) e o grupo 2 de 17 participantes com mosaicismos cromossômicos (Quadro 2).

A idade das participantes, no momento da obtenção da amostra, variou de 4 a 17 no grupo 1 e no grupo 2 variou de 1,7 a 42 anos (Quadros 1 e 2).

**Quadro 1:** Participantes do grupo 1, com monossomia do cromossomo X. incluídos no estudo.

<b>Participantes</b>	<b>Cariótipo por banda G</b>	<b>Idade no momento da obtenção da amostra (em anos)</b>
1Mono	45,X	10
2Mono	45,X	10
3Mono	45,X	8
4Mono	45,X	14
5Mono	45,X	17
6Mono	45,X	4
7Mono	45,X	11
8Mono	45,X	17
9Mono	45,X	15
10Mono	45,X	9

Nota: Mono= monossomia do cromossomo X

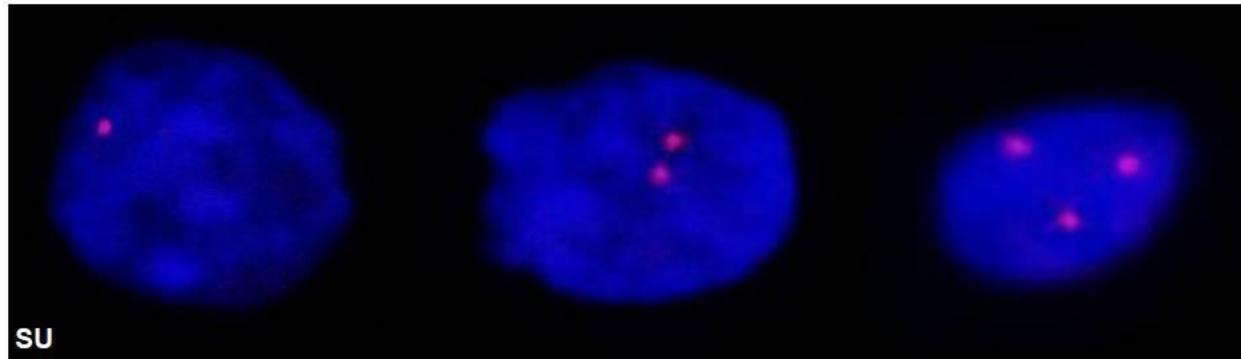
**Quadro 2:** Constituição cromossômica do grupo 2, participantes com mosaïcismo cromossômico incluídos no estudo.

Participantes	Cariótipo por banda G	Idade no momento da obtenção da amostra (em anos)
1Mos	45,X[54]/46,XX[46]	27
2Mos	45,X[58]/46,XX[42]	30
3Mos	45,X [76]/46,X + r (X)[24]	16
4Mos	45,X [52]/46,X+mar (Y)[48]	11
5Mos	45,X[58]/46,X+mar(X)[42]	19
6Mos	45,X[49]/46,X+mar(X)[51]	11
7Mos	45,X[94]/46,X+mar(X)[6]	1,7
8Mos	45,X[42]/46,X+mar(X)[58]	12
9Mos	45,X[47]/46,XY[53]	31
10Mos	45,X[42]/46,X+mar(X)[58]	15
11Mos	45,X[51]/46,X+mar(X)[49]	5
12Mos	45,X[61]/46,X+mar(X)[39]	17
13Mos	45,X[82]/46,X+mar(X)[18]	22
14Mos	45,X[45]/46,X+mar(Y)[55]	23
15Mos	45,X[57]/46,XX[43]	42
16Mos	45,X[53]/46,X+mar(X)[47]	19
17Mos	45, X [19]/46,X,i(Yp)[ 81]	14

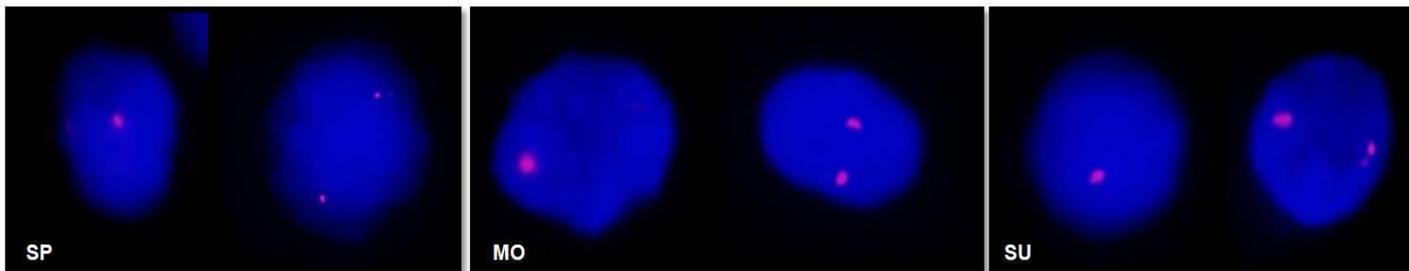
Nota: Mos = mosaïcismo cromossômico; r = cromossomo em anel; mar = cromossomo marcador ; i = isocromossomo e p=braço curto O número entre colchetes representa o número de células analisadas.

## 6.2. AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES EM DIFERENTES TECIDOS PELA TÉCNICA DE FISH

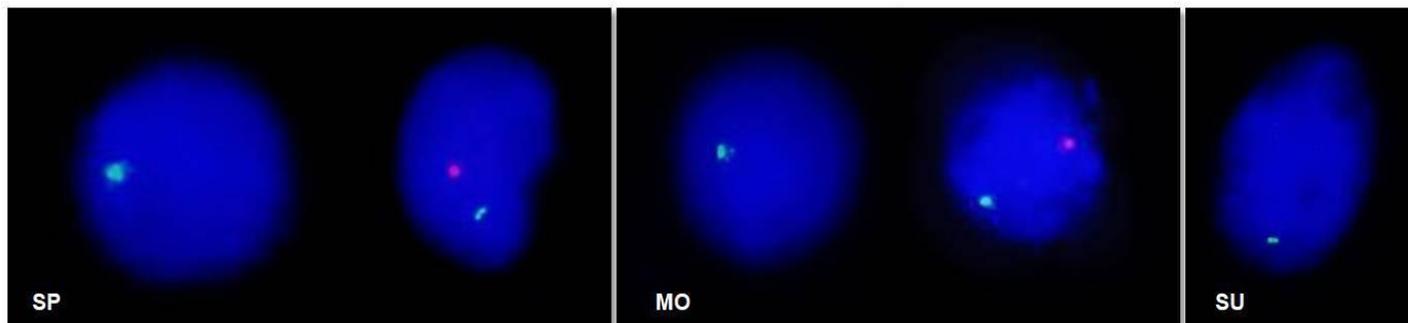
Foram analisadas pela FISH células interfásicas de sangue periférico sem cultivo (SP), mucosa oral (MO) e sedimento urinário (SU). Esta abordagem foi realizada tanto nas pacientes com mosaïcismo cromossômico como nas pacientes com monossomia do cromossomo X (45,X). As microfotografias representativas da análise pela técnica de FISH das células interfásicas de sangue periférico sem cultivo (SP), mucosa oral (MO) e sedimento urinário (SU) podem ser observadas nas Figuras 4, 5 e 6.



**Figura 4:** Microfotografias de núcleos interfásicos da amostra de SU da participante 10Mono hibridados com a sonda DXZ1(vermelha) mostrando células com 1, 2 e 3 sinais.



**Figura 5:** Microfotografias de núcleos interfásicos da amostra de SP, MO e SU da participante 3Mos hibridados com a sonda DXZ1 (vermelha) mostrando células com 1 e 2 sinais



**Figura 6:** Microfotografias de núcleos interfásicos das amostras de SP, MO e SU da participante 9Mos hibridados com as sondas DXZ1 (verde) e SRY (vermelha) mostrando células com constituição 45,X e com constituição 46,XY.

### 6.2.1. GRUPO 1-PARTICIPANTES COM MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO X

#### 6.2.2. Pesquisa de mosaicismo oculto no grupo de pacientes com monossomia

Esta abordagem foi realizada integralmente em oito pacientes e parcialmente em dois. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 9.

Em 9/10 participantes avaliadas foi detectada a presença de uma segunda linhagem celular, com um segundo sinal da sonda correspondente ao cromossomo X, em ao menos um dos tecidos analisados.

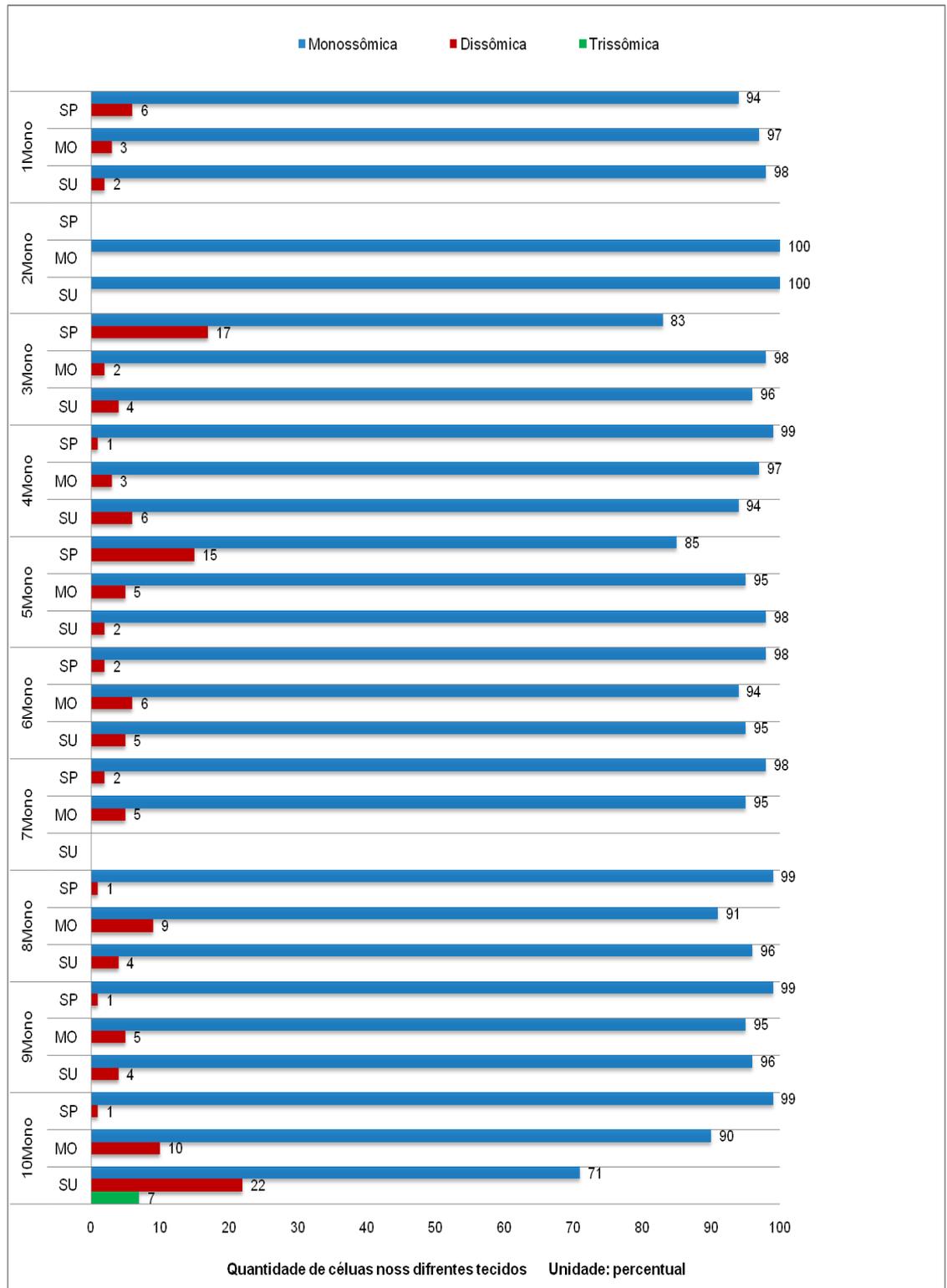
No grupo de participantes em que a abordagem foi integral, a frequência verificada da segunda linhagem foi:

- Sangue periférico: participante 1Mono com frequência de 6%; 3M com frequência de 17%; e 5Mono frequência de 15%.
- Mucosa oral: 5Mono frequência de 5%; 6Mono com frequência de 6%; 7Mono com frequência de 5%; 8Mono com frequência de 9% e a 9Mono com frequência de 5%.
- Sedimento urinário: 4Mono frequência de 6%; e 10Mono frequência de 22%. A paciente 10Mono apresentou ainda uma terceira linhagem (com 3 sinais) e frequência de 7% no sedimento urinário.

Apenas 2Mono não apresentou uma segunda linhagem celular nos tecidos avaliados.

Duas participantes foram avaliadas parcialmente, 2Mono e 7Mono, e apenas na 2Mono não foi detectada uma segunda linhagem.

Nas demais amostras, as frequências ficaram abaixo ou igual ao valor do *cut-off* ( $\leq 0,05$ ) não caracterizando a presença de uma segunda linhagem (Figura 8) A frequência entre os tecidos das pacientes como monossomia encontram-se no Apêndice 5.



**Figura 7:** Frequência das populações celulares em núcleos interfásicos em células não co-cultivadas de diferentes tecidos. Grupo de pacientes com monossomia do cromossomo X. Foram utilizadas as sondas de enumeração DXZ1/DYZ1 ou ENXY.

**Nota:** SP= sangue periférico; MO = mucosa oral, SU=sedimento urinário (SU) e Mono=monossomia

### 6.3. ESTUDO CONSTITUCIONAL

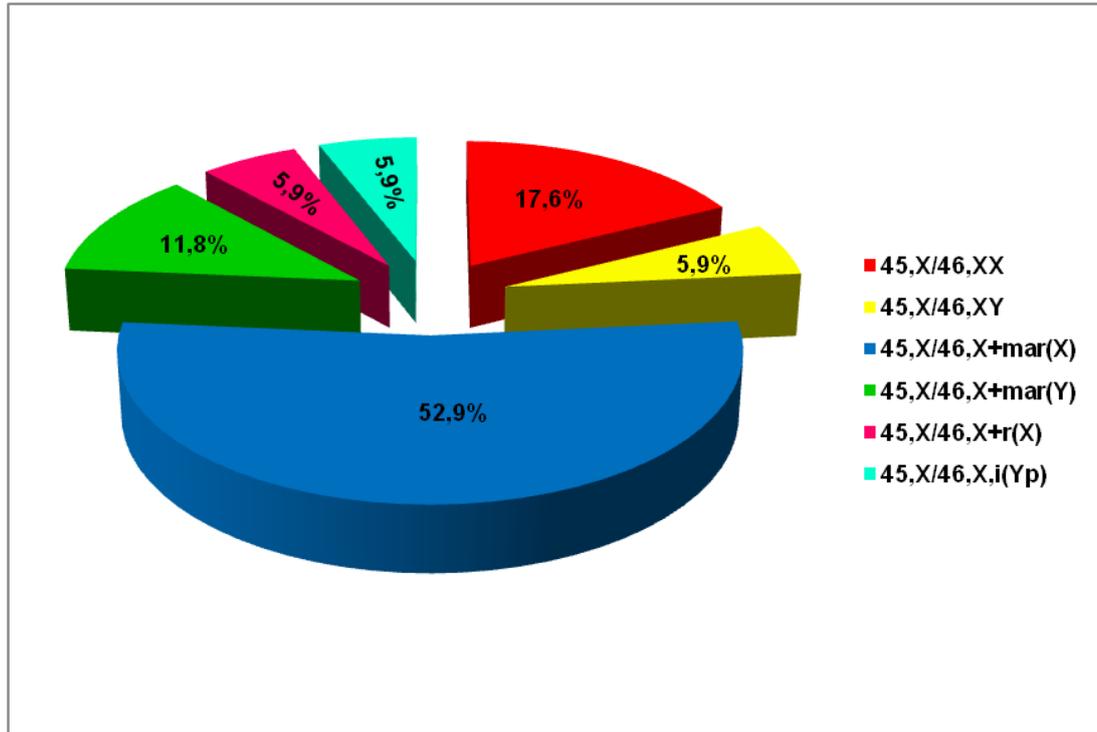
#### 6.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO CROMOSSÔMICA DAS LINHAGENS CELULARES DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO

As participantes com mosaicismos apresentaram uma linhagem com monossomia do cromossomo X (constituição 45,X) e outra linhagem com 46 cromossomos (46,XN). O segundo cromossomo sexual foi originário do cromossomo X em 13 pacientes e originário do cromossomo Y em quatro (Quadro 2).

Em quatro participantes (23,5%), a segunda linhagem apresentou o segundo cromossomo sexual íntegro: três (17,6%) com a constituição 45,X/46,XX e uma (5,9%) com a constituição 45,X/46,XY.

Em 13 participantes (76,5%), o segundo cromossomo sexual foi anômalo. A frequência das linhagens com cromossomo anômalo variou de 6% a 81% pela banda G (Quadro 2).

Em 11 (64,7%) foi observado um cromossomo marcador pequeno supranumerário (sSMC). Em nove pacientes (52,9%), o sSMC foi derivado do cromossomo X; em duas (11,8%), o sSMC foi derivado do cromossomo Y. Em uma (5,9%), estava presente um cromossomo em anel derivado do cromossomo X. O isocromossomo do braço curto do cromossomo Y estava presente em uma (5,9%) (Figura 4).



**Figura 8:** Distribuição do resultado do cariótipo, pelo bandeamento G, das participantes com mosaïcismo cromossômico.

A constituição estrutural e molecular dos sSMC das participantes com mosaïcismo cromossômico foi pormenorizada pela análise citomolecular utilizando-se sondas localizadas em diversas regiões dos cromossomos sexuais. Foram utilizadas as sondas de enumeração DXZ1/DYZ1 ou ENXY; e sondas *locus specific identifier* (LSI) *SHOX*, *SRY* e *XIST* (Quadro 3).

**Quadro 3:** Caracterização citomolecular dos cromossomos anômalos nas participantes do grupo 2

Part	Cariótipo do FISH
03Mos	mos45,X/ 46,X,ish.r(X)(DXZ1+, XIST++)
04Mos	mos45,X/ 46,X, + mar.ish. der (Y) ( <i>SHOX</i> ++, <i>SRY</i> ++, wcpY+)
05Mos	mos45,X/ 46,X,+mar. ish. der(X)(DXZ1+, XIST+)
06Mos	mos45,X/ 46,X,+mar.ish. der (X)(DXZ1+, XIST+)
07Mos	mos45,X/ 46,X,+mar.ish. der(X)(DXZ1+, XIST-)
08Mos	mos45,X/ 46,X,+mar.ish. der(X) (DXZ1+,XIST++)
10Mos	mos45,X/ 46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST+)
11Mos	mos45,X/46,X,+mar.ish. der(X)(DXZ1+, XIST+)
12Mos	mos45,X/ 46,X,+mar.ish. der(X)(DXZ1+, XIST++)
13Mos	mos45,X/ 46,X,+mar.ish. der(X)(DXZ1+, XIST+)
14Mos	mos45,X/46,X+mar. Ish. der(Y)(ENY++)
16Mos	mos45,X/ 46,X,+mar.ish. der(X)(DXZ1+, XIST+)
17Mos	mos45,X/46,X,i(Y)(pter ->p10->pter).ish (ENY+, <i>SRY</i> ++, <i>SHOX</i> ++, <i>DYZ3</i> +) )

**Nota:** Mos=mosaicismo cromossômico; r=cromossomo em anel; mar=cromossomo marcador; der=derivativo e i=isocromossomo.

A origem do cromossomo marcador foi estabelecida pelas sondas de enumeração dos cromossomos X e Y (DXZ1/DYZ1); ENXY, wcp X e wcpY.

Houve hibridação com a sonda DXZ1(Xp11.1-q11.1) em 10 participantes (52,9%) com cromossomo marcador e uma com cromossomo em anel (5,7%) , caracterizando a origem do cromossomo X .

Na participante 4Mos foi realizada a pintura cromossômica, utilizando as sondas wcpX e wcpY e na pacientes 14Mos foi utilizada a sonda ENXY, para caracterizar a origem do cromossomo marcador e o resultado foi que ambas apresentaram sSMCs derivados do cromossomo Y.

Nas participantes com o cromossomo marcador derivado do cromossomo X e na com cromossomo em anel, avaliamos a presença do gene *XIST* (Xq13.2). Foi detectada uma cópia do gene *XIST* em seis participantes com cromossomo marcador (5Mos, 6Mos, 10Mos, 11Mos, 13Mos e 16Mos). Estavam presentes duas cópias de *XIST* em três participantes, a 3Mos com cromossomo em anel e nas 8Mos e 12 Mos com cromossomos marcadores originários do cromossomo X. Em uma participante (7Mos) não foi detectado pela hibridação do gene *XIST* no cromossomo marcador.

Na participante 4Mos o cromossomo marcador apresentou hibridação com a sonda wcpY, mostrando tratar-se de um cromossomo derivado do cromossomo Y. Nessa participante observamos duas cópias dos genes *SRY* e *SHOX*, sugerindo tratar-se de um isocromossomo do braço curto do cromossomo Y.

Na participante 14Mos houve hibridação para a sonda pericentromérica ENXY, sendo observadas duas cópias de ENY, sugerindo tratar-se de um cromossomo marcador dicêntrico derivado do cromossomo Y.

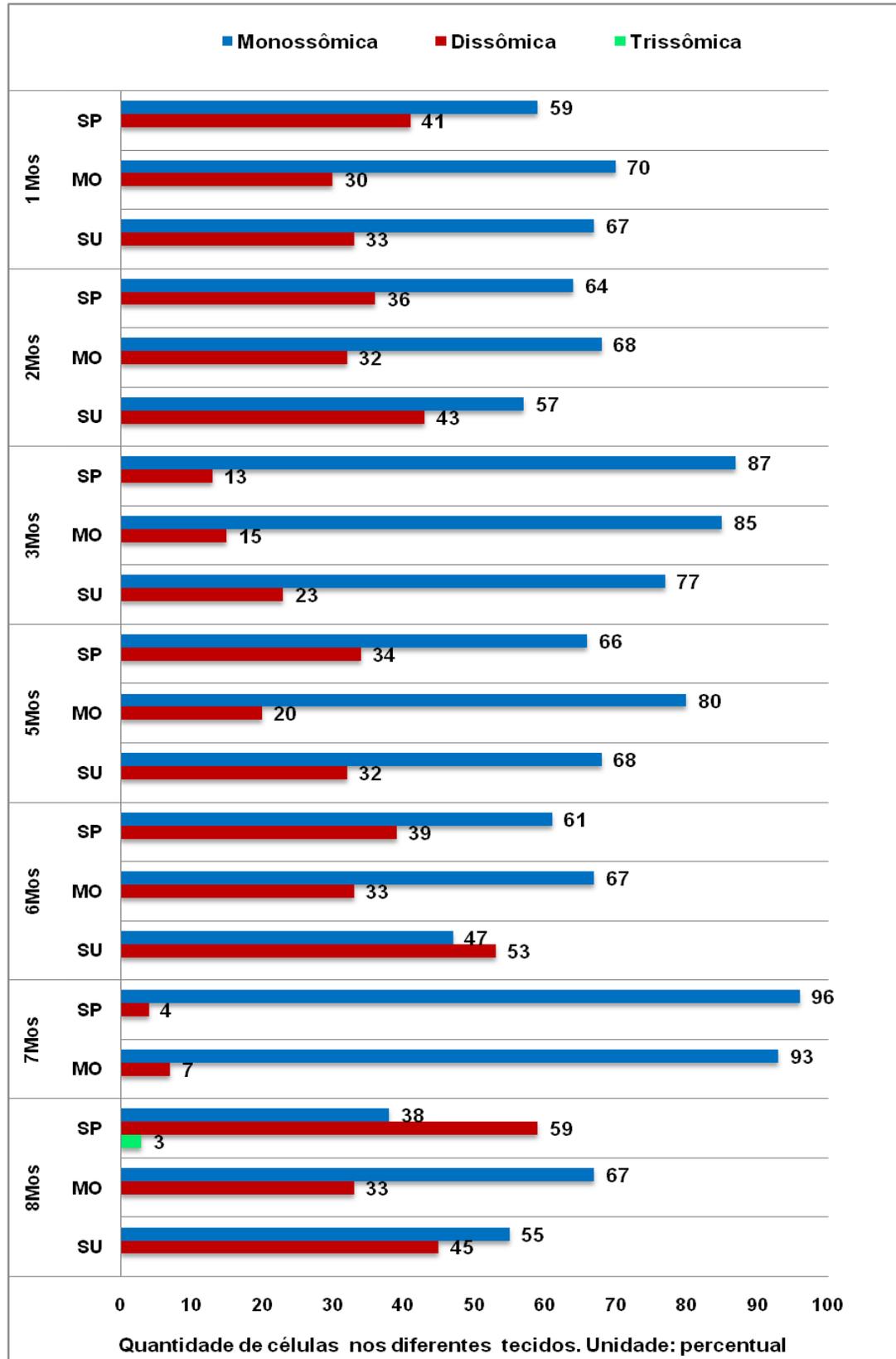
A participante 17Mos apresentou hibridação para sonda ENY, mostrando tratar-se de um isocromossomo do cromossomo Y, observamos uma cópia de ENX e *DYZ3* e duas cópias de *SRY* e *SHOX*, sugerindo tratar-se de um isocromossomo do braço curto do cromossomo Y.

As microfotografias das metáfases parciais das participantes com os cromossomos anômalos analisadas pela FISH encontram-se no Apêndice 4.

#### **6.4. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MONOSSÔMICAS EM DIFERENTES TECIDOS NO GRUPO DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO**

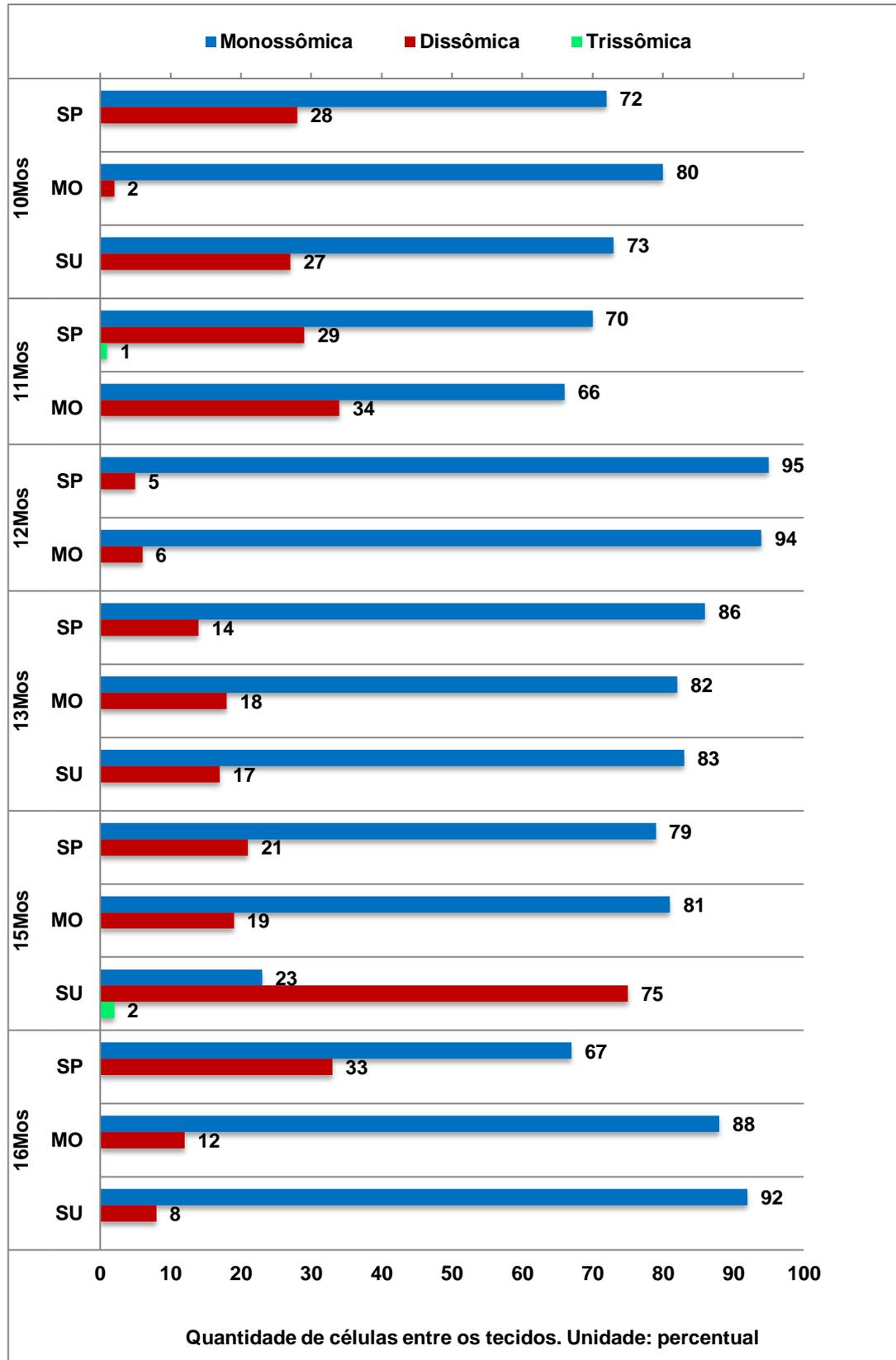
Esta análise foi realizada integralmente em 12 participantes e parcialmente em cinco participantes (Apêndice 6).

Houve variação significativa na proporção de células 45,X e 46,XN entre os diferentes tecidos analisados em 14 dos 16 indivíduos avaliados (Figuras 9a, 9b e 9c).

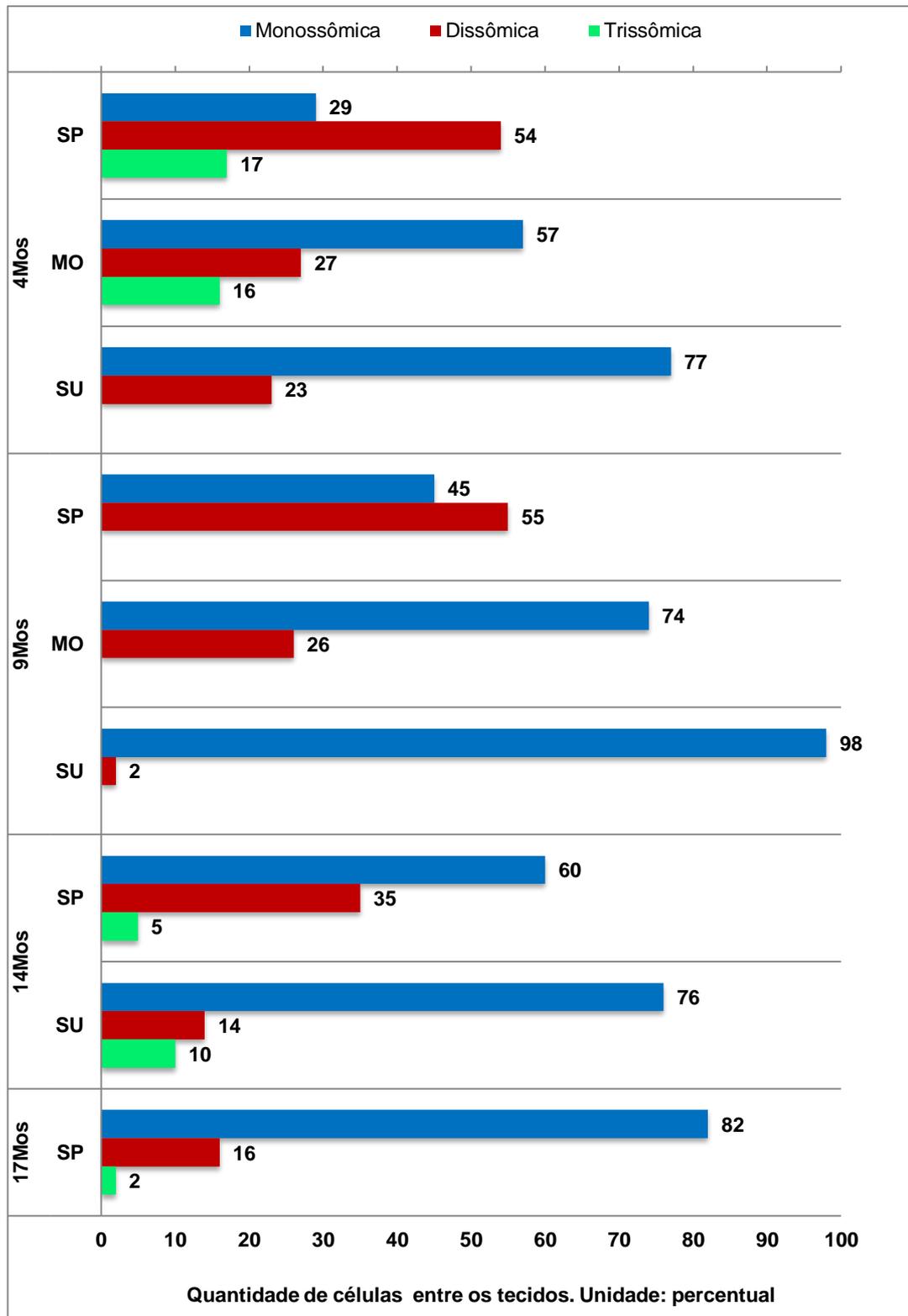


**Figura 9a:** Frequência da linhagem 45,X e 46,XN em núcleos interfásicos em diferentes tecidos das participantes (1Mos a 8Mos) com mosaicismos cromossômicos com o cromossomo íntegro ou anômalo originário do cromossomo X. Sondas de enumeração utilizadas DXZ1/DYZ1, ENXY ou DXZ1/SRY.

**Nota:** SP=sangue periférico; MO= mucosa oral e SU= sedimento urinário. Linhagens: azul-dissômica, vermelho-dissômica e verde-trissômica



**Figura 9b:** Frequência da linhagem 45,X e 46,XN em núcleos interfásicos em diferentes tecidos das participantes (10Mos a 16Mos) com mosaicismos cromossômicos com o cromossomo inteiro ou anômalo originário do cromossomo X. Sondagens de enumeração utilizadas DXZ1/DYZ1, ENXY ou DXZ1/SRY. Nota: SP=sangue periférico; MO= mucosa oral e SU= sedimento urinário. Linhagens: azul-dissômica, vermelhos-dissômica e verde-trissômica



**Figura 9c:** Frequência da linhagem 45,X e 46,XN em núcleos interfásicos em diferentes tecidos das participantes (4Mos a 17Mos) com mosaicismos cromossômicos com o cromossomo íntegro ou anômalo originário do cromossomo X. Sondas de enumeração utilizadas DXZ1/DYZ1, ENXY ou DXZ1/SRY.

**Nota:** SP=sangue periférico; MO= mucosa oral e SU= sedimento urinário. Linhagens: azul-dissômica, vermelha-dissômica e verde-trissômica

A comparação estatística entre a quantidade de células em cada tecido das participantes com mosaïcismo cromossômico encontra-se no Apêndice 7.

Nas 13 participantes com o segundo cromossomo sexual originário do cromossomo X íntegro ou anômalo, em duas (11Mos e 12 Mos) a quantidade de células de cada linhagem entre os tecidos foi similar; nas demais, observamos as seguintes diferenças (Quadro 4 e Quadro 5).

**Quadro 4:** Variação da quantidade de células 45,X entre os tecidos das participantes com mosaïcismo cromossômico e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo X

<b>Linhagem 45,X</b>				
<b>Participantes</b>	6Mos	8Mos	15Mos	16Mos
<b>Tecidos</b>	<b>SPxSU</b>	<b>SPxSU</b>	<b>SPxSU</b>	<b>SPxSU</b>
Variação na quantidade de células entre os tecidos	13,0	-18,3	54,9	-15,7
<b>Tecidos</b>	-	<b>SPxMO</b>	-	<b>SPxMO</b>
Variação na quantidade de células entre os tecidos	-	-27,6	-	-13,5
<b>Tecidos</b>	<b>MOxSU</b>	-	<b>MOxSU</b>	-
Variação na quantidade de células entre os tecidos	17,5	-	55,8	-

**Nota:** Mos = mosaïcismo cromossômico; SP = sangue periférico; MO = mucosa oral  
SU = sedimento urinário

**Quadro 5** : Variação da quantidade de células 46,XN entre os tecidos das pacientes com mosaicismos cromossômico das participantes com mosaicismos cromossômico e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo X

<b>Linhagem 46,XN</b>											
<b>Participantes</b>	<b>1Mos</b>	<b>2Mos</b>	<b>3Mos</b>	<b>5Mos</b>	<b>6Mos</b>	<b>7Mos</b>	<b>8Mos</b>	<b>10Mos</b>	<b>13Mos</b>	<b>15Mos</b>	<b>16Mos</b>
<b>Tecidos</b>	<b>SPxSU</b>	-	-	-	<b>SPxSU</b>	<b>SPxSU</b>	<b>SPxSU</b>	-		<b>SPxSU</b>	<b>SPxSU</b>
<b>Variação na quantidade de células entre os tecidos</b>	10,8	-	-	-	-15,2	-27,3	13,5	-		-56,3	61,0
<b>Tecidos</b>	<b>SPxMO</b>	-	<b>SPxMO</b>	<b>SPxMO</b>	-	-	<b>SPxMO</b>	<b>SPxMO</b>	<b>SPxMO</b>	-	<b>SPxMO</b>
<b>Variação na quantidade de células entre os tecidos</b>	15,5	-	-27,8	25,9	-	-	28,3	16,7	-12,5	-	47,7
<b>Tecidos</b>	-	<b>MOxSU</b>	<b>MOxSU</b>	<b>MOxSU</b>	<b>MOxSU</b>	-	<b>MOxSU</b>	<b>MOxSU</b>	-	<b>MOxSU</b>	<b>MOxSU</b>
<b>Variação na quantidade de células entre os tecidos</b>	-	-14,7	-21,1	-23,1	-23,3	-	-15,4	-14,9	-	-59,6	20,0

**Nota:** Mos=mosaicismo cromossômico; SP = sangue periférico; MO = mucosa oral e SU = sedimento urinário.

Nas participantes com o cromossomo originário do cromossomo Y, íntegro ou anômalo, a análise dos diferentes tecidos evidenciou que houve variações na quantidade de células de cada linhagem em três pacientes (Quadro 6 e Quadro 7)

**Quadro 6:** Variação da quantidade de células 45,X entre os tecidos das participantes com mosaicismos cromossômicos das pacientes com mosaicismos cromossômicos e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo Y

Linhagem 45,X			
Participantes	4Mos	9Mos	14Mos
Tecidos	SPxSU	SPxSU	SPxSU
Variação na quantidade de células entre os tecidos	-45,3	-37,1	-11,8
Tecidos	SPxMO	SPxMO	-
Variação na quantidade de células entre os tecidos	-32,6	-24,4	-
Tecidos	MOxSU	MOxSU	-
Variação na quantidade de células entre os tecidos	-14,9	-14,0	-

**Nota:** Mos = mosaicismos cromossômicos (Mos); SP = sangue periférico; MO = mucosa oral e SU = sedimento urinário.

**Quadro 7:** Variação da quantidade de células 46,XN entre os tecidos das participantes com mosaicismos cromossômicos das pacientes com mosaicismos cromossômicos e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo Y

Linhagem 46,XN			
Participantes	4Mos	9Mos	14Mos
Tecidos	SPxSU	SPxSU	SPxSU
Variação na quantidade de células entre os tecidos	40,3	93,0	42,9
Tecidos	SPxMO	SPxMO	-
Variação na quantidade de células entre os tecidos	35,0	35,8	-
Tecidos	MOxSU	MOxSU	-
Variação na quantidade de células entre os tecidos	-	85,7	-

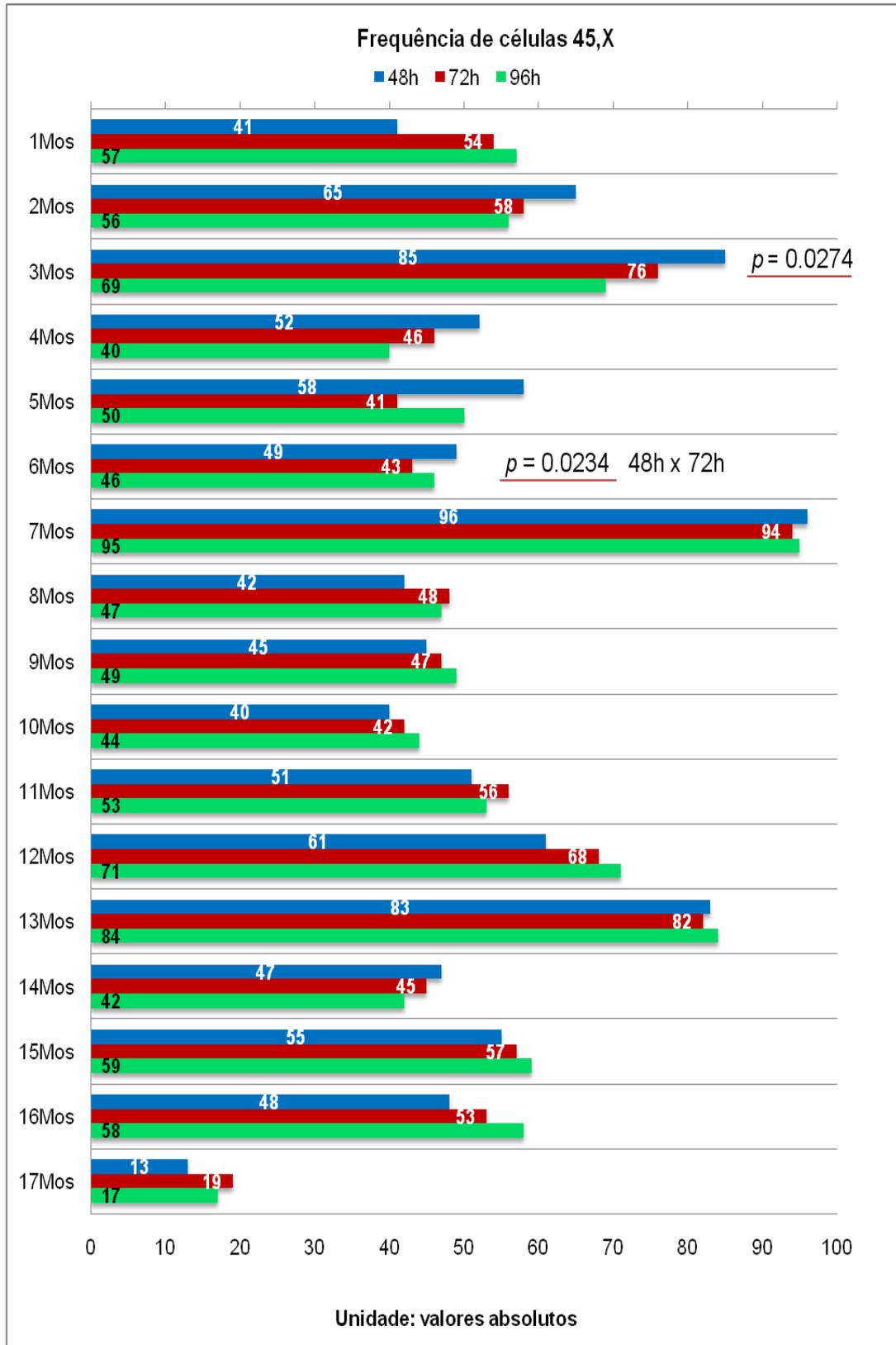
**Nota:** Mos = mosaicismos cromossômicos (Mos); SP = sangue periférico; MO = mucosa oral e SU = sedimento urinário.

## **6.5. SELEÇÃO *IN VITRO*, FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MONOSSÔMICAS DE ACORDO COM A DURAÇÃO DAS CULTURAS (48, 72 e 96 horas)**

Para verificar a ocorrência de seleção celular *in vitro*, a quantidade de células de cada linhagem foi averiguada em culturas com duração de 48, 72 e 96 horas. O valor absoluto de células em duração das culturas de 48, 72 e 96 horas encontram-se no Apêndice 8.

### **6.5.1. ANÁLISE INTRA-INDIVIDUAL**

Na Figura 10, encontra-se a quantidade de células 45,X nas culturas incubadas por 48, 72 e 96 horas.



**Figura 10.** Quantidade de células da linhagem 45,X nas culturas de 48, 72 e 96 horas.

**Nota:** Mos =mosaicismo; p= p valor

Na Tabela 2 temos os resultados obtidos através do teste exato de Fisher.

**Tabela 2:** Frequência de células com a linhagem 45,X de cada indivíduo nos diferentes tempos de cultura.

Participantes	Cariótipo em culturas de 72 horas	Frequência da linhagem 45,X - 48h (%)	Frequência da linhagem 45,X - 72h(%)	Frequência da linhagem 45,X - 96h(%)	$\chi^2$	p valor
1Mos	45,X[54]/46, XX[46]	41	54	57	2,380	0,3042
2Mos	45,X[58]/46, XX[42]	65	58	56	1,075	0,5843
<b>3Mos</b>	<b>45,X[76]/46,X+r(X) [24]</b>	<b>85</b>	<b>76</b>	<b>69</b>	<b>7,193</b>	<b>0,0274*</b>
4Mos	45,X [46]/46,X + mar (Y) [54]	52	46	40	2,899	0,2347
5Mos	45,X [41]/46,X + mar (X) [59]	58	41	50	0,7246	0,6961
<b>6Mos</b>	<b>45,X [43]/46,X + mar [57]</b>	<b>49</b>	<b>43</b>	<b>46</b>	<b>**</b>	<b>0,0234*</b>
7Mos	45,X[94]/46,X + mar[6]	96	94	95	<b>**</b>	0,7475
8Mos	45,X [48]/46,X + mar[52]	42	48	47	0,8329	0,6594
9Mos	45,X[47]/46, XY[53]	45	47	49	0,3212	0,8517
10Mos	45,X [42]/46,X + mar [58]	40	42	44	0,3284	0,8486
11Mos	45,X[56] /46,X mar[44](X)	51	56	53	0,5089	0,7753
12Mos	45,X [68]/46,X + mar [32]	61	68	71	2,370	0,3057
13Mos	45,X[82]/46, X+mar (X)[18]	83	82	84	0,1417	0,9316
14Mos	45,X[45]/46,X+mar(Y)[55]	47	45	42	0,5125	0,7739
15Mos	45,X[57]/46, XX[43]	55	57	59	0,3264	0,8494
16Mos	45,X [53]/46,X + mar [47]	48	53	58	2,007	0,3666
17Mos	45,X[19]/46,X+i(Yp)[81]	13	19	17	1,366	0,5051

\* Valores estatisticamente significantes \*\* Teste exato de Fischer 48 e 72h

**Nota:** Mos = mosaicismo cromossômico; Mar=cromossomo marcador; r = cromossomo em anel=isocromossomo e p=braço curto.

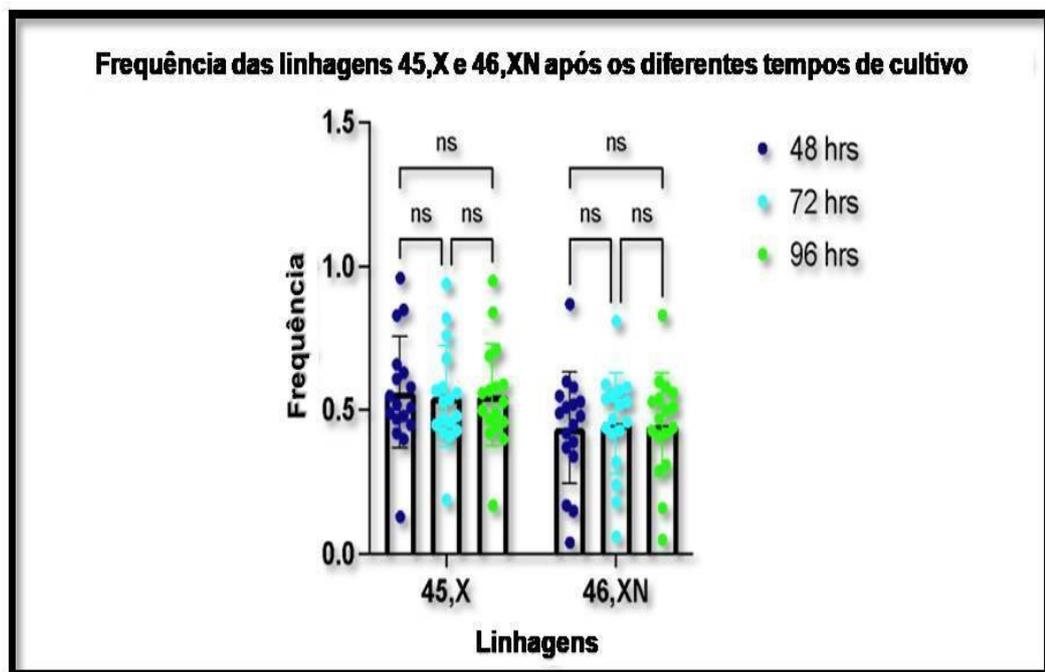
Esta análise mostrou diferenças significativas em duas participantes:

- participante 3Mos ( $p = 0.0274$ ), quantidade decrescente de metáfases da linhagem 45,X e crescente de metáfases da linhagem 46,X+r(X), ao longo do período;
- participante 6Mos ( $p = 0.0234$ ), houve uma queda do número de metáfases na linhagem 45,X e um incremento das metáfases na linhagem 46,X+mar(X), ao longo do período.

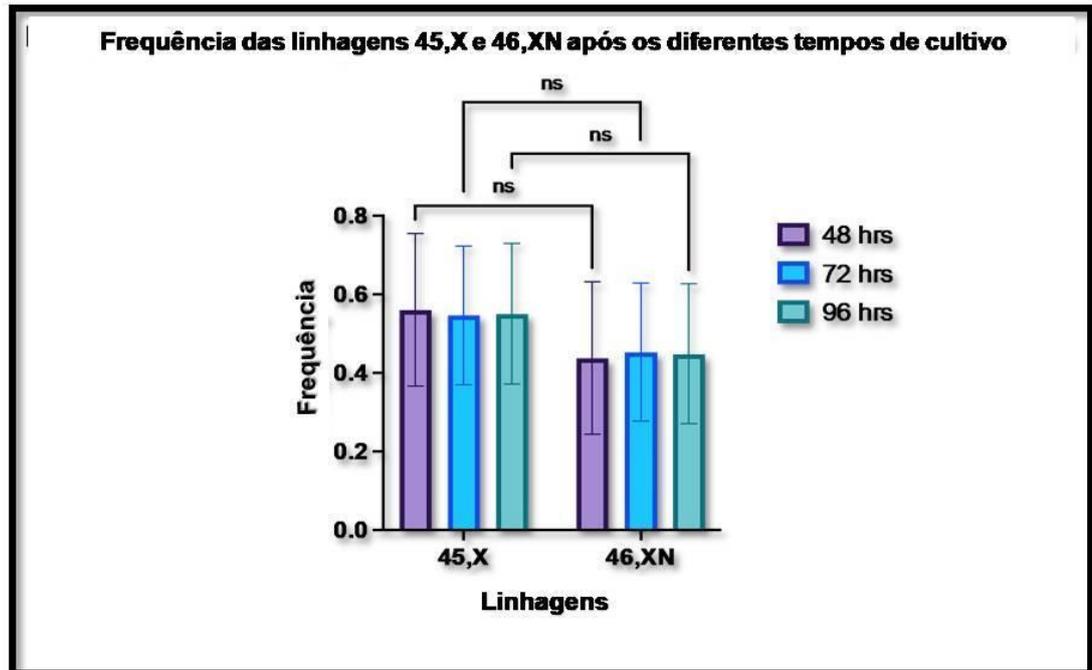
### 6.5.2. ANÁLISE INTERAMOSTRAL

A análise do interamostral, pelo teste de Tukey, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as culturas de 48h *versus* (vs) 72h, 48h vs. 96h, 72h vs. 96h, tanto na linhagem 45,X quanto na 46,XN ( $p$  valor = 0.6625, 0.8490 e 0.8803, respectivamente) (Figura 11).

A análise entre as linhagens, pelo teste de Šídák, em relação à duração das culturas, também não mostrou diferenças estatisticamente relevantes ( $p$  valor = 0.2082 - 48h;  $p$  valor = 0.3511 - 72h;  $p$  valor = 0.2810 - 96h) (Figura 12).



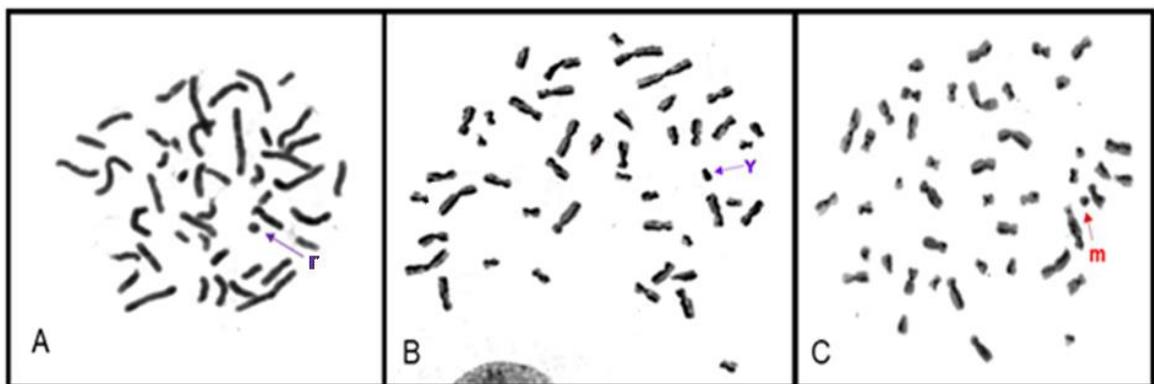
**Figura 11:** Frequência das células com constituição 45,X e 46,XN nas culturas com duração de 48, 72 e 96 horas, segundo análise de do teste de Tukey.



**Figura 12:** Frequência das células com constituição 45, X e 46, XN nas culturas com duração de 48, 72 e 96 horas, segundo análise do teste de Šídák.

## 6.6. DINÂMICA DE PROLIFERAÇÃO

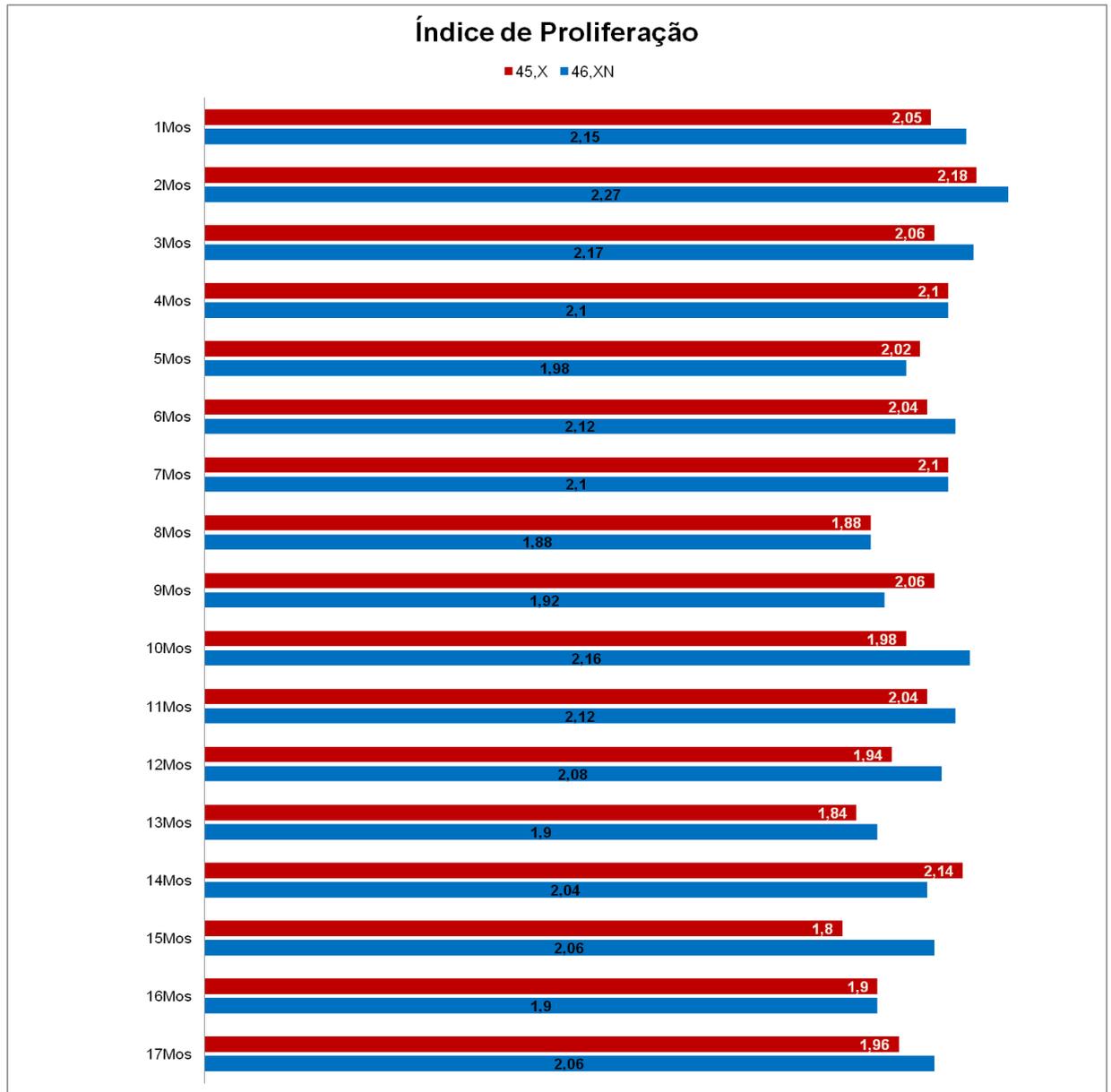
O índice de proliferação (IP) de cada linhagem celular foi calculado individualmente avaliando-se a quantidade de células em primeira, segunda e terceira divisão celular, de acordo com o padrão de incorporação da BrdU (Figura 13).



**Figura 13:** Padrão de diferenciação das células após incorporação de BrdU (A) célula em primeira divisão da participante 3Mos (B) célula em segunda divisão da participante 9Mos (C) célula em terceira divisão da participante 3Mos.

**Nota:** r = cromossomo em anel, Y = cromossomo Y e m = cromossomo marca

O IP de cada linhagem participantes com mosaicismos cromossômico encontra-se na Figura 14.



**Figura 14:** IP nas diferentes linhagens celulares das participantes com mosaicismos cromossômico.

**Nota:** Mos=mosaicismos

## 6.7. ANÁLISE INTRA-AMOSTRAL DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (IP) NAS PACIENTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO

A análise intra-amostral do IP pelo teste do  $\chi^2$  ou exato de Fisher não mostrou diferença significativa entre as linhagens 45,X e 46,XN no grupo das pacientes com síndrome de Turner e mosaicismos cromossômicos incluídas no estudo (Tabela 3).

**Tabela 3** : Análise de dinâmica de proliferação das linhagens 45,X e 46,XN de cada participante

Participantes	Linhagem	Nº células em 1ª divisão	Nº células em 2ª divisão	Nº células em 3ª divisão	IP	$\chi^2$	p valor
1Mos	45,X	25	45	30	2,05	0,9387	0,6254
	46,XX	21	43	36	2,15		
2Mos	45,X	07	27	16	2,18	0,9859	0,6108
	46,XX	07	23	21	2,27		
3Mos	45,X	12	23	15	2,06	1,016	0,6017
	46,X,+r(X)	08	26	16	2,16		
4Mos	45,X	10	25	15	2,10	0,1640	0,9213
	46,X,+mar(Y)	09	27	14	2,10		
5Mos	45,X	12	25	13	2,02	0,7311	0,6938
	46,X,+mar(X)	11	29	10	1,98		
6Mos	45,X	11	26	13	2,04	0,4380	0,8033
	46,X,+mar(X)	10	24	16	2,12		
7Mos	45,X	06	33	11	2,10	0,1829	0,9126
	46,X,+mar(X)	07	31	12	2,10		
8Mos	45,X	12	32	06	1,88	0,1814	0,9133
	46,X,+mar(X)	13	30	07	1,88		
9Mos	45,X	08	31	11	2,06	2,123	0,3460
	46,XY	14	26	10	1,92		
10Mos	45,X	13	25	12	1,98	3,187	0,2032
	46,X,+mar(X)	06	30	14	2,16		
11Mos	45,X	10	28	12	2,04	0,4600	0,7945
	46,X,+mar(X)	09	26	15	2,12		
12Mos	45,X	12	29	09	1,94	1,432	0,4886
	46,X,+mar(X)	10	26	14	2,08		
13Mos	45,X	16	26	08	1,84	0,2741	0,8719
	46,X,+mar(X)	15	25	10	1,90		
14Mos	45,X	11	21	18	2,14	0,7435	0,6895
	46,X,+mar(Y)	12	24	14	2,04		
15Mos	45,X	15	30	05	1,80	4,399	0,1108
	46,XX	09	29	12	2,06		
16Mos	45,X	13	29	08	1,90	0,1673	0,9198
	46,X,+mar(X)	14	27	09	1,90		
17Mos	45,X	12	28	10	1,96	1,000	0,6065
	46,X+,i,(Yq)	08	31	11	2,06		

**Nota:** IP = índice de proliferação; e  $\chi^2$  = qui-quadrado. Mos = mosaicismos cromossômicos; mar = cromossomo marcador; r = cromossomo em anel, i = isocromossomo e q = braço longo

### 6.7.1. ANÁLISE INTERAMOSTRAL DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (IP) NAS PACIENTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO

Considerando o grupo amostral, a análise interamostral das médias do IP das linhagens 45,X e 46,XN apresentaram diferença significativa pelo teste t pareado ( $p = 0.0338$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** : Teste t pareado entre as médias do IP das linhagens 45,X e 46,XN

Variável	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão (±)	Intervalo de Confiança 95%	
IP linhagem 45,X	17	2.005	0.026	0.106	1.951	2.060
IP linhagem 46,XN	17	2.078	0.038	0.155	1.998	2.157

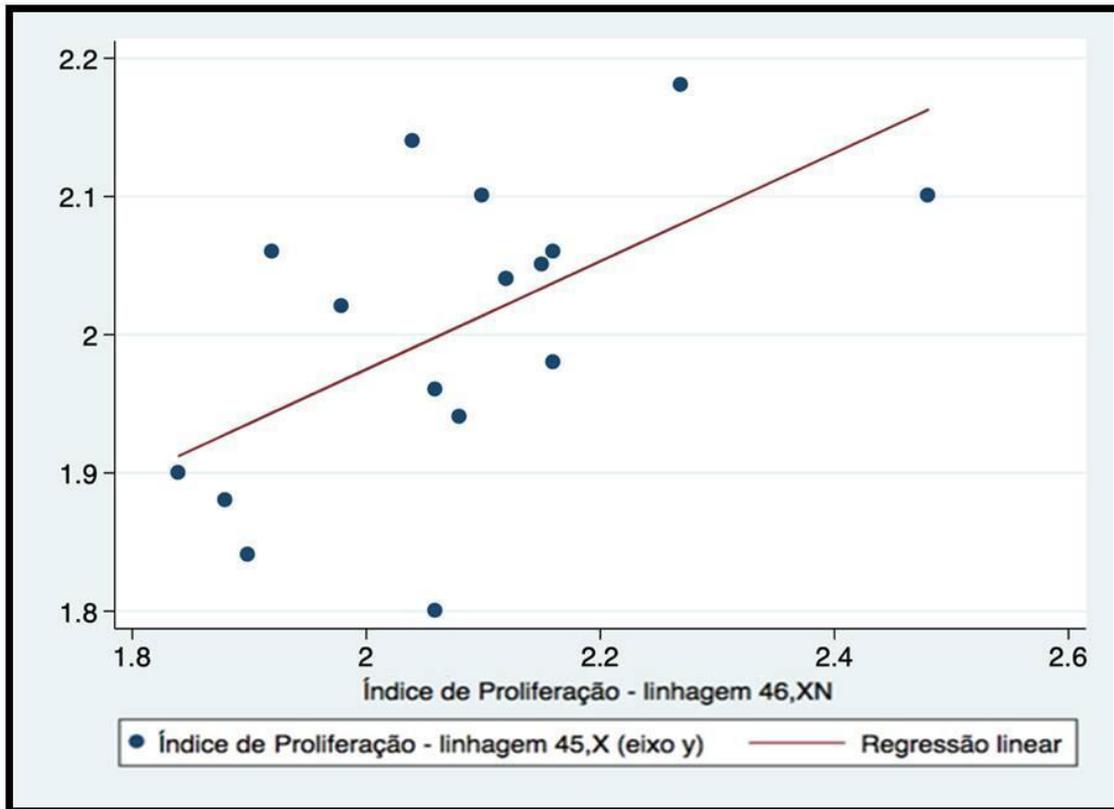
t = -2.3211                      p = 0.0338

A avaliação pela correlação de Pearson evidenciou uma correlação moderada positiva entre o IP da linhagem 45,X e da linhagem 46,XN ( $r=0.5716$ ). Isto é, há uma associação positiva entre a IP das duas linhagens, assim, quando a IP da linhagem 45,X aumenta, também tende a elevar-se a IP da linhagem 46,XN (Tabela 5).

**Tabela 5**: Correlação Pearson para o IP das linhagens 45,X e 46,XN do grupo amostral

Variável	Média	Desvio Padrão (±)	Min	Max	IP linhagem 45,X	IP linhagem 46,XN
IP linhagem 45,X	2.005	0.106	1.80	2.18	1.000	
IP linhagem 46,XN	2.078	0.155	1.84	2.48	0.5716	1.000

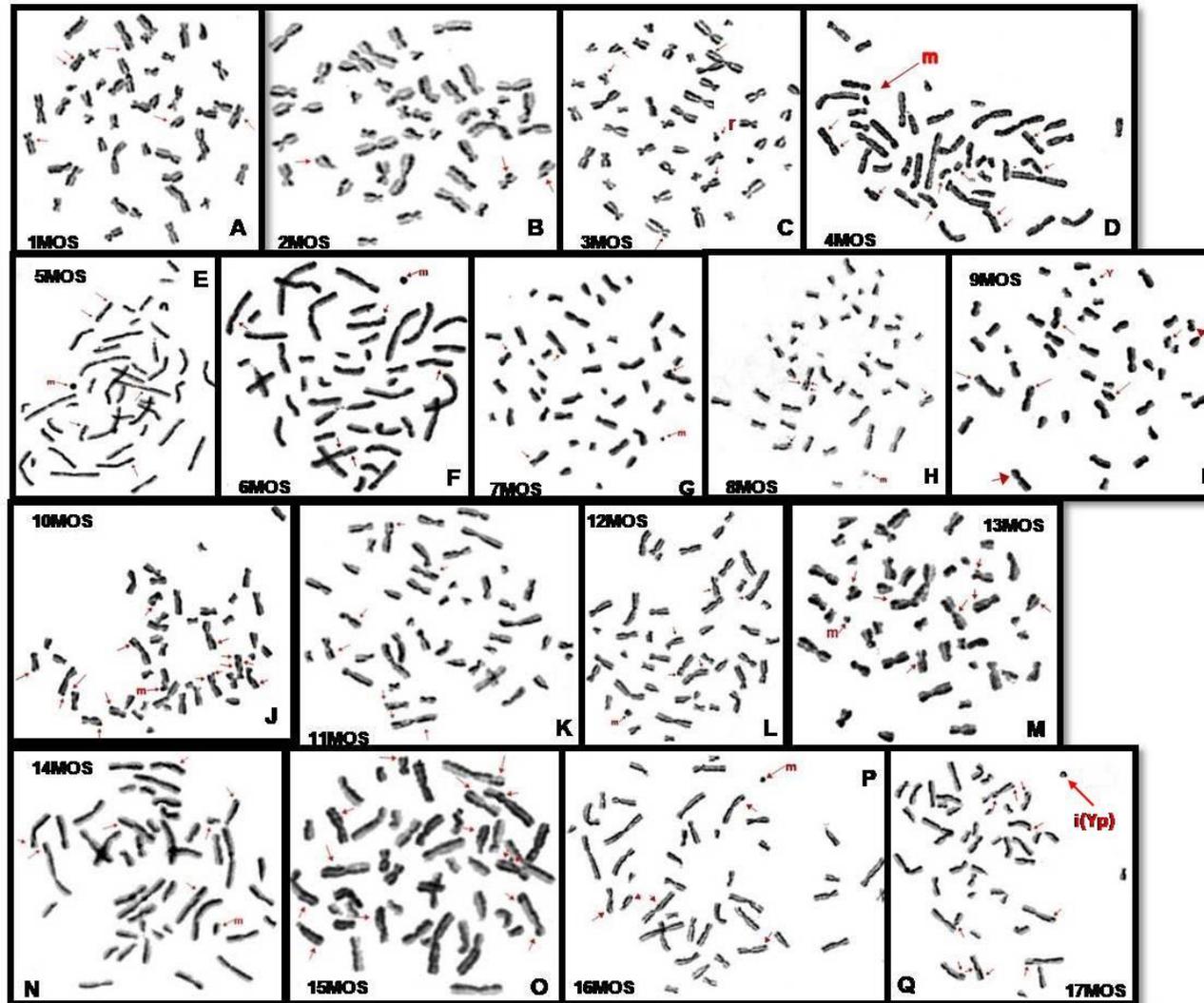
A regressão linear simples do IP também mostrou uma correlação significativa ( $p = 0.017$ ) entre as linhagens. Portanto, ao assumir o IP da linhagem 45,X como variável dependente contínua (desfecho) e o IP da linhagem 46,XN como variável independente, observou-se uma relação positiva entre as duas variáveis. Deste modo, as pacientes com valores de IP mais elevados da linhagem 46,XN apresentaram uma maior probabilidade de valores de IP mais elevados também para a linhagem 45,X (Figura 15).



**Figura 15:** Regressão Linear do IP das linhagens 45,X e 46,XN

### 6.8. AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA ATRAVÉS DA FREQUÊNCIA DE TROCAS E CROMÁTIDES IRMÃS (TCI)

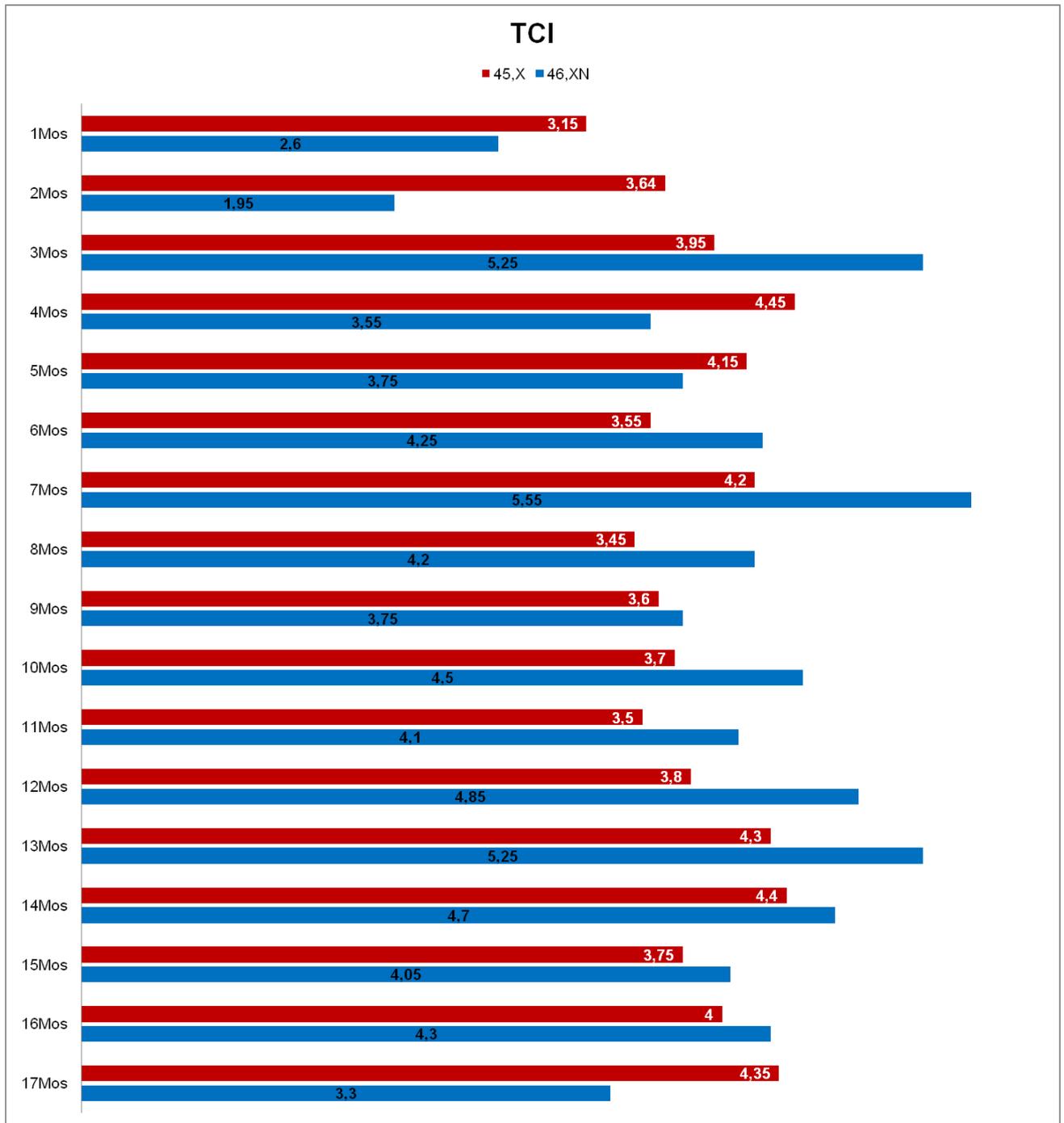
A avaliação da instabilidade cromossômica foi realizada pelo cômputo das TCI em culturas de 72 horas na presença de BrdU. As imagens das células em segunda divisão celular *in vitro* onde as TCI foram computadas encontram-se na Figura 16. Em cada uma das pacientes avaliamos 20 metáfases de cada linhagem.



**Figura 16:** Metáfases em segunda divisão, após incorporação com BrdU, das pacientes com mosaicismo. As setas indicam: as TCIs, o cromossomo marcador, quando presente pela letra (m); (r) para cromossomo em anel, o (Y) para cromossomo Y e o i(Yp) o isocromossomo de braço curto do cromossomo Y.

### 6.8.1. ANÁLISE INTRA-AMOSTRAL DA QUANTIDADE TROCA DE CROMÁTIDES IRMÃS (TCI) NAS PACIENTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO

A média das TCI computadas em cada linhagem celular das participantes com mosaicismos cromossômico encontram-se na Figura 17.



**Figura 17:** Média das da TCI nas diferentes linhagens obtidas das participantes com mosaicismos cromossômico.

A análise intra-amostral pelo teste *t* não pareado evidenciou que houve diferença significativa entre as duas linhagens celulares em cinco participantes (2, 3, 4, 7 e 12) (Tabela 6).

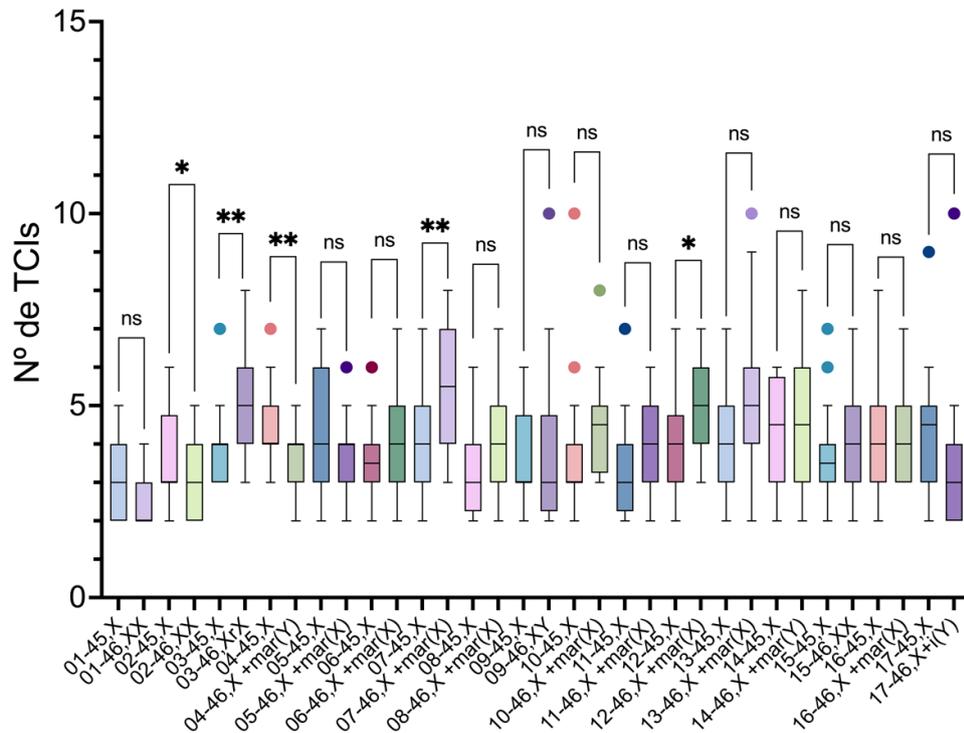
**Tabela 6:** Diferenças da TCI entre as linhagens das participantes

Participantes	Linhagem	Média das TCI	p valor
1Mos	45,X	3,15	0,0551
	46,XX	2,6	
<b>2Mos</b>	<b>45,X</b>	<b>3,65</b>	<b>0,0454(*)</b>
	46,XX	2,95	
<b>3Mos</b>	45,X	3,95	<b>0,0046(**)</b>
	<b>46,X,+r(X)</b>	<b>5,25*</b>	
<b>4Mos</b>	<b>45,X</b>	<b>4,45*</b>	<b>0,0046(**)</b>
	46,X,+mar(Y)	3,55	
5Mos	45,X	4,15	0,3583
	46,X+mar(X)	3,75	
6Mos	45,X	3,55	0,0779
	46,X,+mar(X)	4,25	
<b>7Mos</b>	45,X	4,2	<b>0,0100(**)</b>
	<b>46,X,+mar(X)</b>	<b>5,55*</b>	
8Mos	45,X	3,45	0,0714
	46,X,+mar(X)	4,2	
9Mos	45,X	3,6	0,7805
	46,XY	3,75	
10Mos	45,X	3,7	0,1183
	46,X,+mar(X)	4,5	
11Mos	45,X	3,5	0,1544
	46,X,+mar(X)	4,1	
<b>12Mos</b>	45,X	3,8	<b>0,0105 (*)</b>
	<b>46,X,+mar(X)</b>	<b>4,85*</b>	
13Mos	45,X	4,3	0,0745
	46,X,+mar(X)	5,25	
14Mos	45,X	4,4	0,5248
	46,X,+mar(Y)	4,7	
15Mos	45,X	3,75	0,4647
	46,XX	4,05	
16Mos	45,X	4	0,5228
	46,X,+mar(X)	4,3	
17Mos	45,X	4,35	0,0703
	46,X+,i(Yp)	3,3	

Nota: P-valor <0,05; \*\* P- valor ≤0,01. **Mar=cromossomo marcador; r=cromossomo em anel; i=isocromossomo e p=braço curto.**

Em três amostras, (3Mos; 7Mos e 12Mos), a quantidade de TCI foi maior nas linhagens com 46 cromossomos, As linhagens apresentaram cromossomos anômalos, em duas sSMS derivado do cromossomo X (46,X+mar(X)) e em outra cromossomo em anel (46,Xr(X)), em relação à linhagem 45,X.

Em duas amostras a quantidade de TCI foi maior na linhagem 45,X. Na amostra (2Mos), foi maior em relação à linhagem 46,XX. Na amostra 4Mos, foi maior em relação à linhagem com cromossomo marcador derivado do cromossomo Y (46,X+mar(Y)) (Figura 18).



**Figura 18:** Quantidade média de TCI entre as linhagens celulares das amostras com mosaicismos cromossômicos.

### 6.8.2. ANÁLISE INTERAMOSTRAL TROCA DE CROMÁTIDES IRMÃS (TCI) NAS PACIENTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO

Em relação à análise interamostral da quantidade das TCI, não foram verificadas diferenças significativas nas médias das linhagens 45,X e 46,XX ( $p = 0.2871$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7:** Teste *t* pareado para as médias de TCI das linhagens 45,X e 46,XN

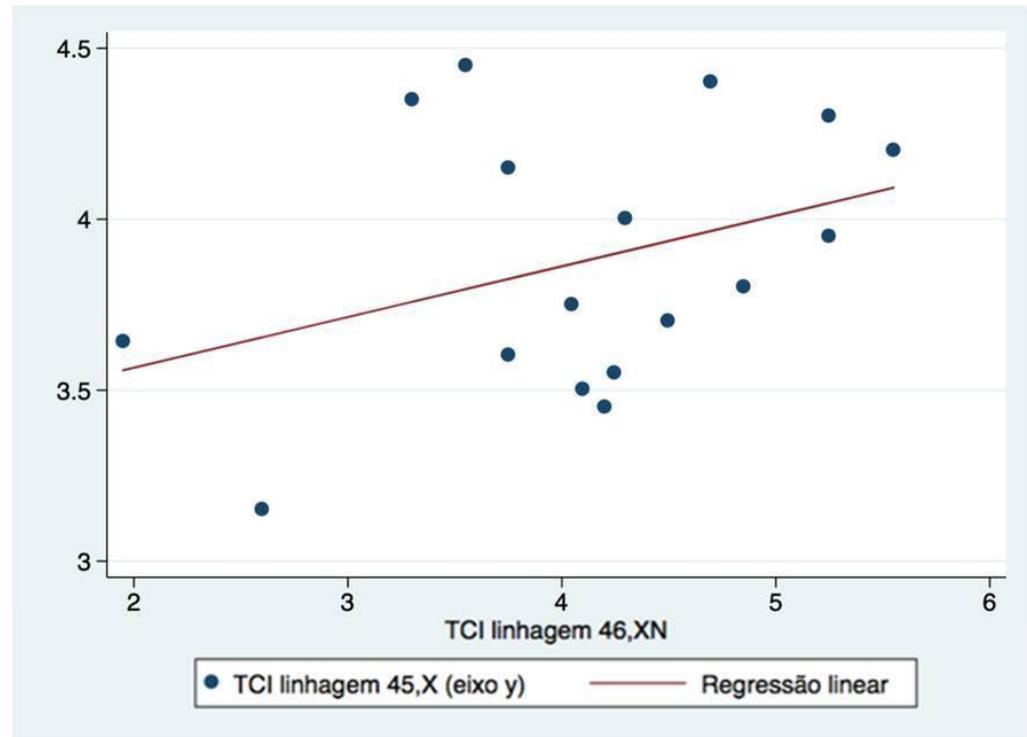
Variável	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão (±)	Intervalo de confiança 95%	
Frequência TCI 45,X	17	3.879	0.093	0.383	3.682	4.076
Frequência TCI 46,XN	17	4.112	0.227	0.934	3.631	4.592
t = -1.1012		p = 0.2871				

Foi detectada uma correlação fraca entre a quantidade média de TCI entre a linhagem 45,X e a linhagem 46,XN, pela correlação de Pearson ( $r=0.3615$ ), (Tabela 8). Portanto, ao contrário do IP, a associação positiva entre as frequências de TCI das duas linhagens foi fraca, não sendo possível afirmar com segurança que valores mais elevados da frequência de TCI da linhagem 45,X estão associados a valores correspondentes mais elevados da frequência de TCI da linhagem 46,XN.

**Tabela 8:** Correlação de Pearson para a troca de cromátides irmãs (TCI) das linhagens 45,X e 46,XN do grupo amostral.

Variável	Média	Desvio Padrão (±)	Min	Max	TCI linhagem 45,X	TCI linhagem 46,XN
TCI linhagem 45,X	3.879	0.383	3.15	4.45	1.000	
TCI linhagem 46,XN	4.112	0.934	1.95	5.55	0.3615	1.000

A regressão linear simples da frequência da TCI mostrou uma correlação não significativa ( $p = 0,154$ ) entre as linhagens. Assim sendo, ao assumir a frequência de TCI da linhagem 45,X como variável dependente contínua (desfecho) e a da frequência de TCI da linhagem 46,XN como variável independente, a relação positiva entre as duas variáveis não foi estatisticamente significativa. Consequentemente, não se pode afirmar que as participantes com valores da frequência de TCI mais elevados da linhagem 46,XN apresentaram uma maior probabilidade de valores da frequência de TCI mais elevados também para a linhagem 45,X (Figura 19).



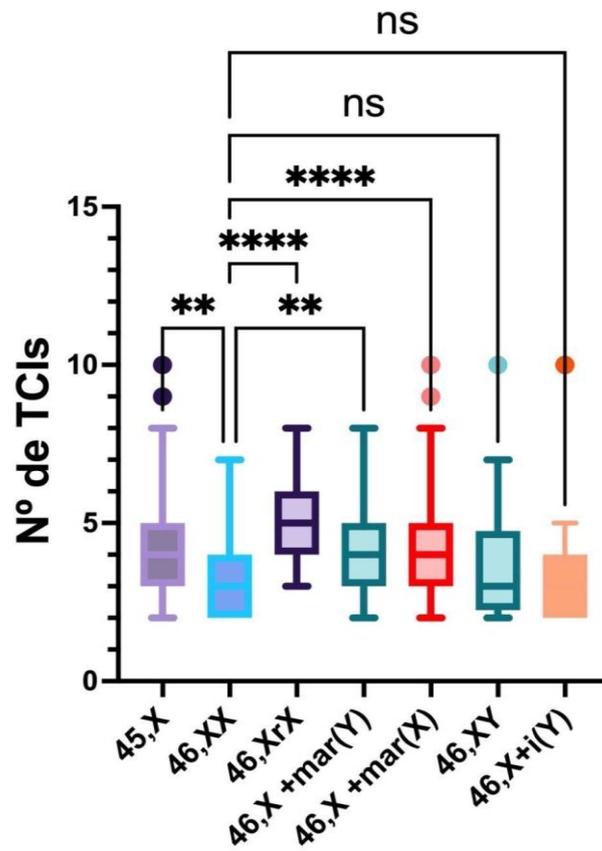
**Figura 19:** Regressão linear da TCI das linhagens 45,X e 46,XN

A análise interamostral da quantidade de TCI entre as linhagens 45,X e 46,XN evidenciou que houve diferença estatisticamente significativa entre a linhagem 45,X em relação às linhagens 46,XX; 46,Xr(X), 46,X+mar(X) ( $p$  valor= 0,0155; 0,0007 e  $<0,0001$  respectivamente); a 46,XX com as linhagens 46,Xr(X), 46,X+mar(Y), 46,X+mar(X) ( $p$ = $<0,0001$ ; 0,0328 e  $<0,0001$  respectivamente); a 46,Xr(X) com as linhagens 46,XY e 46,X+i(Y) ( $p$  valor= $<0,0198$  e 0,0004 respectivamente) e 46,X+mar(X) com a linhagem 46,X+i(Y) ( $p$  valor=0,0060) (Tabela 9 e Figura 20).

**Tabela 9:** Análise interamostral da TCI entre as linhagens 45,X e 46,XN das pacientes com mosaïcismo cromossômico.

Cariótipo	46,XX	46,Xr(X)	46,X+mar(Y)	46,X+mar(X)	46,XY	46,X+i(Yp)
45,X	<b>0,0151*</b>	<b>0,0007 *</b>	0,9995	<b>&lt;0,0001 *</b>	>0,9999	0,8204
46,XX		<b>&lt;0,0001 *</b>	<b>0,0328 *</b>	<b>&lt;0,0001*</b>	0,9542	>0,9999
46,Xr(X)			0,0841	0,4991	<b>&lt;0,0198*</b>	<b>0,0004 *</b>
46,X+mar(Y)				0,9079	0,9998	0,5310
46,X+mar(X)					0,3630	<b>0,0060 *</b>
46,XY						0,9997

**Nota:** Valores estatisticamente significantes em negrito\* mar= cromossomo marcador, r= cromossomo em anel, i = isocromossomo e p= braço curto.



**Linhagens 45,X & 46,XN**  
**Comparações com a linhagem 46,XX**

**Figura 20:** Análise interamostral da TCl entre as linhagens 45,X e 46,XN das amostras com mosaïcismo cromossômico.

## 7. DISCUSSÃO

A ST é a ser a única monossomia observada em nativos, sendo uma das aberrações cromossômicas mais comumente encontradas em humanos (CUI *et al.*, 2018). A compreensão dos processos que acarretam as aneuploidias e suas consequências celulares e biológicas é de interesse fundamental na genética (GRAVHOLT *et al.*, 2023).

Existem poucos estudos que avaliaram a constituição em diferentes tecidos mulheres com ST, não encontramos registros do estudo em células de sedimento urinário (FRERIKS *et al.*, 2013; GRAFF *et al.*, 2020; BARBOSA *et al.*, 2021). Ademais, não ha literatura estudo que avaliaram a proliferação celular e a instabilidade cromossômica em indivíduos com ST.

### 7.1.AVALIAÇÃO DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS EM DIFERENTES TECIDOS

#### 7.1.1 GRUPO DE PARTICIPANTES COM MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO X

##### 7.1.1.1 Presença de mosaicismismo oculto

Muitas mulheres com ST e cariótipo 45,X podem apresentar mosaicismismo cromossômico, que pode não ser detectado no sangue periférico, porém estar presente em outros tecidos de origem embrionária distinta, tais como mucosa oral, gônadas, entre outros (FRERIKS *et al.*, 2013; THUNSTRÖM *et al.*, 2019, BARBOSA *et al.*, 2021).

A caracterização do mosaicismismo em ST com constituição 45,X é desafiadora, e entre outros fatores depende da metodologia utilizada (HOOK & WARBURTON, 2014).

Esta abordagem experimental ampliou o poder analítico, permitindo avaliar células sem o viés do cultivo *in vitro*, expandindo para diferentes tecidos da mesma participante.

No grupo 1, participantes com monossomia do cromossomo X, a presença de uma linhagem celular adicional foi observada em 9 das 10 participantes e estava presente em mais de um tecido. Uma das participantes apresentou ainda uma terceira linhagem celular confinada às células do SU.

Alguns estudos consideram que linhagens de baixa frequência, mesmo inferior a 5%, poderia ser uma evidência de mosaicismo oculto (HASSOLD *et al.*, 1988; HELD *et al.*, 1992; JACOBS *et al.*, 1997; ARAÚJO & RAMOS, 2008; IOUROV *et al.*, 2019). Neste estudo, a avaliação de células de diferentes tecidos mostrou que a presença da segunda linhagem celular foi consistente, ocorrendo em todos os tecidos avaliados, mesmo que em frequência inferior ao *cutt-off*. Apenas uma participante apresentou 100% das células monossômicas, nos tecidos que foram avaliados.

O estudo realizado por Freriks *et al.* (2013), avaliou pela FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y, células da mucosa oral de 63 pessoas com ST e cariótipo 45,X, também detectou a presença de uma segunda ou terceira linhagem em 19 participantes (30,2%) avaliadas.

Na ST o mosaicismooocorre em aproximadamente 50% dos indivíduos, sendo comum a presença de linhagens crípticas, que por terem baixa frequência no sangue periférico podem não ser detectadas pela avaliação citogenética rotineira (BIANCO *et al.*, 2008; MARZUKI *et al.*, 2011; GRAVHOLT *et al.*, 2023). Em nosso estudo, a frequência de participantes com mosaicismo oculto foi de 90%, sendo superior à verificada em outros estudos, enfatizando a importância da avaliação em amostras provenientes de diferentes tecidos.

Estes resultados apoiam a hipótese que as nativas com ST apresentam mosaicismo cromossômico (BASTIANS *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2021).

Outros estudos também avaliaram células interfásicas de um ou mais tecidos. Barbosa *et al.*, (2021) admitem que a análise da mucosa oral é uma opção vantajosa, tanto pelo baixo custo, como por ser pouco invasiva. A origem embrionária destas células é diversa das células sanguíneas. Da mesma forma, para Thunström *et al.* (2019), a FISH em células da mucosa oral é uma ferramenta útil para detecção de fragmentos crípticos do cromossomo Y, que podem não ser detectados pela citogenética rotineira.

Curiosamente, em todas as participantes deste estudo, a segunda linhagem detectada apresentou dois sinais correspondentes ao cromossomo X.

A população de linfócitos do sangue periférico representa células advindas da expansão clonal de células progenitoras, cuja expansão é decorrente de

diferentes fatores ambientais e fisiológicos, e pode não refletir a constituição do tecido que as originou (LAURIE *et al.*, 2012).

Desse modo, o estudo de células após cultivo *in vitro* pode ser influenciado pela duração do ciclo celular e capacidade de proliferação de cada linhagem. Logo, a abordagem experimental utilizada, avaliando células interfásicas provenientes de diferentes folhetos embrionários permite uma análise com mais amplitude sem o viés do cultivo celular.

A presença da linhagem adicional nas células de tecidos de origem embrionária distintas evidencia que as linhagens foram geradas no início do desenvolvimento embrionário.

As consequências fenotípicas do mosaicismo são difíceis de estimar, já que a frequência e distribuição de células anormais variam em relação ao momento do desenvolvimento em que ocorreram os erros, sendo influenciada por processos aleatórios da distribuição das células (SPINNER; CONLIN, 2014).

As diferenças na quantidade de células de cada linhagem refletem também a dinâmica de proliferação de cada tecido. Enquanto as células de sangue periférico são derivadas do mesoderma, as células da mucosa oral são de origem ectodérmica e as células do sedimento urinário têm origem no endoderma (LAURIE *et al.*, 2012; ARSHAM; BARCH; LAWCE, 2017). Logo, as células do sedimento urinário seriam mais próximas embrionariamente das células gonadais, podendo refletir com maior precisão a constituição gonadal. Porém o estudo de células do sedimento urinário é complexo, pois a presença de bactérias pode inviabilizar esta abordagem em alguns indivíduos. Ainda é inédito na literatura à análise de sedimento urinário nessa síndrome.

Esses resultados demonstram que a análise citogenética convencional pode ser insuficiente para verificar a presença de mosaicismo cromossômico, como já constatado por diversos outros autores, que recomendam a utilização de técnicas moleculares (FISH; PCR) mais sensíveis para detecção de linhagens minoritárias (NAZARENKO; TIMOSHEVSKY; SUKHANOVA, 1999; FRERIKS *et al.*, 2013; THUNSTRÖM *et al.*, 2019, BARBOSA *et al.*, 2021). Nesse estudo, a avaliação por FISH foi crucial para a identificação das linhagens com baixa frequência nas participantes do grupo 1, monossomia do cromossomo X, .

## 7.2. GRUPO DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO

### 7.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO CROMOSSÔMICA NO GRUPO COM MOSACISMO CROMOSSÔMICO

A manutenção de cromossomos estruturalmente anormais durante a divisão celular é comprometido, sendo que a perda destes cromossomos pode originar o aparecimento de uma nova linhagem celular acarretando o mosaicismo. O mosaicismo cromossômico ocorre na maioria dos indivíduos com cromossomos anômalos (WOLF *et al.*, 1994; LIEHR, CLAUSSEN e STARKE, 2004; BIESECKER & SPINNER, 2013).

Em nosso estudo, apenas em 23,5% das participantes, a linhagem monossômica foi acompanhada de uma linhagem normal. Nas demais 76,5% das participantes, a segunda linhagem celular apresentou um cromossomo estruturalmente anômalo.

Neste grupo amostral os sSMC foram caracterizados em 11 das 13 participantes que apresentaram cromossomos estruturalmente anômalos. A prevalência foi de sSMC derivados do cromossomo X, em 9 participantes (52,9%). Os sSMC derivados do cromossomo Y estavam presentes em 2 participantes (11,8%).

Na ST os sSMC ocorrem numa frequência em torno de 3-6.6% e podem ser derivados do cromossomo X ou do Y ou de cromossomo autossomos (BONDY, 2005; LIEHR *et al.*, 2007). Neste estudo, todos os sSMCs foram derivados apenas dos cromossomos sexuais, sem participação de cromossomos autossomos.

Nos 9 sSMC derivados do cromossomo X, estava presente uma cópia de DXZ1, em seis apresentaram somente uma cópia de *XIST* e em dois (8Mos e 12Mos) haviaduas cópias desta região e em um (7Mos) o *XIST* estava ausente.

A natureza relativamente benigna das anomalias associadas à monossomia do cromossomo X ou à presença do cromossomo X estruturalmente anormal pode ser explicada pelo fato de as mulheres possuírem apenas um cromossomo X ativo (CALLEN *et al.*, 1995). Segundo Therman e Susman (1996), o desequilíbrio funcional do cromossomo X, ou seja, a presença de segmentos ativos adicionais tem uma repercussão fenotípica similar ao desequilíbrio de cromossomos autossomos.

Assim a manutenção do gene *XIST* possibilita a inativação adequada do cromossomo anômalo. Mazzaschi *et al.* (2014) sugeriram que a ausência do gene *XIST* nos cromossomos marcadores ou em anel, poderia acarretar um fenótipo mais grave inclusive com DI nas portadoras da ST. Kalkan *et al.* (2016) sugerem que a variabilidade fenotípica, nos casos que o cromossomo marcador foi originário do cromossomo X, depende tanto do tamanho do cromossomo marcador quanto da presença do gene *XIST*. Em nossa amostra, apenas uma participante com sSMC não apresentou hibridação para o gene *XIST*, entretanto não foi possível estabelecer uma correlação fenotípica devido a pouca idade da participante.

Em uma participante (5,9%) estava presente um cromossomo X em anel. Na ST a presença de cromossomo em anel é rara, ocorrendo em 5% dos indivíduos (LUO *et al.*, 2022). Há uma instabilidade intrínseca aos cromossomos em anel que pode produzir sua duplicação interna formando cromossomos dicêntricos, e também estão sujeitos a perda mitótica (DAVEMPORT, 2010). Nesta participante, o cromossomo em anel apresentou uma cópia da região centromérica. Nos cromossomos em anel muito pequenos pode ocorrer a perda do gene *XIST*, resultando em dissomia funcional dos genes contidos nesses cromossomos (TOMPIKINS *et al.*, 2002; LUO *et al.*, 2022). O cromossomo em anel da participante apresentou duas cópias do gene *XIST*, sugerindo que a capacidade de inativação deste cromossomo pode ter sido preservada.

Admite-se que os cromossomos sexuais seriam suscetíveis a arranjos estruturais pelo padrão de organização e replicação do DNA. Nas regiões de heterocromatina, o DNA se replica no final da fase S (replicação tardia) e apresenta uma taxa de mutação maior que o DNA que se replica no início da fase S (replicação precoce) (ALADJEM & FU, 2014)

A heterocromatina é uma característica arquitetônica fundamental dos cromossomos eucarióticos que confere a determinadas regiões genômicas propriedades funcionais específicas (ALLSHIRE; MADHANI, 2018). Ela foi descrita pela primeira vez por Heitz, através de métodos de coloração da cromatina, observando a presença de duas regiões distintas nos cromossomos: a eucromatina com diferentes graus de condensação e a heterocromatina que se apresenta mais compactada ao longo do ciclo celular (HEITZ, 1928).

A heterocromatina é classificada em dois tipos facultativa e constitutiva: A heterocromatina facultativa se refere a uma região do cromossomo que contém genes, e sua condensação varia no decorrer do desenvolvimento do organismo. Em contraste, a heterocromatina constitutiva é formada por sequências de DNA repetitivo, repetições *in tandem*, por DNA satélite e elementos transponíveis, apresentado um maior grau de condensação em relação à eucromatina. No entanto, ela possui um papel crucial na manutenção da estabilidade cromossômica, formação de centrômero, pareamento e segregação cromossômica ao longo do processo de divisão celular (ALLSHIRE; MADHANI, 2018; LIU; ALI; ZHOU, 2020)

Nos cromossomos sexuais a heterocromatina constitutiva está presente no cromossomo Y e a heterocromatina facultativa está presente no cromossomo X inativo. O cromossomo X inativo se duplica de forma rápida através síntese de DNA sincrônica de diversas regiões adjacentes, de forma desorganizada em sequências ao acaso, predispondo a instabilidade (ALADJEM & FU, 2014).

Para Onal *et al.*, (2012), nas pacientes com ST e com anomalias estruturais do cromossomo X, que incluem deleções, duplicações, inversões, translocações e cromossomos em anel (r), acarretam há um desequilíbrio significativo nos genes presentes no cromossomo X. Geralmente essas anomalias são toleradas, porque a inativação preferencial do cromossomo X anômalo pode restaurar, em parte, o equilíbrio genético.

Cromossomo anormal derivado do cromossomo Y foi identificado em três participantes: a 4Mos, 14Mos e 17Mos. Na 4Mos a presença de duas cópias de *SRY* e *SHOX* sugere tratar-se de isocromossomo do braço curto do cromossomo Y. Na 14Mos havia duas cópias de *ENY*, sugerindo tratar-se de cromossomo marcador dicêntrico. A 17Mos apresentou um isocromossomo do braço curto do cromossomo Y.

A frequência do cromossomo Y nas pacientes com ST é variável na literatura (BISPO *et al.*; 2014; GRAVHOLT *et al.*, 2017; GRAVHOLT *et al.*, 2019). Estima-se que na ST ele ocorra em 3 a 12% dos casos (LIEHR *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2017; GRAVHOLT *et al.*, 2019; RASOULI *et al.*, 2019; THUNSTRÖM *et al.*, 2019; GRAVHOLT *et al.*, 2023). No presente estudo a prevalência do cromossomo Y foi em 26,5% das amostras.

Nos cromossomos anômalos das participantes: 4Mos e 17Mos houve marcação dupla para o gene *SRY*, no entanto todas apresentaram diferenciação sexual feminina. Segundo Teraoka *et al* (1998) o fenótipo pode ser influenciado pela presença de determinados *loci*, como o *SRY* e pela proporção de células 45,X nos tecidos especialmente na gônada. Bullejos e Koopman, (2001); Larney; Bailey; Koopman, (2014) sugeriram que a constituição das células sanguíneas pode não refletir exatamente a constituição das células gonadais, de forma que a frequência de células 45,X nas gônadas não pode ser determinada. Logo, a ausência de *SRY* nas células gonadais ou a produção de *SRY* abaixo do limiar crítico podem resultar na ausência de diferenciação masculina. Assim, nestas participantes é provável que a população de células gonadais com *SRY* não tenha sido suficiente para induzir a diferenciação do testículo e subsequente diferenciação sexual masculina.

A presença de sequências do cromossomo Y em indivíduos com ST está associada ao aumento do risco de desenvolvimento do gonadoblastoma em aproximadamente 30% (BIANCO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; ZHONG; LAYMAN 2012; FRERIKS *et al.*, 2013; MARZUKI *et al*, 2011; MAZZASCHI *et al.*, 2014; BISPO *et al*, 2014; GRAVHOLT *et al* , 2017; GRAVHOLT *et al.*, 2019; RASOULI *et al.*, 2019; THUNSTRÖM *et al.*, 2019; GRAVHOLT *et al.*, 2023), todas as participantes deste estudo haviam realizado gonadectomia profilática.

#### **7.2.1.2. AVALIAÇÃO DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS EM DIFERENTES TECIDOS NO GRUPO DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO**

É um fato bem estabelecido que em indivíduos com mosaicismo o padrão de distribuição das linhagens celulares em diferentes tecidos pode ser extremamente variável, sendo comum a ocorrência de linhagens crípticas, que por terem baixa frequência no sangue periférico podem não ser detectadas pela avaliação citogenética rotineira. Assim a avaliação de diferentes tecidos é de grande interesse em relação às manifestações clínicas e fenotípicas. A avaliação citomolecular proporciona esta oportunidade (MRASEL *et al.*, 2008; LIEHR, 2008; BIANCO *et al.*, 2008; MARZUKI *et al.*, 2011). Em todas as participantes do grupo 2, a linhagem

monossômica foi prevalente. No estudo em núcleos interfásicos, quando houve, a prevalência da linhagem dissômica foi restrita a um dos tecidos.

Na ST o mosaicismos é usual, sendo a linhagem 45,X, acompanhada de uma ou mais linhagens com distintas constituições numéricas e/ou estruturais (OLIVEIRA *et al.*, 2009; DAVEMPORT, 2010; MARZUKI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2013; HOOK; WARBURTON, 2014; GRAVHOLT *et al.*, 2017; TUKE *et al.*, 2018; GRAVHOLT *et al.*, 2019).

A constituição cromossômica do grupo 2, com mosaicismos cromossômico, foi bem diversificada.

Em 6 participantes estava presente uma terceira linhagem celular, sendo que em 5 destas, a linhagem com 46 cromossomos possuía um cromossomo anômalo. Nas participantes 4Mos e 14Mos, ambas com cromossomo anômalo derivado do cromossomo Y, a linhagem adicional estava presente em mais de um tecido e apresentou proporção acima do *cut-off*. Estes resultados podem sugerir uma instabilidade mitótica dos cromossomos anômalos, originando células com novas constituições. Sheltzer e Amon, (2011), e, Wilhelm, Said e Naim, (2020) sugeriram que o estresse replicativo e erros mitóticos são as principais causas da instabilidade cromossômica (IC) numérica ou estrutural; o estresse replicativo pode produzir falhas no mecanismo mitótico, por conseguinte acarretar a aneuploidia, por outro lado a aneuploidia, procedente dos erros mitóticos, pode gerar estresse replicativo e danos ao DNA, como uma reação em cadeia. De acordo com LIEHR *et al.*, 2010, os sSMCs são instáveis, o que pode acarretar sua perda mitótica causando mosaicismos, além disso podem ocorrer novos rearranjos produzindo evolução do cariótipo.

Considerando a distribuição das diferentes linhagens celulares, Thunström *et al.* (2019) compararam o lado direito e esquerdo da cavidade oral em 20 mulheres com ST. Houve uma variação em torno de 38% na quantidade de células de cada linhagem.

Em nosso estudo, no grupo 2, observamos que 14/16 das participantes houve diferença na frequência das células de cada linhagem entre os diferentes tecidos avaliados (Quadros 4, 5 6 e7).

Nas 13 participantes com mosaicismos cromossômico e cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo X (Quadros 4 e 5), houve variação

acima de 10% entre as células 45,X e 46,XN em todas as participantes, sendo que na 15Mos foi acima de 50% entre os tecidos analisados. Em uma participante a 16Mos essa variação foi acima de 60% na quantidade de células comparando o SPxSU.

A comparação entre diferentes tecidos foi realizada por Graff *et al.* (2020), que determinou através da FISH a proporção de células 45,X presentes no sangue e na mucosa oral, numa coorte de 142 participantes com ST. Em 67,6% das participantes havia diferença significativa na quantidade de células 45,X, sendo que em aproximadamente 10% das participantes essa diferença foi superior a 50%.

Nossos resultados, portanto, concordam com os descritos por esses autores.

Todas as participantes do grupo 2, com cromossomo sexual íntegro ou anômalo originário do cromossomo Y (Quadros 6 e7), apresentaram uma variação significativa entre os tecidos, contudo na participante 9Mos essa variação foi acima de 90% na quantidade de células comparando o SPxSU, além disso essa participante apresentou monossomia do cromossomo X nas células do sedimento urinário. Além disso, duas participantes apresentaram uma terceira linhagem nos tecidos avaliados.

Na ST com mosaicismo observa-se uma correlação positiva entre a idade e a quantidade de células diplóides (CATALÁN; FALK; NORPPA, 2000; DENES *et al.*, 2015; MACHIELA *et al.*, 2016; ORTA *et al.*, 2021; VORSANOVA *et al.*, 2021). A composição dos tecidos é dinâmica, refletindo o momento em que a avaliação é realizada.

A perda dos cromossomos sexuais relacionada à idade é um fato bem estabelecido na literatura (FORSBERG; GISSELSON; DUMANSKI, 2017; ORTA *et al.*, 2021). Myado e Fukami (2019) sugeriram que a perda do cromossomo Y em mosaico pode estar associada a desordens do desenvolvimento sexual como também a ST. Na população normal, a perda de um cromossomo sexual acarretando a monossomia 45,X é considerada parte do processo normal de envelhecimento (CATALÁN; FALK; NORPPA, 2000; MACHIELA *et al.*, 2016). Um estudo de realizado durante 10 anos com 67 mulheres septuagenárias e octogenárias, revelou que 16% desenvolveram a inativação extrema do cromossomo X ocorrendo, portanto, uma mudança no padrão de inativação desse cromossomo (FROM *et al.*, 2021). Há evidências de seleção *in vivo* negativa para as células 45,X

e outras anomalias cromossômicas, com o aumento da idade em mulheres com ST(DENES *et al.*, 2015). No entanto, em nossa amostra, observamos uma variação significativa na quantidade de células 45,X e 46,XN também nas participantes mais novas. Admite-se que a presença de cromossomos anômalos pode ser uma possível razão para essas diferenças, ou ainda diferenças em relação ao segundo cromossomo sexual, derivado do X ou do Y (LIEHR, 2008; HOOK; WARBURTON, 2014; DENES *et al.*, 2015), logo é possível que essa variação observada seja decorrente da constituição cromossômica de cada linhagem.

### **7.3. CONSEQUÊNCIAS CELULARES DA MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO X**

A fidelidade na duplicação e segregação dos cromossomos é indispensável para a estabilidade do genoma e perpetuação da vida (JACKSON & BARTEK 2010)

Admite-se que o funcionamento celular alterado, que ocorre nas aneuploidias, possa impactar a morfogênese, quando é necessária a proliferação celular ativa em períodos críticos. As alterações no ciclo celular podem impactar a morfogênese adequada (ÁLVAREZ-NAVA; LANES, 2022).

O conhecimento adquirido evidencia a pouca adaptabilidade das aneuploidias constitucionais humanas, que são observadas, sobretudo em perdas gestacionais espontâneas de primeiro trimestre.

O ciclo celular é um processo refinado, altamente impactado por lesões e danos nos cromossomos e no DNA cromossômico. O repertório celular para detectar lesões do DNA é bastante sofisticado, capaz de sinalizar sua presença e acionar os processos de reparo (JACKSON; BARTEK 2010)

As anomalias cromossômicas são alterações de grande magnitude. Devemos considerar que as alterações cromossômicas, além do desequilíbrio genômico, interferem na mecânica da divisão celular, pois proporcionalmente significam uma mudança importante da matéria bruta do conteúdo celular.

Entre as aneuploidias humanas, as aneuploidias envolvendo os cromossomos sexuais são paradoxais. Na maioria das vezes não acarretam um impacto crítico na morfogênese, possibilitando uma vida adequada aos indivíduos, que muitas vezes não são diagnosticados. A principal repercussão destas

aneuploidias, e quanto ao desenvolvimento sexual e a capacidade reprodutiva. Por outro lado, contribuem com uma fração importante das perdas gestacionais espontâneas (9-15%) e natimortos (0,25%). Além disso, a monossomia do cromossomo X é a única monossomia que ocorre naturalmente em humanos (HOOK e WARBUTON, 2014)

Nos embriões 45,X, em razão da aneuploidia, o desenvolvimento, tamanho e função de diversos órgãos é impactado pela diminuição da quantidade de células durante períodos críticos da organogênese. Admite-se que os fenótipos relacionados ao crescimento na ST são mediados pelos efeitos da aneuploidia e da razão de turnover celular (ÁLVAREZ-NAVA; LANES, 2022). As células monossômicas apresentam um padrão de expressão gênica peculiar, influenciando até mesmo *loci* que não estão localizados no cromossomo X (SHARMA, 2015).

Estudos pioneiros foram realizados em culturas de fibroblastos cutâneos obtidas de diferentes indivíduos, comparando as diferenças no ciclo celular das entre os ciclos celulares de células aneuplóides (45,X), em relação a células das linhagens celulares com anomalias estruturais do cromossomo X, e células diplóides normais 46,XX e 46,XY, demonstraram que o ciclo celular das linhagens 45,X foi significativamente maior em comparação aos controles euplóides (SIMPSON; LE BEAU, 1981). A possível explicação seria uma fase S mais prolongada consequentemente, este período inter-mitótico mais longo nas células 45,X poderia acarretar uma diminuição na taxa de proliferação celular. Uma vez que essas células não conseguem proliferar a um ritmo normal, poderia ocorrer uma diminuição da sua quantidade durante a organogênese, podendo interferir em processos críticos do desenvolvimento. (SIMPSON; LE BEAU, 1981; ÁLVAREZ-NAVA; LANES, 2022).

São escassos os estudos que avaliaram a proliferação celular em células 45,X e outras anomalias dos cromossomos sexuais. O grupo 2 avaliado constitui, portanto, uma oportunidade ímpar de caracterizar de forma fidedigna as consequências celulares do desequilíbrio cromossômico.

Nos casos de mosaicismo considera-se que as linhagens celulares são isogênicas, diferindo apenas no cromossomo anômalo; além de apresentarem o mesmo background genético, foram expostas aos mesmos fatores endógenos e exógenos. Portanto, a avaliação da seleção *in vitro*, dinâmica de proliferação e instabilidade cromossômica pode ser bastante informativa sobre os efeitos celulares

dos desequilíbrios cromossômicos destas células (BORTOLAI; MELARAGNO, 2001, RAFFERTY *et al.*, 2021).

#### **7.4. SELEÇÃO *IN VITRO*, FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MONOSSÔMICAS DE ACORDO COM A DURAÇÃO DAS CULTURAS**

Um dos enfoques do nosso estudo foi averiguar a seleção *in vitro* das células com monossomia do cromossomo X. Para isso, nas participantes com mosaicismo cromossômico, a frequência de cada linhagem foi avaliada em culturas com duração progressiva.

Das dezessete participantes avaliadas, apenas duas apresentaram diminuição das células da linhagem 45,X: a participante 3Mos, com cromossomo em anel derivado do cromossomo X e a 6 Mos, com o sSMC derivado do cromossomo X ocorrendo diminuição das células monossômicas nas culturas mais prolongadas. Curioso que em ambas a linhagem com 46 cromossomos apresentava um cromossomo anômalo, e mesmo assim houve vantagem proliferativa em relação à linhagem 45,X

Esses resultados sugerem, portanto que não ocorreu seleção *in vitro*, nas amostras estudadas.

Bortolai e Melaragno (2001), avaliaram a dinâmica da proliferação celular em culturas de 48, 72 e 96 horas, em cinco pacientes com mosaicismo cromossômico, (dois com o cariótipo 47,XY,+21/46,XY, um com o cariótipo 47,XX,+21/46,XX, um com o cariótipo 45,X/46,XX e um com o cariótipo 47,XXY/46,XY. Este estudo também não observou diferenças significativas na proliferação das células em relação às células aneuploides e as células com complemento cromossômico normal do mesmo indivíduo.

Por outro lado, a análise inter-individual, agregando as linhagens de todas as participantes, também não mostrou diferenças significativas entre as linhagens 45,X e 46,XN nos diferentes períodos de cultura, sugerindo que são proliferativamente equiparadas.

Considerando as análises pareadas, uma vez que foram comparadas células isogênicas cocultivadas, este resultado pode ser mais fidedigno que a comparação de culturas celulares fibroblastos de indivíduos com diferenças genéticas.

Um estudo similar, em nosso laboratório, realizado por Freitas (2022), avaliou 13 pacientes com mosaicismos cromossômico, sendo 12 com uma linhagem com sSMS adicional, derivados de cromossomo autossomos; e 1 com sSMS complexo derivado dos cromossomos X e Y e uma linhagem 45,X. Em apenas uma das 13 amostras houve evidência de seleção *in vitro*, com diminuição significativa da quantidade de células anômalas com a maior duração do cultivo, tratava-se de um sSMC originário do cromossomo 8.

Na análise interamostral, a frequência de células anômalas foi maior nas culturas de 48hs, e a frequência de células normais foi maior na cultura de 96h sugerindo seleção *in vitro* das células anômalas (FREITAS, 2022).

No presente estudo, a análise interamostral não mostrou diferenças entre a quantidade de células 45,X e as células 46,XN com o tempo de cultivo. Portanto os desequilíbrios envolvendo cromossomos autossomos podem ser mais comprometedores do que os desequilíbrios envolvendo cromossomos sexuais.

O desequilíbrio genômico pode favorecer a seleção *in vitro* por vários processos. Além do ciclo celular mais prolongado, as células anômalas podem ter uma demanda nutricional diferenciada, limitando sua proliferação *in vitro*, ou ainda serem mais vulneráveis à morte celular.

É possível, que os desequilíbrios envolvendo cromossomos sexuais não confirmam diferenças importantes na proliferação e sobrevivência celular, não estando sujeitos ao processo de seleção.

## **7.5. ANÁLISE DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO (IP) NAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO**

A avaliação da proliferação celular *in vitro*, através da incorporação de BrdU possibilitou diferenciar células em primeira, segunda e terceira divisão celular, e calcular o índice de proliferação nas linhagens celulares das participantes.

A análise intra-amostral do IP não mostrou diferenças significativas entre as linhagens 45,X e 46,XN em nenhuma das 17 participantes avaliadas.

No estudo realizado por Bortolai e Melaragno (2001) também não houve diferença entre as linhagens 45,X e 46,XX de uma participante. Nossos achados, num número maior de amostras, corroboram os resultados deste estudo.

Outros estudos que avaliaram desequilíbrios cromossômicos diversos mostraram um efeito na proliferação celular.

O estudo de um paciente com Síndrome de Down (SD) e mosaicismo da trissomia 21 detectou diferenças significativas no IP entre as linhagens 46,XY e 47,XY,+21 ( $p < 0.01$ ) (Heidermann; Schmalenberger; Zankl 1983). O estudo de Freitas (2022) em indivíduos com cromossomos anômalos verificou que em 3/13 indivíduos que o índice de proliferação da linhagem anômala foi menor em relação ao índice de proliferação da linhagem normal, evidenciando maior velocidade de proliferação da linhagem normal em relação à linhagem anômala.

Novamente, sugerindo que a repercussão celular dos desequilíbrios de cromossomos autossomos pode ser mais importante do que os desequilíbrios de cromossomos sexuais.

No entanto a análise interamostral mostrou diferenças estatisticamente significativas na média dos valores do IP tanto nas células 45,X como nas 46,XN, como também entre as células 45,X e 46,XN. Entretanto, observamos que o valor do IP da linhagem 46,XN foi um pouco maior que o da linhagem 45,X, sugerindo que houve uma desvantagem proliferativa da linhagem 45,X em relação a linhagem 46,XN.

Como esta abordagem envolve células com background genético diverso, o significado desta diferença não pode ser esclarecido. Além disso, podem refletir a exposição a fatores ambientais diversos. Devemos considerar que muitas das participantes fazem ou fizeram uso de GH e estrogênios, o que pode influenciar a proliferação das células.

Enquanto as diferenças da abordagem interamostral são concordantes com estudos anteriores, que evidenciaram uma menor proliferação de células monossômicas, nos mostra que a interpretação de resultados experimentais deve ser analisada cuidadosamente.

Estes resultados demonstram a importância do desenho experimental, realizando estudo pareado em pessoas com mosaicismo, para esclarecer questões críticas.

Nossos resultados, no entanto, demonstraram que ocorreram diferenças na velocidade de proliferação na linhagem 45,X como também na linhagem 46,XN.

## 7.6. ANÁLISE DAS TCI NAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO

As TCI são bioindicadores da instabilidade cromossômica espontânea (BARALE *et al*, 1998), e são influenciadas tanto por fatores endógenos como fatores exógenos (SANTOVITO: GENDUSA: CERVELLA, 2017). A frequência aumentada de TCI está associada à instabilidade cromossômica (XU *et al.*, 2015; SALAWU *et al.*, 2018).

As TCI são consideradas manifestações citológicas da recombinação homóloga. Ocorrem naturalmente como eventos associados a replicação normal do DNA, sendo estimada a ocorrência de 3-4 trocas por célula por ciclo de replicação. Em células normais o aumento das TCI pode ser esperado como parte da resposta das células em divisão a agentes genotóxicos (WILSON; THOMPSON, 2007; PAYNE; HICKSON, 2009). Níveis elevados de TCI são características de células com defeito no reparo do DNA (THOMPSON & WILSON, 2007).

Nenhuma das amostras avaliadas neste estudo apresentou quantidade expressiva de TCI, sendo a média das TCI observadas similares ao considerado basal.

Considerando que nas amostras pareadas, as linhagens celulares possuem o mesmo *background* genético e foram expostas aos mesmos fatores exógenos, as diferenças observadas pode ser atribuída à constituição cromossômica distinta de cada linhagem, logo esse fato poderia ser uma possível razão para observar essas diferenças.

A análise pareada mostrou diferença significativa na quantidade de TCI entre as linhagens celulares em cinco participantes. Em três participantes (3Mos, 7Mos e 12Mos) a quantidade de TCI foi maior na linhagem como cromossomo anômalo em relação à linhagem 45,X. Em uma (2Mos) a quantidade de TCI foi maior nas células 45,X em relação às células 46,XX e na 4Mos a quantidade de TCI foi maior nas células 45,X em relação as células com sSMC derivado do cromossomo Y. Nas demais amostras, não houve diferença na quantidade de TCI entre as linhagens.

Uma vez que em nosso estudo a frequência de TCI foi comparada entre as linhagens isogênicas 45,X e 46,XN dos indivíduos com ST, a influência de fatores genéticos e ambientais pode ser desconsiderada..

A maior quantidade de TCI nas células com cromossomos estruturalmente anômalos evidencia a repercussão dos cromossomos anormais no ambiente celular, aumentando a instabilidade genômica. No entanto, se houve aumento da instabilidade não houve repercussão na proliferação celular, pois em nenhuma das amostras houve diferença no IP entre as linhagens.

O aumento espontâneo das TCI é observado na Síndrome de Bloom, a quantidade de TCI por células é cerca de 10x maior que nos indivíduos normais (WILSON; THOMPSON, 2007; PAYNE; HICKSON, 2009).

Observamos que nas amostras em que houve aumento na quantidade de TCI na linhagem com 46 cromossomos em relação à linhagem com 45 cromossomos, o segundo cromossomo sexual apresentava alteração estrutural, assim a presença da alteração estrutural do cromossomo pode influenciar a instabilidade da célula.

Por outro lado, a monossomia X parece não impactar a instabilidade genômica, e a ocorrência de TCI foi similar em ambas as linhagens em 12/17 participantes avaliadas.

Poucos estudos exploraram a instabilidade genômica em aneuploidias, apesar das limitações dos dados, foi sugerido que as células de pacientes com síndrome de Down, Edward, Turner e Patau podem ser cariotipicamente menos estáveis que células de indivíduos normais (POTAPOVA *et al*, 2013).

Considerando cromossomos estruturalmente anômalos, Butler (1981) comparou as frequências de TCI entre um grupo controle de 10 indivíduos e um indivíduo com translocação Y/Y, não observando diferenças.

No estudo recente realizado por Freitas (2022), as células anômalas, com sSMC, também apresentaram maior quantidade de TCI em relação às células normais em 10 das 13 amostras individuais pareadas.

Considerando a abordagem interamostral, a comparação da quantidade de TCI entre as linhagens 45,X e 46,XN mostrou diferenças estatisticamente significativas. Da mesma forma houve diferenças estatisticamente significativas entre as células 45,X em relação às células com constituição 46,XX; 46,Xr(X) e

46,X+mar(X); das células 46,XX em relação às células com constituição 46,Xr(X), 46,X+mar(Y) e 46,X+mar(X); e das células 46,Xr(X) em relação às células com constituição 46,XY e 46,X+i(Y) e a das células 46,X+mar(X) as células com constituição 46,X+i(Y). No entanto, nenhuma das amostras apresentou uma quantidade expressiva de TCIs na análise interamostral.

Entretanto, a análise interamostral considerando as médias das TCI não evidenciou diferenças significativas entre as células monossômicas, sendo detectada uma correlação fraca entre a quantidade média de TCI entre as células 45,X e a células 46,XN, logo não foi possível afirmar com segurança se houveram diferenças relevantes entre as diferentes constituições cromossômicas.

Ademais, alguns fatores como idade, fatores ambientais e genéticos ou o uso de hormônios como GH e o estrogênio podem influenciar a quantidade de TCI, o sexo parece ter um papel importante, já que as mulheres apresentaram níveis de TCI superiores aos homens (LANDI *et al*, 1999; SANTOVITO *et al*, 2017). Em nosso grupo amostral, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de TCI das participantes com idade acima dos 30 anos de idade.

Das quatro participantes com cromossomo íntegro ou anômalo derivados do cromossomo Y, apenas uma apresentou diferenças significativas na TCI entre as duas linhagens. A presença de material do cromossomo Y está associada a risco de desenvolvimento de gonodblastoma (BIANCO *et al.*, 2008; BISPO *et al.*, 2013; THUNSTRÖM *et al.*, 2019; KRIVEGA *et al.*, 2022; GRAVHOLT *et al.*, 2023).

Assim, nos genomas associados à predisposição ao desenvolvimento tumoral não houve aumento da instabilidade cromossômica. Outro estudo envolvendo mosaïcismo de uma anomalia cromossômica associada à predisposição ao retinoblastoma, del13q(14), não verificou aumento das TCI espontâneas e induzidas pela mitomicina C nas células com deleção em relação às células normais (Melaragno *et al*, 1988)

Os indivíduos com desordens do desenvolvimento sexual (DSD) como a ST podem apresentar instabilidade do genoma, tais como mosaïcismo genético com fenótipos altamente variáveis, causados por quebras no cromossomo Y, pela presença de cromossomos isodicêntricos (idic(Y)) ou pela distribuição do mosaïcismo no organismo. De acordo com as autoras, os indivíduos com ST cujas células apresentam taxas elevadas de dano na molécula do DNA e a expressão

alterada da proteína TP53, poderiam explicar a perda funcional ou total do cromossomo Y (KRIVEGA *et al.*, 2022). Contudo, a participante 4Mos não apresentou um aumento da quantidade de TCI na linhagem com o sSMC derivado do cromossomo Y.

## 7. 7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A avaliação citogenética e citogenética molecular em cromossomo anômalo em participantes com mosaïcismo cromossômico e síndrome de Turner é desafiadora, pois a frequência das linhagens minoritárias costumam ser muito baixas, necessitando-se analisar um grande número de metáfases.

A FISH possibilitou caracterizar a origem dos cromossomos anômalos, contudo é limitada para a avaliação precisa das regiões envolvidas, além disso, é uma técnica muito dispendiosa o que impossibilita sua utilização em um grupo amostral com muitos participantes.

Se por um lado a avaliação de células interfásicas sem necessidade de cultivo prévio ampliou a nossa capacidade analítica, a obtenção das amostras não foi óbvia. Muitas vezes o material coletado, como a mucosa oral e principalmente o sedimento urinário, apresentava bactérias, muco e debris celulares, sendo inadequado para o procedimento. Em algumas participantes foi necessária a realização de diversas coletas.

Além disso, mesmo com a maior parte dos protocolos laboratoriais disponíveis na literatura, houve necessidade de ajustes e padronização.

Ademais, todas as análises do presente estudo foram realizadas visualmente, exigindo treinamento técnico adequado e consumindo tempo.

Em relação ao comportamento das células, a avaliação longitudinal dos participantes contribuiria para confirmar os resultados obtidos, o que não foi possível realizar. Apesar do tamanho amostral, cada participante necessitou de 200 avaliações em cada tecido (no sangue sem cultivo, na mucosa oral e no sedimento urinário) pela técnica de FISH por participante, o que de certa forma limitou a entrada de mais participantes

## 7. 8. CONCLUSÃO

Este estudo se caracterizou por duas abordagens inovadoras: 1) a avaliação de núcleos interfásicos de células de diferentes origens embrionárias para a detecção/ caracterização mais abrangente do mosaicismos cromossômico; 2) comparação do comportamento das células monossômicas em relação às células isogênicas dissômicas num grupo de participantes com ST e mosaicismos cromossômico.

A avaliação conjunta de células sangue periférico, mucosa oral e sedimento urinário ampliaram a capacidade de detecção de linhagens celulares adicionais.

### 7.8.1 Participantes com monossomia 45,X

No grupo 1 (monossomia do cromossomo X) foi identificada uma segunda linhagem celular em 90% das participantes, sugerindo que o mosaicismos cromossômico pode estar presente na maior parte dos indivíduos com monossomia do cromossomo X.

### 7.8.2 Participantes com mosaicismos cromossômico

No grupo 2 (mosaicismos cromossômico), a análise pela FISH permitiu a determinação da origem cromossômica e caracterização das regiões envolvidas em todas as participantes que apresentaram cromossomos anômalos. 13/17 participantes apresentaram cromossomos estruturalmente anômalos, sendo 12 SMC e 1 cromossomo em anel. A presença do cromossomo Y foi caracterizada em 4 participantes.

Houve variabilidade na distribuição das linhagens 45,X e 46,XN entre os tecidos. A presença de uma terceira linhagem foi detectada em 6/17 participantes, 5 delas com alterações estruturais.

As células monossômicas não apresentaram diferenças em relação às células dissômicas isogênicas quanto aos parâmetros avaliados. As diferenças intra-individuais observadas podem ser atribuídas à presença de cromossomos estruturalmente anômalos.

A análise intra-amostral da seleção *in vitro* sugeriu que houve uma desvantagem proliferativa na linhagem 45,X em relação a linhagem 46,XN em duas participantes.

A análise interamostral do IP mostrou diferenças significativas nos valores médios entre as células 45,X e 46,XN, sendo estes dados discrepantes à avaliação intra-amostal.

A análise intra-amostal das TCI, mostrou diferenças significativas entre as linhagens 45,X e 46,XN em 30% das participantes

Nossos achados, não evidenciam a ocorrência de seleção *in vitro*, diferença na proliferação celular e aumento da instabilidade cromossômica nas células com monossomia do cromossomo X.

## **7.9. PRESPECTIVAS FUTURAS**

### **7.9.1 CIENTÍFICA**

Aumento do tamanho amostral para análise mais abrangente dos resultados.

### **7.9.2 ASSISTENCIAL**

Nos indivíduos com cariótipo 45,X pela citogenética tradicional (sangue periférico): sugerimos análise citomolecular (FISH; PCR) em outros tecidos de origem embrionária distinta (mucosa oral) para detecção de mosaicismo oculto, principalmente em relação ao cromossomo Y;

## 8. REFERÊNCIAS

ACOSTA AM;STEINMAN,SE; WHITE KK. Orthopedic Manifestations in Turner Syndrome. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 27, n. 23, p. e1021-e1028, 2019.

ALADJEM, M I e FU, H. A new light on DNA replication from inactive X chromosome. **Bioessays**, v. 36, n.6, p.:591-597. 2014

ALBRIGHT, F.; SMITH, P.H.; FRASER, R. A syndrome characterized by primary ovarian insufficiency and decreased stature: report of 11 cases, with a digression on hormonal control of axillary and pubic hair. **Am. J. Med. Sci.**, v. 204, n. 5, p 625-648. 1942.

ALLSHIRE, R C;MADHANI, H D. Ten principles of heterochromatin formation and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 19, n. 4, p. 229-244, 2018.

ÁLVAREZ-NAVA F, LANES R. Epigenetics in Turner syndrome. **Clin Epigenetics**,v. 10, p 45. 2018.

ÁLVAREZ-NAVA F, SOTO-QUINTANA M. The Hypothesis of the Prolonged Cell Cycle in Turner Syndrome. **J Dev Biol**,v. 10, n 2, p:16, 2022

ALVES, M. *et al.* Gonadal function in Turner syndrome. **Acta Med Port**, v. 26, n. 6, p. 655-63,. 2013.

ARAÚJO, C *et al.* Características clínicas e citogenéticas da síndrome de Turner na região Centro-Oeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n 8, p. ,381-385, 2010

ARSHAM, M. S.; BARCH, M. J.; LAWCE, H. J. (EDS.). **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017.

AUGOULEA, A; ZACHOU, G; LAMBRINOUDAKI, I Turner syndrome and osteoporosis. **Maturitas**, v. 130, p. 41-49, 2019.

BARALE, R. *et al.* Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution Of sex, age, and lifestyle. **Environ Mol Mutagen**, v. 31, n. 3, p. 228-242, 1998.

BARBOSA, L G *et al.* Recognition of the Y chromosome in Turner syndrome using peripheral blood or oral mucosa tissue. **Ann Pediatr Endocrinol Metab**, v.26. n. 4, p. 272-277, 2021.

BARNUM, K J &, O'CONNELL, M J. Cell Cycle Regulation By checkpoints. **Methods Mol Biol**, v. 1170, p. 29-40, 2014.

BARR, M. L. e BERTRAM, E. G. A morphological distinction between neurons of the male and female, and behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 676, 1949.

BARTELS, I. *et al.* Supernumerary small marker chromosome (SMC) and uniparental disomy 22 in a child with confined placental mosaicism trisomy 22: trisomy rescue due to marker chromosome formation. **Cytogenet Genome Res**, v. 101, n<sup>o</sup> 2, p. 103-105. 2003.

BASTIANS, H. Causes of Chromosomal Instability. **Recent Results Cancer Res**, v. 200, p. 95-113, 2015.

BAPTISTA, J. *et al.* Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocations carried by phenotypically normal individuals. **Eur J Hum Genet**, v. 13, n. 11, p. 1205–1212, 2005.

BAPTISTA, J. *et al.* Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. **Am J Hum Genet**, v. 82, n. 4, p. 927–936, 2008.

BERLETCH, J. B. *et al.* Genes that escape from X inactivation. **Human. Genetics**, v. 130, n. 2, p. 237-245, 2011.

BIANCO, B. *et al.* Clinical Implications Of The Detection Of Y-chromosome mosaicism in Turner's Syndrome: report of 3 cases. **FertilSteril**, v. 90, n. 4, p. 1197.e17-20, 2008.

BIANCO, B. *et al.* SRY gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or non tumoral gonadal lesions in Turner syndrome. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 28, p. 197–202. 2009

BIANCOTTI, J C *et al.* Human Embryonic Stem Cells as models for aneuploidy chromosomal syndromes. **Stem Cells**, v. 28, n. 9, p. 1530-1540. 2010

BISPO, A. V. *et al.* Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X Translocation case. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, n. 8, p. 1176-82, 2014.

BONDY, C.A. New Issues in the diagnosis and management of Turner Syndrome. **Rev Endocr Metab allis**, v.6, p.269-280. 2005.

BONDY, C.A. For the Turner syndrome Consensus studyGroup. Care Of Girls and womenwith Turner Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, p.10–25. 2007.

BORTOLAI, A.; MELARAGNO, M. I. Cell-cycle kinetics of cell lines from patients with chromosomal mosaicism. **Ann Genet**, v. 44, n. 2, p. 93–97, . 2001.

BUCERZAN, S *et al.* Clinical Genetic Characteristics in a group of 45 patients with Turner syndrome (monocentric study). **Ther Clin Risk Manag.** v. 13, p. 613-622, 2017.

BULLEJOS, M; KOOPMAN, P. Spatially dynamic expression of SRY in mouse genital ridges.**Dev. Dyn.**, v.221 n° 2 p.201-2015. 2001.

BUTLER, M G. Sister Chromatid Exchanges in a Male with a Y/Y Translocation.**Trans Nebr Acad Sci Affil Soc**, v. 9, p.9-11, 1981.

CALLEN, D F *et al.* Molecular cytogenetic characterization of a small ring X chromosome in a Turner patient and in a male patient with congenital abnormalities: role of X inactivation. **J Med Genet.**, v.32, p.113-116. 1995.

CAMERON-PIMBLETT, A *et al.* The Turner syndrome life course project: Karyotype-phenotype analyses across the lifespan. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 87, n. 5, p. 532-538, 2017.

CAMPBELL, I. M. *et al.* Somatic Mosaicism: Implications for Disease and TransmissionGenetics. **Trends Genet : TIG**, v. 31, n. 7, p. 382–392, 2015.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Differential Binding Of Alkylating Fluorochromes in human chromosomes. **Exp Cell Res**, v.60, p.315-219. 1970.

CATALÁN, J; FALK, G.C.M; NORPPA, H. The X chromosome frequently lags behind in female lymphocyte anaphase. **Am J Hum Genet**, v. 22, n. 2, p. 687-691, 2000.

CHEN, J *et al* Clinical characteristicsand management of Turner patients with a small supernumerary marker chromosome. **Gynecol Endocrinol**, v. 37, n. 8, p. 730-734, 2021.

CHU, C.E. *et al.*(1994) Possible role of imprinting in the Turner phenotype. **J Med Genet**, v. 31 p. 840–842. 1994.

CORBITT H, *et al.* TIMP3 and TIMP1 are risk genes for bicuspid aortic valve and aortopathy in Turner syndrome. **PLoS Genet**, v. 14, n. 10, p 1-19, 2018.

CUI, X *et al.* A basic understanding of Turner syndrome: Incidence, complications, diagnosis, and treatment. **Intractable Rare Dis Res**, v. 7, n. 4, p. 223-228, 2018.

DAFA, E *et al.* Enhancement of Sister Chromatid Exchanges (SCEs) in Peripheral Blood Lymphocytes of Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) *in Vitro*. **Open J Obstet Gynecol**, v.5, p. 378-384, 2015.

DALPRA, L. *et al.* Cytogenetic And molecular evaluation of 241 small supernumerary marker chromosomes: Cooperative Study Of 19 Italian laboratories. **Genet Med**, v. 7, n. 9, p.620-625. 2005

DAVIS, S M; GEFFNER, M E. Cardiometabolic Health in Turner syndrome. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, v. 181, n. 1, p. 52-58, 2019.

DAVENPORT, M.L. Approach to the patient with Turner Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.95, p.1487-1495. 2010.

DENES, A. M. *et al.* The proportion of diploid 46,XX cell increases with time in women with Turner syndrome--a 10-year follow-up study. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 19, n. 2, p. 82-87, 2015.

DE, S. Somatic Mosaicism in healthy human tissues. **Trends Genet: TIG**, v. 27, n. 6, p. 217-223, 2011.

DECOURT, L. *et al.* Turner syndrome: presentation of four cases. **Rev Paul Med**, v. 45, n. 2, p. 251-64, 1954.

DEVERNAY, M. *et al.* Parental Origin of the X-chromosome Does Not Influence Growth Hormone Treatment Effect in Turner Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 97, p.1241-1248, 2012.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, R. *et al.* Analysis Of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of 'hidden' mosaicism. **Clin Genet**, v. 58, n. 3, p. 201-8, 2000.

FORD, C. E. *et al.* A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). **Lancet**, v. 1, n. 7075, p. 711-3, 1959.

FORSBERG, L.A.; GISSELSSON, D.; DUMANSKI, J.P. Mosaicism in health and disease - clones picking up speed. **Nat Rev Genet**, v. 18, n. 2, p. 128-142, 2017.

FRERIKS, K. *et al.* Buccal cell FISH and blood PCR-Y detect high rates of X chromosomal mosaicism and Y chromosomal derivatives in patients with Turner syndrome. **Eur J Med Genet**, v. 56, n. 9, p. 497-501, 2013.

FREITAS, M. O. **CARACTERIZAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO, ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL, HERDABILIDADE E ESTABILIDADE DE CROMOSSOMOS MARCADORES**. 166f Tese (doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

FUKAMI, M.; SEKI, A.; OGATA, T. *Shox* haploinsufficiency as a cause of syndromic nonsyndromic short stature. **Mol. Syndromol.**, v. 7, p. 3-11. 2016.

FUNKE: Pterygium coli, **Deutsch Z Chir**, v. 63, p.162, 1902

GAO, SW; LIU F. Review: Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. **J Zhejiang UnivSci B**, v. 20, n. 6, p. 467-475, 2019.

GEIGL, J. B. *et al.* Defining chromosomal instability'. **Trends Genet** v. 24, n. 2, p. 64-69, 2008.

GERMAN, J.; ALHADEFF, B. Analysis Of Sister-chromatid exchanges. **Curr Protoc Hum Genet**, v. Chapter 8, p. Unit 8.6, 2001.

GLEICHER, N *et al.* The uncertain science of preimplantation and prenatal genetic testing. **Nat Med**, v. 28, n. 3, p.442-444, 2022

GONZALEZ, L e WITCHEL, S.F. The patient with Turner syndrome: puberty and medical management concerns. **Fertil Steril**, v.98, n. 4, p .780-786,.2012.

GRAVHOLT, C. H. A *et al.* Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. **Eur J Endocrinol**, v. 177, n. 3, p. G1-G70, 2017.

GRAVHOLT, C. H. *et al.* Turner syndrome: mechanisms and management. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 15, n. 10, p. 601-614, 2019.

GRAVHOLT, C. H. *et al.* The Changing Face of Turner Syndrome. **Endocr Rev**,v. 44, n. 1, p. 33-69,2023.

GUIMARÃES, M.M. *et al.* Intercorrências Clínicas na Síndrome de Turner. **Arq Bras Endocrinol Metab**,v. 45, n. 4, p.331-338, 2001.

HALL, H; HUNT, P; HASSOLD, T. Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. **Curr Opin Genet Dev**, v. 16, n.3, p. 323-329, 2006.

HANSON, L. *et al.* Genetic Analysis Of Mosaicism in 53 women with Turner Syndrome. **Heredities**, v.1374, p.153-159 2001.

HASSOLD, T; .BENHAM, F.; LEPPERT, M. Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. **Am J Hum Genet**, v. 42, n. 4, p. 534-41, 1988.

HELD, K. R. *et al.* Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? **Hum Genet**, v. 88, n. 3, p. 288-94, 1992.

HEIDEMANN A, SCHMALENBERGER B, ZANKL H. Sister chromatid exchange and lymphocyte proliferation in a Down syndrome mosaic. **Clin Genet**, v. 23, n. 2, p. 139-142. 1983.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der Moose. **Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik**, v.69, p. 762–818, 1928.

HOLLAND, A J; CLEVELAND, D W. Boveri Revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 7, p 478–87, 2009.

HOOK, E. B.; WARBURTON, D. The distribution of chromosomal genotype associated with Turner's syndrome: live birth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. **Hum Genet**, v. 64, n. 1, p. 24-7, 1983.

\_\_\_\_\_. Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. **Hum Genet**, v. 133, n. 4, p. 417-24, 2014.

HEUVEL, S Cell-cycleregulation. **Worm Book**, v. 21, p. 1-16, 2005.

IOUROV, I.Y.; VORSANOVA, S.G.; YUROV, Y.B. Chromosomal Mosaicism Goes global. **Mol Cytogenet**, v. 1, n. 26, p. 1-7, 2008.

IOUROV, I. Y; VORSANOVA, S. G; YOUROV, Y. B. SomaticGenomeVariations in Health and Disease. **CurrGenomics**, v.11, p. 387-396, 2010.

IOUROV, I. Y. *et al.* Ontogenetic and Pathogenetic View on Somatic Chromosomal Mosaicism. **Genes**, v. 10, n. 5, p. 379, 2019.

**ISCN:An International System for Human Cytogenetics Nomenclature: BirthDefects. J. McGowan-Jordan, A. Simons, M.Schmid (eds); S. Karger, New York. [s.l: s.n.]**

IZAWA, D e PINES, J. The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C. **Nature**, v 217, n 7536, p 631-634, 2015.

JACOBS, P. *et al.* Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. **Ann Hum Genet**,v. 61, n. Pt 6, p. 471-83, 1997.

JÄGER, N, *et al.* Hypermethylation of the Inactive X chromosome is a frequent event in cancer. **Cell**, v. 155, n. 3, p.:567-581, 2013

JUNG M DE, P. *et al.* Revisiting establishments of the etiology of Turner syndrome. **Hist Cienc Saude Manguinhos**,v. 16, n. 2, p. 361-76, 2009.

KALKAN, R.*et al.* A unique mosaic Turner syndrome patient with androgen receptor gene derived marker chromosome. **Syst. Biol. Reprod. Med.**, v. 62, nº 1, p. 77-83. 2016.

KASTAN MB, BARTEK J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–23, 2004.

KILINC, S; YILDIZ, M; GUVEN, A. Associated clinical abnormalities among patients with Turner syndrome. **North Clint Istamb**, v 7, n 3, p 226-230, 2020.

KOREN, A. DNA replication timing: Coordinating genome stability with genomeregulationonthe X chromosome and beyond. **Bioessays**, v. 36, n. 10, p. 997-1004, 2014.

KORENBERG, J. R.; FREEDLANDER, E. F. Giemsa Technique for the detection of sister chromatid exchanges. **Chromosoma**, v. 48, n. 4, p. 355–360, 1974.

KRIVEGA, M *et al.* Genomic Instability in individuals with sex determination defects and germ cell cancer. **Cell Death Discov**, v. 9, n. 1, p. 173, 2023

LARA-GONZALEZ, P; WESTHORPE, F G; TAYLOR, S S. The spindle assembly checkpoint. **Current biology: CB**, v. 22, n. 22, p.R966-80,. 2012.

LANDI, S *et al.* Spontaneous sister chromatid exchange and chromosome aberration frequency in humans: the familial effect. **Mutat Res**, v. 444, n. 2, p. 337-3451999.

LARANJEIRA, C; CARDOSO, H; BORGES, T. Síndrome de Turner. **Acta Pediatr Port.**, v. 41, nº1, p. 38-43, 2010.

LARNEY, C.; BAILEY,T.L.KOOPMAN,P. Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene *SRY*. **Development.**, v. 141, nº11, p. 2195-2205. 2014.

LAURIE, C.C. *et al.* Detectable clonal mosaicismfrombirthtoold age and its relationship tocancer. **Nat Genet**, v. 44, n. 6, p. 642-650, 2012.

LEE, H.J., *et al.* No influence of parental origin of intact X chromosome and/or Y chromosome sequences three-yearheight response to growth hormone therapy in Turner syndrome. **Ann Pediatric Endocrinol Metab**, v.19, n. 3, p:127-134, 2014.

LEE, Y L; WU, LL. Clinical Features Of Girls with Turner Syndrome in a Single Centre in Malaysia. **J ASEAN Fed Endocr Soc**, v. 34, n. 1, p. 22-28, 2019.

LEE, J. T.; LU, N. Targeted mutagenesis of *Tsix* leads to nonrandom X inactivation. **Cell**, v. 99, p 47–57.1999

LEPAGE , J.F. *et al* Genomic Imprinting Effects in Cognitive and Social Abilities in Prepubertal Girls with Turner Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, p.460-46, 2012.

LEPPIG, K. A.; DISTECHE, C. M. Ring X and other structural X chromosome abnormalities: X inactivation and phenotype. **Semin Med Reprod**, v. 19 n. 2, p. 147-157, 2001.

LI, X. *et al*. Chromosome size in diploid eukaryotic species centers on the average length with a conserved boundary. **Mol Biol Evol**, v. 28, n. 6, p. 1901-1911, 2011.

LIEHR, T. *et al*. Molecular-cytogenetic characterization of the origin and the origin and the presence of pericentromeric euchromatin on minute supernumerary marker chromosomes (SMCs). **Chromosome Res**, v. 12, n. 3, p. 239-44, 2004.

LIEHR, T. *et al*. Small Supernumerary Marker Chromosomes Progress Towards a genotype-phenotype correlation. **Cytogenet Genome Res**, v. 112, p.23–34. 2006.

LIEHR, T. *et al*. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in patients with a 45,X/46,X,+mar cerotype - 17 new cases and a review of the literature. **Sex Dev.**, v. 1, p 353-362 2007.

LIEHR, T. *et al*. Somatic mosaicism in cases with small supernumerary marker chromosomes. **Curr Genomics**, v. 11, n. 6, p. 432–9, set. 2010.

LIEHR, T. Small Supernumerary MarkerChromosomes (sSMC):A Guide for Human GeneticistsandClinicians. 1<sup>a</sup> ed, **Springer Heidelberg Dordrecht London New York**, 2012

LIEHR, T *et al*. Clinical impact of somatic mosaicism in cases with small supernumerary marker chromosomes **Cytogenet Genome Res**, n. 139, p.158-163,. 2013.

LIU, J.; ALI, M.; ZHOU, Q. Establishment and evolution of heterochromatin. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1476, n. 1, p. 59-77, 2020.

LÓPEZ, M. *et al*. Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. **Am J Med Genet**, v. 76, n. 2, p. 120-4, 1998.

LUO *et al*. Characterization of a rare mosaic X ring chromosome in a patient with Turner syndrome. **Mol Cytogenet**, v., n1, p:1-6, 2022

McCARRISON , S *et al*. A. The prevalence of hypertension in pediatric Turner syndrome: a systematic review and meta-analysis. **J Hum Hypertens**,

v. 37, n. 8 , p. 675-688., 2023

MACHIELA, M.J. *et al.* Female chromosome X mosaicism is age-related and preferentially affects the inactivated X chromosome. *.v. 71, n. 11843, p. 1-9, 2016.*

de MARQUI, A. B.;da SILVA-GRECCO, R.L,BALARIN, M. Prevalence of Y-chromosome sequences and gonadoblastoma in Turner syndrome. **Rev Paul Pediatr.**, v. 34, nº 1, p. 114-121. 2016.

MARZUKI, N. S. *et al.* Diversity of sex chromosome abnormalities in a cohort of 95 Indonesian Patients With Monosomy X. **Mol Cytogenet**, v. 4, p. 23, 2011.

MASCARELLO, J. T. *et al.* Section E9 of the American College Of Medical Genetics Technical standards and guidelines: Fluorescence in situ hybridization. **Genet Med**, v. 13, n. 7, p. 667–675, 2011.

MAZZASCHI, R *et al.* A Turner Syndrome Patient Carrying a Mosaic Distal X chromosome Marker. **Case Rep Gene**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

MIGUEL *et al.* Fatores associados a atraso no diagnóstico da síndrome de Turner. **Rev Paul Pediatr**, v. 29, n. 1, p. 67-72. 2011.

MONDAL S, *et al.* Karyotype-Phenotype Correlation in Turner Syndrome at a Single Center in Eastern India. **Indian Pediatr**, v.58, n. 1, p. 34-37. 2021.

MOORHEAD, P. S. *et al.* Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res**, v. 20, p. 613-6, Sep 1960.

McCONNELL, M.J. *et al.* Mosaic Copy Number Variation in human neurons. **Science**, v. 342, p. 632-637,. 2013.

MELARAGNO, M.I. *et al.* Sister chromatid exchange frequency in a retinoblastoma mosaic patient with del(13). **Cancer Genet Cytogenetic**, v. 32, p.177-181, 1988.

MENDES, J. R. *et al.* Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 50, n. 1, p. 19-26, 1999.

differences in disease. **Genet Med**, v.4, nº 2, p.97-105. 2007.

MILLER, D.T. *et al.* Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **Am J Hum Genet**, v. 86, n. 5, p. 749-764, 2010.

MONDAL, S *et al.* Karyotype-Phenotype Correlation in Turner Syndrome at a Single Center in Eastern India. **Indian Pediatr**, v. 58, n. 1, p. 34-37, 2021.

MONKHOST, K. *et al.* X. Inactivation Counting And Choice Is a stochastic process: evidence for involvement of an X-linked activator. **Cell**, v. 32, nº3, p.410-21. 2008.

MOORHEAD, P *Set al.* Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res**, v.20, p.613-616, 1960.

MUSACCHIO, A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. **Curr Biol**, v. 25, n.22, p R1002-R1018, 2015.

MURRAY, A. W. Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. **Cell**, v. 116, n. 2, p 221-234, 2004.

NAZARENKO, S A; TIMOSHEVSKY, V. A.; SUKHANOVA, N. N. High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients. **Clin Genet**, v. 56, n. 1, p. 59-65, 1999.

NUSSBAUM, R *Let al.*, **Thompso&Thompson, genética médica**.8ªed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2016.

NELSON, D.L.;COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 7ª ed, W.H. Freeman, New York, 2017.

VOET, D; VOET, JG. **Biochemistry**.4ª ed. Wiley, New York, 2011.

NEWMAN, D L; THURGOOD, L A; GREGORY, S L. The impact of aneuploidy on cellular homeostasis. **Free Radic Res**, v. 53, n 7, p. 705-713, 2019.

NITTA, M *et al.* Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. **Oncogene**, v. 23, n. 39, p 6548–58, 2004.

NOORDMAN, I D *et al.* Cardiac Abnormalities in girls with Turner syndrome: ECG abnormalities, myocardial strain imaging, and karyotype-phenotype associations. **Am J Med Genet A**, v 185, n 8, p. 2399-2408, 2021.

OGATA, T; MATSUO, N Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in development of clinical features. **Hum Genet**, v.95, p.607-629, 1995.

OLIVEIRA, R. M. *et al.* Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. **Sao Paulo Med J**, v. 127, n. 6, p. 373-8, 2009.

ONAL, H.; ADAL, E.; ERSEN, A. *et al.* Turner syndrome with a ring X chromosome and atypical atypical skin manifestation: portwine stain. **Int J Dermatol** v. 51, nº 2, p. :207-210. 2012.

ORTA *et al.* Rats Exhibit age-related mosaic loss of chromosome Y. **Commun Biol**, v. 4, n1, p.1418, 2021.

PARIENTE, N. A balancing act: focus aneuploidy. **EMBO Rep**, v. 13, n. 6, p 472, 2012.

PAWAR, A. C.; NAIK, S. J. K.; KUMARI, S. A. CYTOGENETIC ANALYSIS OF HUMAN LYMPHOCYTES OF FLUOROSIS-AFFECTED MEN FROM THE ENDEMIC FLUOROSIS REGION IN NALGONDA DISTRICT OF ANDHRA PRADESH, INDIA. **Fluoride**, v. 47, n. 1, p. 78–84, 2014.

PAYNE, M.; HICKSON, I.D. Genomic Instability And Cancer: lessons from analysis of Bloom's syndrome. **BiochemSoc Trans**, v. 37 (Pt3), p. 553-559, 2009.

PERRY, P. e WOLFF, S. New Giemsa Method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, v. 251, n. 5471, p. 156-158,. 1974.

PINSKER, J E Clinical review: Turner syndrome: updating the paradigm of clinical care. **J Clin Endocrinol Metab** v. 97, n. 6, p. E994-1003, 2012.

POON, R. Y. C. CellCycleControl: A System of Interlinking Oscillators. **Methods Mol Biol**, v. 1342, p. 3–19, 2016.

POTAPOVA, T. A.; ZHU, J.; LI, R. Aneuploidy and Chromosomal Instability: a viciouscycledrivingcellularrevolutionandcancergenomechaos. **Cancer and Metastasis Rev**, v. 32, n. 3–4, p. 377–389, 2013.

PREMI, S. *et al.* Startling mosaicism of the Y-chromosome and tandem duplication of the SRY and DAZ genes in patients with Turner Syndrome. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. e 3796, 2008.

PRIVETTE, L. M.; PETTY, E. M. CHFR: A Novel Mitotic Checkpoint Protein and Regulator of Tumorigenesis. **TranslOncol**, v. 1, n. 2, p 57-64, 2008.

POLANI, P.E.; HUNTER, W.F.; LENNOX, B. Chromosomal sex in Turner 's Syndrome with coarctation of the aorta. **Lancet**,v.2, p.120–121. 1954

RADONOVA , L; SVOBODOVA, T; ANGER, M. Regulation Of The Cell Cycle in early mammalian embryos and its clinical implications. **Int. J. Dev. Biol**, v. 63, n. 3-4-5, p.113 – 122, 2019.

RAFFERTY, K *et al.* Trisomy 21-associated increases in chromosomal instability are unmasked by comparing isogenic trisomic/disomic leukocytes from people with mosaic Down syndrome. **PLoS One**, v16, n.7, p:e0254806. 2021.

RASOULI, M *et al.* Mosaic Turner Syndrome Presenting with 46,XY Karyotype. **Case Rep Obstet Gynecol**, v. 37, p1-3. 2019.

RAO, E. *et al.* Pseudoautosomal Deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. **Nat. Genet**, v. 16 n. 1 p.54-63. 1997.

REDEL, J M; BACKELJAUW, P F Turner Syndrome: Diagnostic And Management Considerations for Perinatal Clinicians. **Clin Perinatol**, v 45, n 1, p 119-128, 2018.

RIBEIRO, M.C.M; MELARAGNO, M.I.A modified R-banding technique. **Rev. Bras Genet**, v. 10, p. 777-780, 1987.

ROBINSON, W. P *et al.* Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection, **Am J Hum Genet**, v. 56, n. 2, p. 444-451, 1995.

ROSS, M. T. *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. **Nature**, v. 434, n. 7031, p. 325-37, 2005.

SALAWU, A. *et al.* Sister Chromatid Exchange and Genomic Instability in Soft Tissue Sarcomas: Potential Implications for Response to DNA-Damaging Treatments. **Sarcoma**, 3082526. 2018.

SANSREGRET, L.; VAN HAESBROECK, B.; SWANTON, C. Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 15, n. 3, p. 139–150, 2018.

SANTOVITO, A.; GENDUSA, C.; CERVELLA, P. Evaluation Of baseline frequency of sister chromatid exchanges in an Italian population according to age, sex, smoking habits, and gene polymorphisms. **Am J Hum Biol**, v. 29, n. 6, p. e23034, 2017.

SCHUKKEN, K M; FOIJER, F CIN and Aneuploidy: Different Concepts, Different Consequences. **Bioessays**, v. 40, n. 1, p. 1-9, 2017.

SINAI, M I T; KEREM, B. DNA replication stress drives fragile site instability. **Mutat Res**, v. 808, p. 56-61, 2018.

SIMPSON, J.L.; LE BEAU, M.M. Gonadal and statural determinants on the X chromosome and relationship to in vitro studies showing prolonged cell cycles in 45,X; 46,X,del(X)(p11); 46,X,del(X)(q13); and 46,X,del(X)(q22) fibroblasts. **Am. J. Obstet Gynecol**, v. 141, p. 930–940, 1981.

SCHAFFER, K A. The cell cycle: a review. **Vet Pathol**, v. 35, n.6, p. 461-478. 1998.

SHARMA, A. *et al.* DNA methylation signature in peripheral blood reveals distinct characteristics of human X chromosome numerical aberrations. **Clin Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 76, 2015.

SHELTZER, J M e AMON, A. The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype. **Trends Genet**, v. 27, n. 11, p. 446-453. 2011

SKUSE, D. *et al.* Evidence from Turner's syndrome an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 705-708, j 1997.

SKUSE, D; PRINTZLAU, F; WOLSTENCROFT, J Sex chromosome aneuploidies. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 147, p. 355-376, 2018.

SPINNER, N. B.; CONLIN, L. K. Mosaicism And Clinical Genetics. **Am J Med Genet Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 166, n. 4, p. 397–405, 2014.

SYBERT, V.P. Cardiovascular malformations and complications in Turner syndrome. **Pediatrics**, nº 101. v. 1 p. 1-7. 1998.

SYBERT, V.P; McCAULEY, E. Turner's syndrome. **N Engl J Med**. v. 351, n. 12, p. 1227-1238, 2004.

TAYLOR, T H *et al.* The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 4, p. 571-581, 2014.

TERAOKA, M *et al.* 45,X/46,X,idic(Yq) mosaicism: clinical, cytogenetic, and molecular studies in four individuals. **Am J Med Genet**, v. 78, n. 5, p. 424-428, 1998.

THERMAN, E; SUSMAN, M. **Cromossomos Humanos**. 3a ed. Ribeirão Preto: Revista Brasileira De Genética, 1996.

THOMPSON, S L; BAKHOUM, S F; Compton, D A Mechanisms Of Chromosomal Instability. **Curr Biol**, v. 20, n. 6, p. R285-295, 2010.

THUNSTRÖM, S. *et al.* Side Differences in degree of mosaicism of buccal mucosa in Turner syndrome. **Mol Genet Genomic Med**, v.7, n. 10, p.1-5,. 2019.

TICE, R,R.; HOLLAENDER, A. (EDS.) **Sister Chromatid Exchanges**. Plenum, New York, USA, 1984.

TOMKINS, D.J.*et al.* Lack of expression of XIST from a small ring X chromosome containing the XIST locus in a girl with short stature, facial dysmorphism and developmental delay. **Eur. J Hum Genet**, v.10, n. 1, p.:44-51, 2002.

TROLLE, C *et al.* Widespread DNA hypomethylation and differential gene expression in Turner syndrome. **Sci. Rep**. v. 6, p. 34220, 2016.

TUKE, M A *et al* Mosaic Turner syndrome shows reduced penetrance in an adult population study. **Genet Med**, v. 21, n. 4, p. :877-886. 2018

TURNER, H.H. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. **Endocrinology**, n°23, p. 566-574, 1938.

ULRICH, O. Turner's syndrome and status bonnevie-ullrich; A synthesis of animal phenogenetics and clinical observations on a typical complex of developmental anomalies. **Am J Hum Genet.** v. 1, n. 2, p.179-202, 1949.

VENTURA, E; GIORDANO, A Cell Cycle. **Reference Module in Life Sciences**, p. 1-11, 2019.

VORSANOVA, S G *et al*. Turner's Syndrome Mosaicism in girls with neurodevelopment disorders: a cohort study and hypothesis. **Mol Cytogenet**, v. 14, n. 1, P. 1-9. 2021.

WANG, H. *et al*. The clinical analysis of small supernumerary marker chromosomes in 17 children with mos 45,X/46,X,+mar karyotype. **Oncol. Lett.** v.13, n°6, p. 4385–4389. 2017.

WENZEL, E S; SINGH, A T K. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy in the Path to Cancer. **In Vivo**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2018.

WILHELM, T; SAID, M; NAIM, V DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons. **Genes (Basel)**, v. 11, n. 6, p. 1-34, jun 2020.

WILKINS, L & FLEISCHMANN, W, Ovarian Agenesis: Pathology, Associated Clinical Symptoms and Bearing the Theories of Sex Differentiation, **J Clin Endocrinol Metab**, v., n. 8, p. 357-375, 1944.

WILSON, D.M. 3rd;. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. **Mutat Res**, v. 616, n. 1-2, p. 11-23,. 2006.

WOLFF, D.J. *et al*. Small Marker X chromosomes lack the X inactivation Center: implications for karyotype/phenotype correlations. **Am. J. Hum. Genet**, n°55, p.87-95. 1994

WU, C; SUN, Z. X chromosome abnormal inactivation: a unique factor for women's disease? **Epigenomics.**, v. 8, n. 4, p.447-450, abr. 2016.

XU *et. al* .Association between sister chromatid exchange in double minute chromosomes in human tumor cells. **Cytogenet**, v. 2, n 91, p.1-6, 2015.

YOSHIDA, T. *et al.* Aneuploid rescue precedes X-chromosome activation and increases the incidence of its skewness by reducing the size of the embryonic progenitor cell pool. **Hum Reprod**, v. 34, n. 9, p. 1762–1769, 2019.

YOUSSEFIAN H e PYERITZ, R.E. Mechanisms And Consequences Of Somatic Mosaicism in humans. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 10, p. 748-758, 2002.

ZHU, J. *et al.* Cellular Stress Associated with Aneuploidy. **Dev Cell**, v. 44, n. 4, p. 420–431, 2018.

**APÊNDICE 1: TERMO DE ASSENTIMENTO E LIVRE ESCLARECIMENTO**

**TÍTULO:** “AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO E DINÂMICA DE REPLICAÇÃO EM POPULAÇÕES CELULARES EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER E MOSAICISMO CROMOSSÔMICO”

**Local:** Serviço de Genética Médica do IPPMG / Ambulatório de Endocrinologia do IPPMG/ Laboratório de Genética do IPPMG

**Nome dos Investigadores:** Márcia Gonçalves Ribeiro, Maria Cecilia Menks Ribeiro, Marília Martins Guimarães, Miriam Beatriz Goulart, Sandra Alves Peixoto Pellegrini

Você/ sua filha, está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa. Antes de decidir se participará é importante que você entenda porque o estudo está sendo feito e o que ele envolverá. Reserve um tempo para ler cuidadosamente as informações a seguir e discuta-as com as pessoas e seu médico se desejar. Faça as perguntas se algo não estiver claro ou se quiser mais informações. Não tenha pressa de decidir se você/sua filha, deseja ou não participar deste estudo.

A pesquisa consiste na avaliação da distribuição e dinâmica de replicação das populações celulares na Síndrome de Turner, será realizada em pacientes com cariótipo 45,X ou mosaicismos cromossômicos com uma linhagem 45,X e outra linhagem com células normais ou com alteração cromossômica. Neste estudo além do sangue serão avaliadas células da mucosa oral e do sedimento urinário. Também será estudada a velocidade de replicação das células. Com isso podemos aprofundar nosso conhecimento sobre a Síndrome de Turner, possibilitando aperfeiçoar os exames realizados para diagnóstico.

Você/ sua filha, foi escolhida por apresentar Síndrome de Turner. Você /sua filha decide se gostaria de participar ou não deste estudo. Se decidir participar receberá esta folha de informações para guardar e deverá assinar um termo de consentimento. Mesmo se decidir participar/ deixar sua filha participar, você ainda tem a liberdade de sair do estudo a qualquer momento e sem dar justificativa. Isso não afetará o padrão de cuidados que você/ sua filha receberá.

Só será necessária a obtenção de 5 ml de sangue. Esta quantidade de sangue não traz prejuízo nenhum para a saúde. Pode ocorrer incômodo na hora da entrada da agulha para a coleta do sangue e também existe a possibilidade de ficar uma mancha roxa no local da coleta de sangue. Caso aconteça, será orientada em relação aos cuidados necessários. Também faremos fotografias sem identificar.

Além disso, serão colhidas amostras de urina e de saliva. A obtenção destas amostras não traz nenhum incômodo ou risco.

Não existem efeitos colaterais ao participar do estudo e isto que está sendo feito tem o benefício de aprofundar o conhecimento sobre problema seu/da sua filha, e mostrar para outros profissionais que trabalham na área da saúde

Este estudo foi revisado pelo seguinte Comitê de Ética em Pesquisa:

Nome: Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira

Endereço: Rua Bruno Lobo 50, Ilha do Fundão–Cidade Universitária–Rio de Janeiro– RJ.

E recebeu parecer favorável na reunião realizada em: \_\_\_\_\_

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável. Se você precisar de informações adicionais sobre a participação no estudo, sobre os direitos de seu (a) filho (a) ou sobre possíveis efeitos colaterais, ligue para o médico:

Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup>: Márcia Gonçalves Ribeiro

Em: Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira / Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Telefone: 21 3938-4700

Ou

Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Maria Cecilia Menks Ribeiro

Em: Laboratório de Genética do IPPMG; Universidade Federal do Rio de Janeiro

Telefone: 21 98766-2214

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira/Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rua Bruno Lobo, 50/terceiro andar, Cidade Universitária/Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, pelo telefone (21)3938-4916 de segunda à sexta-feira das 8 às 15h.

É garantida a liberdade de não querer participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Nenhum incentivo ou recompensa financeira está previsto pela participação de seu(a) filho(a) neste estudo de pesquisa laboratorial / clínico.

---

Nome da paciente/ Nome dos pais ou responsáveis legais:

---

**Assinatura:**\_\_\_\_\_ **Data:**\_\_\_\_\_

Nome da pessoa que obteve o consentimento:

---

**Assinatura:**\_\_\_\_\_ **Data:**\_\_\_\_\_

Observação: Duas cópias devem ser feitas: uma para o paciente e outra para o pesquisador.

## APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TÍTULO:** “AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO E DINÂMICA DE REPLICAÇÃO EM POPULAÇÕES CELULARES EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER E MOSAICISMO CROMOSSÔMICO”

**Local:** Serviço de Genética Médica do IPPMG / Ambulatório de Endocrinologia do IPPMG/ Laboratório de Genética do IPPMG

**Nome dos Investigadores:** Márcia Gonçalves Ribeiro, Maria Cecília Menks Ribeiro, Marília Martins Guimarães, Miriam Beatriz Goulart, Sandra Alves Peixoto Pellegrini

### Dados do Paciente:

Nome \_\_\_\_\_ completo:

Nome \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ responsável:

Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

Número de cadastro do paciente no IPPMG / HUCFF:

Endereço:

Telefone \_\_\_\_\_ para \_\_\_\_\_ contato:

Nome \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ médico responsável:

### CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu \_\_\_\_\_ discuti \_\_\_\_\_ com \_\_\_\_\_ o \_\_\_\_\_ Dr. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, sobre a decisão de participar nesse estudo / minha filha participar. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de

esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação/ da minha filha é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas deste TCLE e assinar na última folha.

Concordo que nosso médico de tratamento primário seja informado por escrito sobre a minha participação/ de minha filha, neste estudo laboratorial/clínico. Isso pode incluir outros médicos que não estejam envolvidos no estudo clínico.

Nome da paciente/ Nome dos pais ou responsáveis legais:

---

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

Nome da paciente/ Nome dos pais ou responsáveis legais:

---

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

Nome da pessoa que obteve o consentimento:

---

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

APÊNDICE 3: MICROFOTOGRAFIAS DAS METÁFASES PARCIAIS DAS PARTICIPANTES COM OS CROMOSSOMOS ANÔMALOS ANALISADAS PELA FISH

## Participante 3 Mos

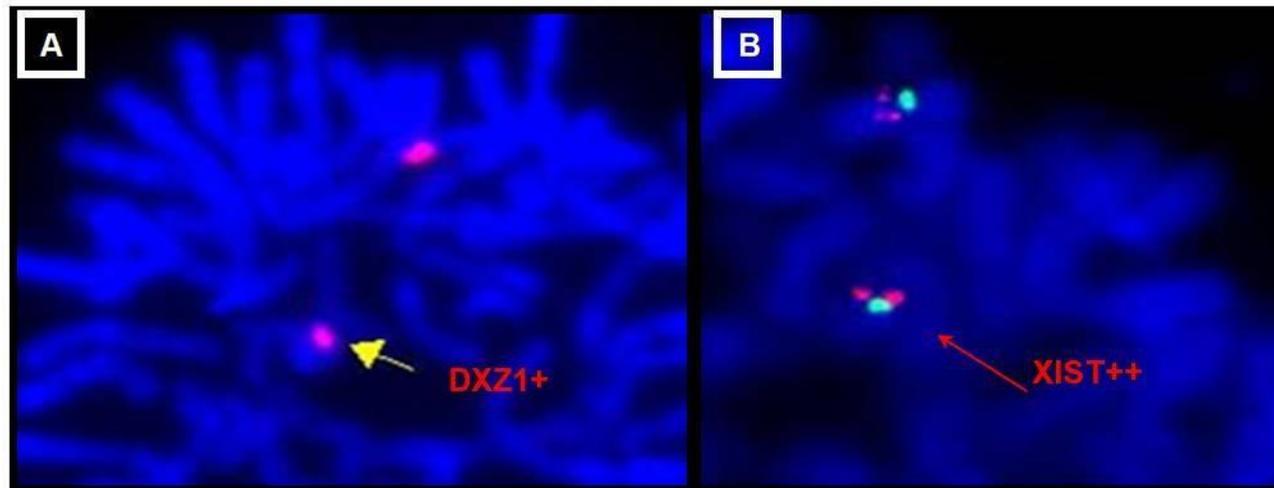


Figura 1: metáfases parciais mostrando o cromossomo em anel:A- um sinal da sonda DXZ1+/DYZ1-, B- dois sinais de *XIST*.

## Participante 4Mos

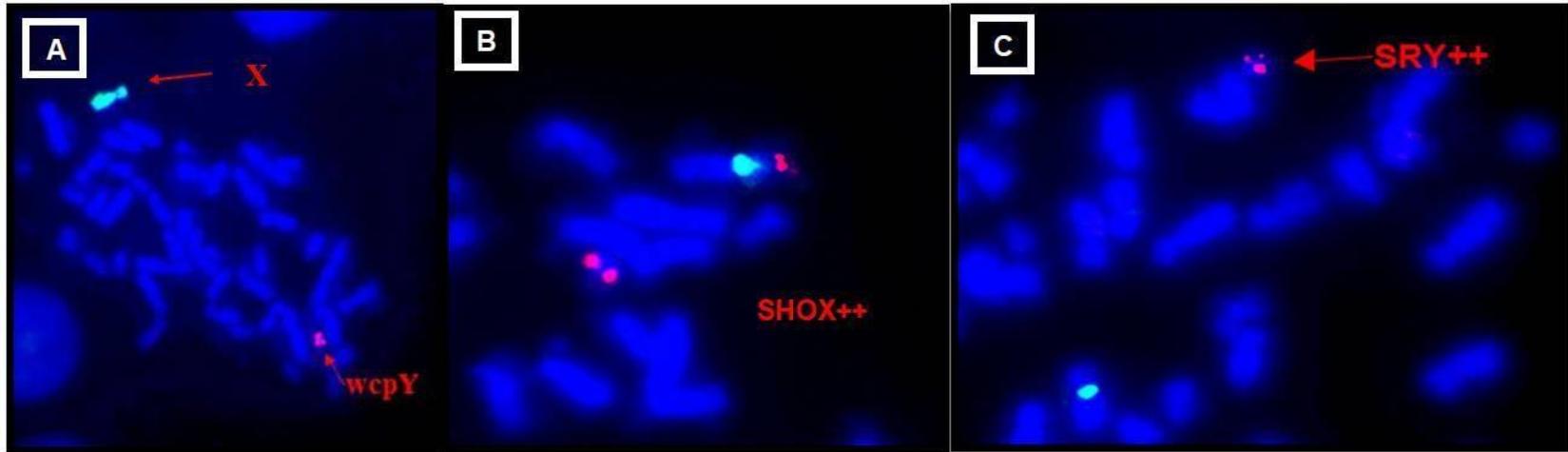


Figura 2: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador:A- sonda wcpY(vermelho); B- dois sinais de SHOX(vermelho) e C- dois sinais de SRY(vermelho).

## Participante 5 Mos

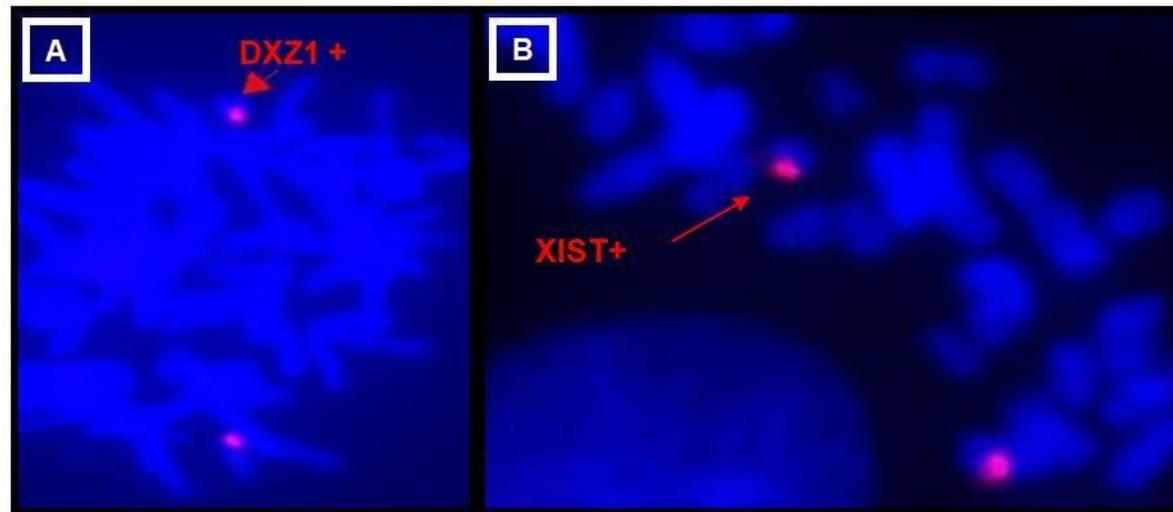


Figura 3: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador: A- sonda DXZ1+/DYZ1-; B- um sinal deXIST.

## Participante 6Mos

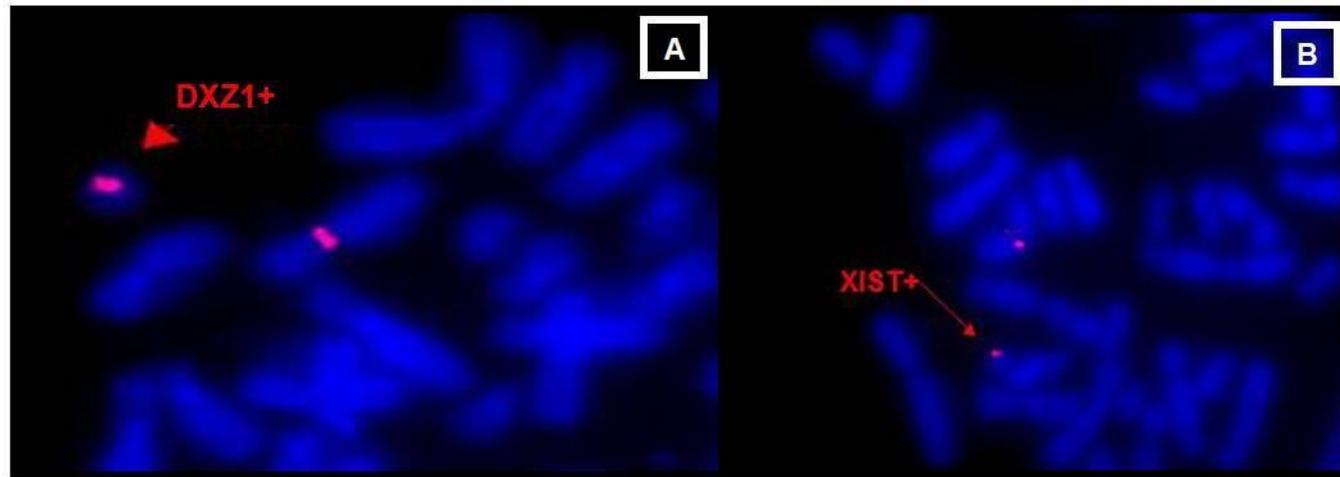


Figura 4: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador: A- um sinal da sonda DXZ1+/DYZ1-, B- um sinal de XIST.

## Participante 7Mos

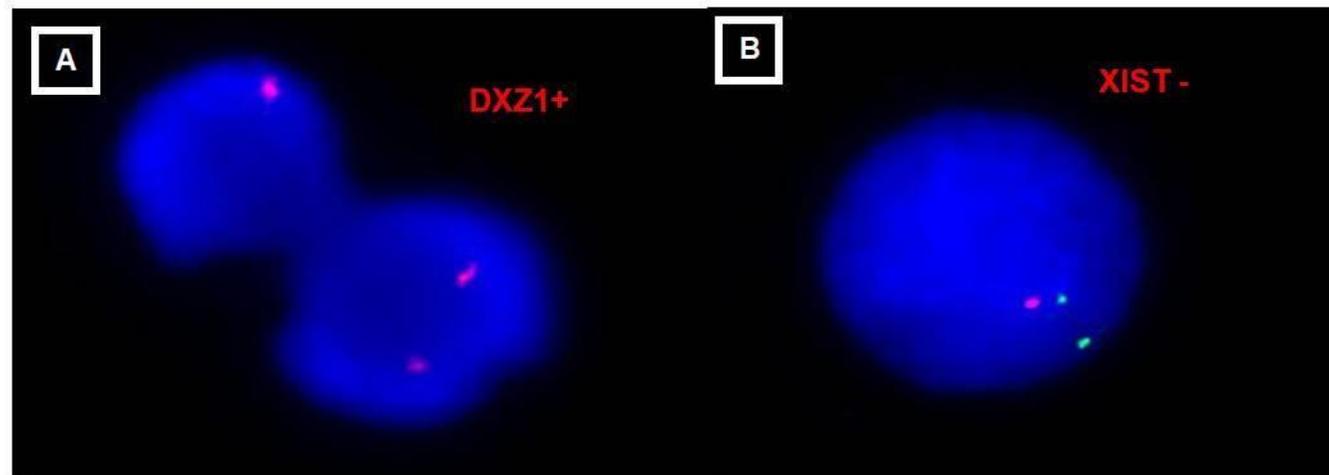


Figura 5:núcleos interfásicos mostrando o cromossomo marcador: A -um sinal da sonda DXZ1+/DYZ1-, B- XIST-

## Participante 8Mos

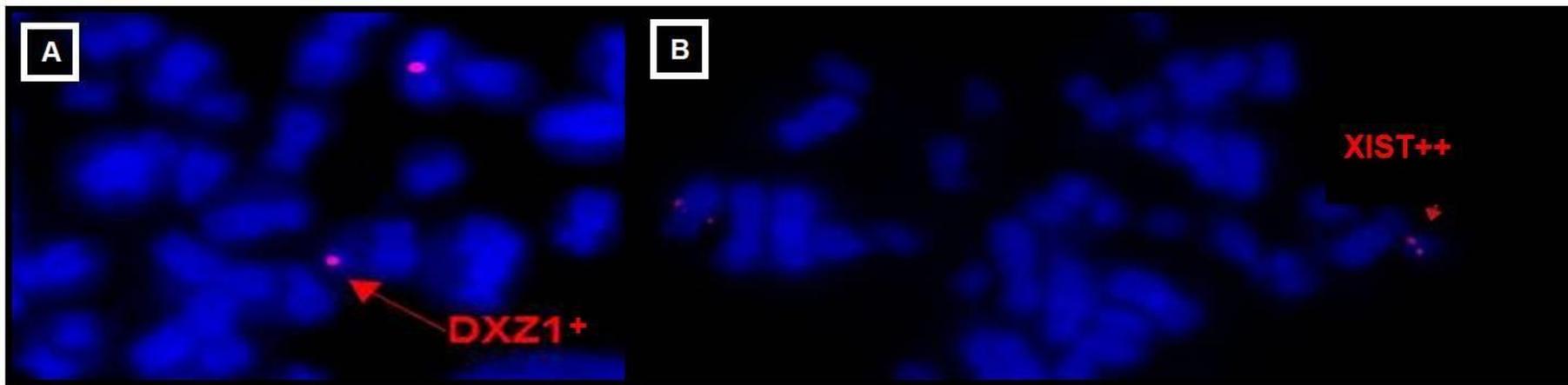


Figura 6: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador: A - um sinal da sonda DXZ1+/DYZ1-, B- dois de *XIST*.

## Participante 10Mos

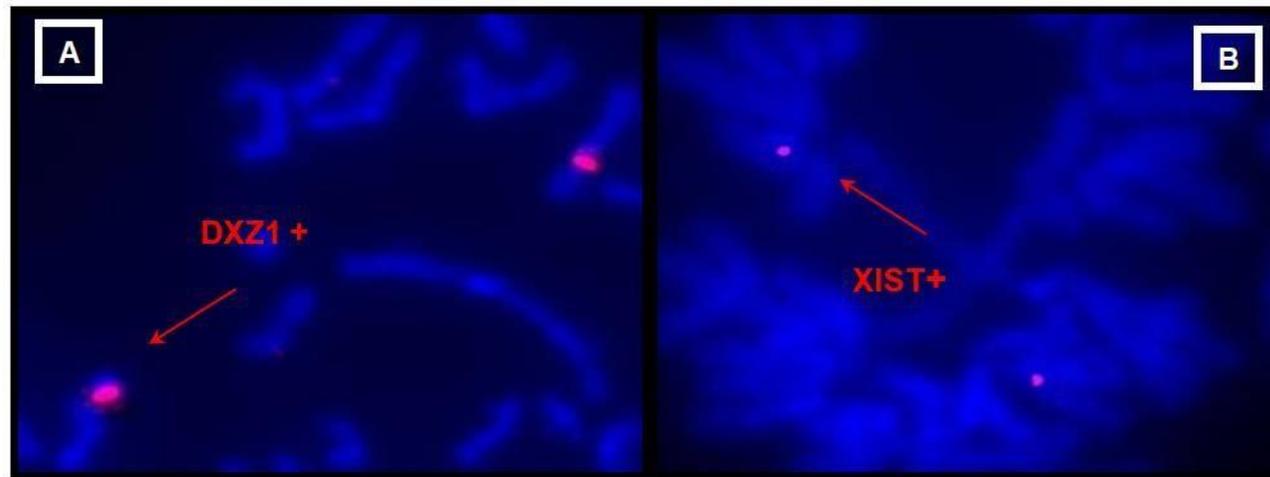


Figura 7: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador: A um sinal da sonda DXZ1+/DYZ1-, B- dois de *XIST*.

## Participante 11Mos

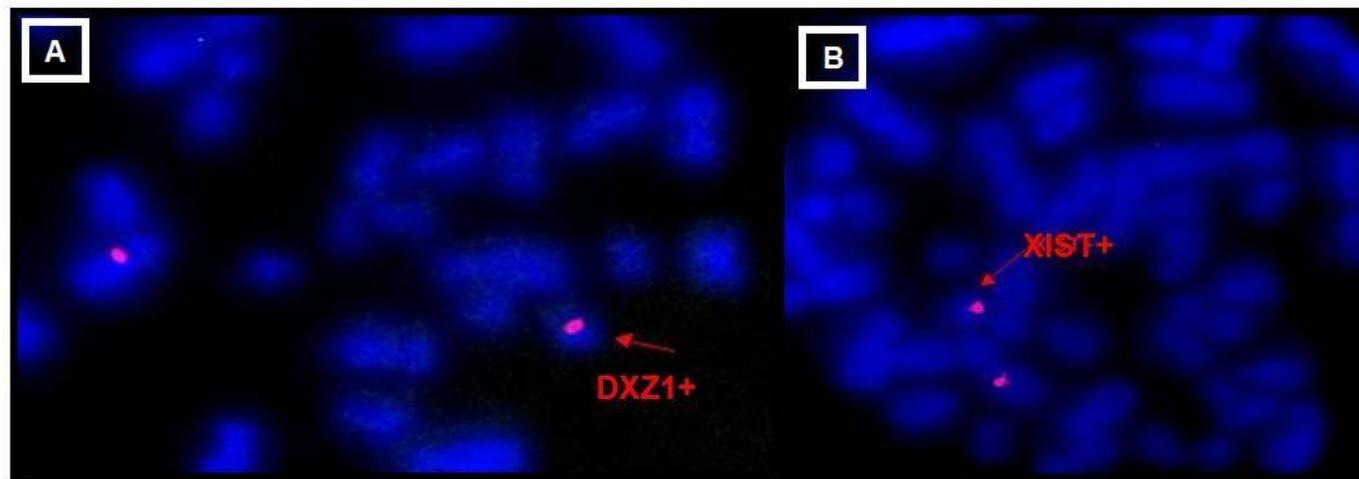


Figura 8: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador Aum sinal da sonda DXZ1+/DYZ1-, B- um sina de *XIST*.

## Participante 12Mos

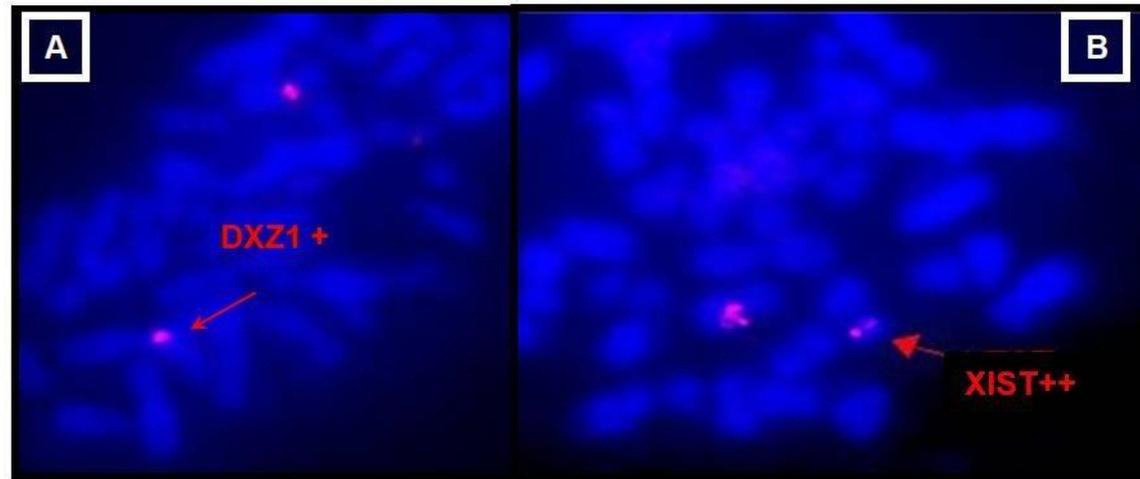


Figura 9: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador: A -um sinal da sonda DXZ1+/DYZ1-, B- dois sinais de *XIST*.

## Participante 13Mos

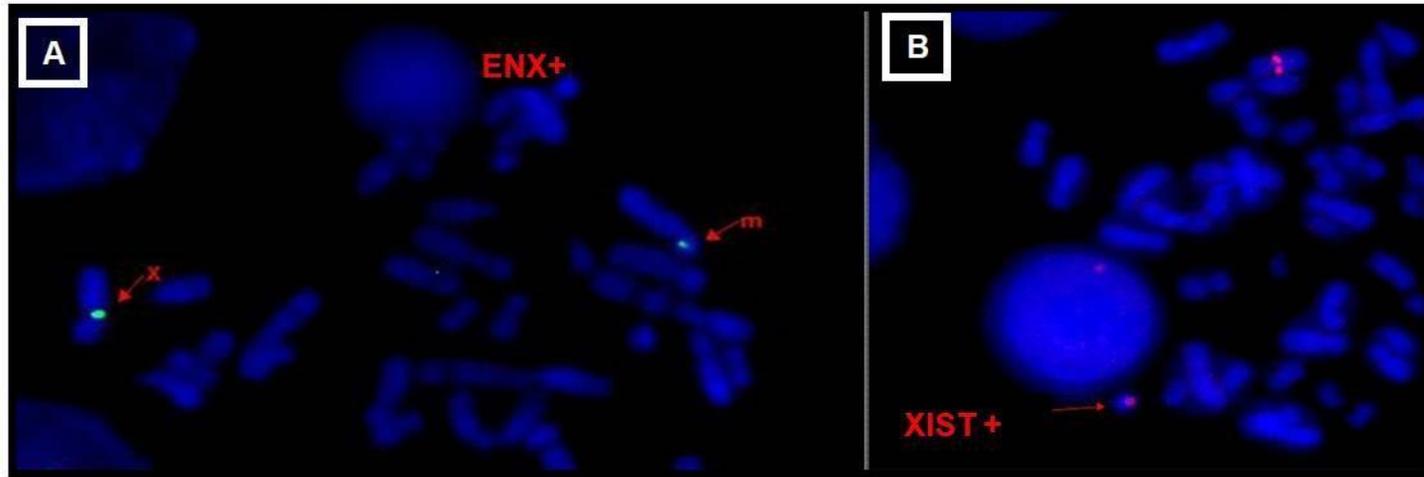


Figura 10: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador: A - um sinal da sonda ENX+(verde), B- um sinal de XIST+(vermelho).

## Participante 14Mos

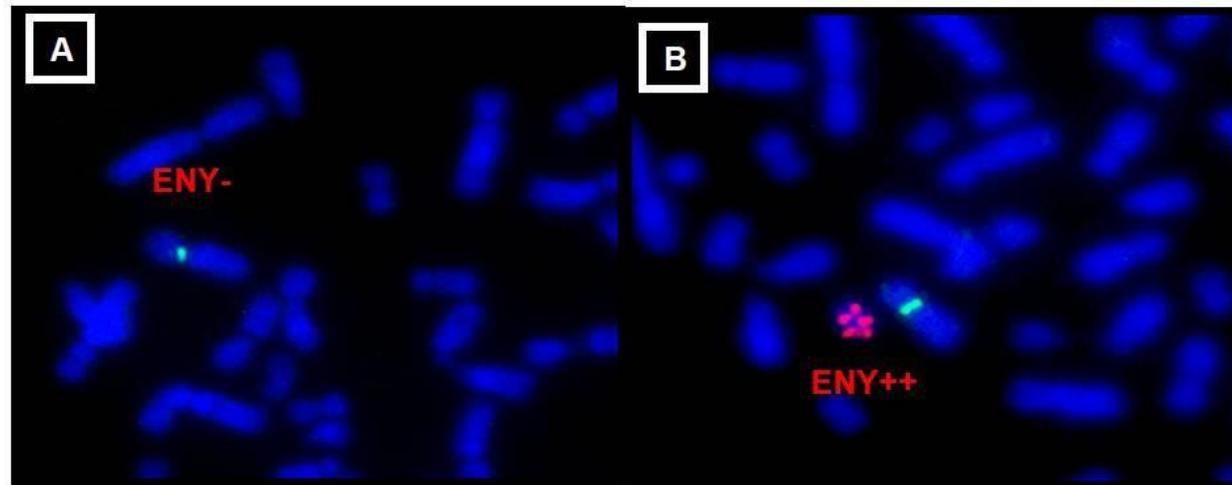


Figura 11: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador: A- um sinal dasonda ENY- (verde); B- dois sinais de ENY++(vermelho)

## Participante 15Mos

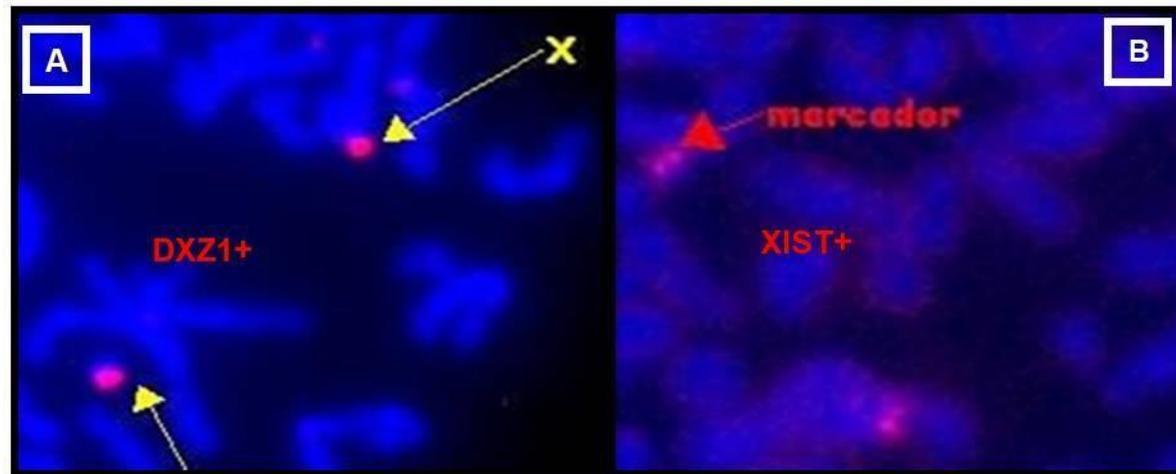


Figura 12: metáfases parciais mostrando o cromossomo marcador: A - um sinal da sonda DXZ1+/DYZ1-, B- um sinal de *XIST*.

## Participante 17Mos

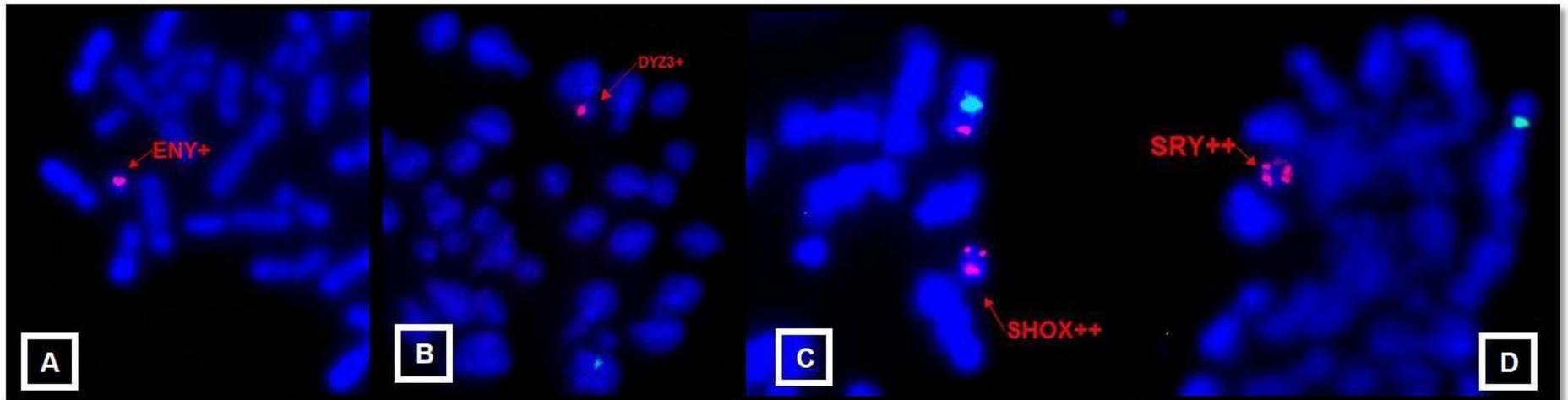


Figura 13: metáfases parciais mostrando o iscromossomo de braço curto do cromossomo: A- sonda ENY+ (vermelho); B- um sinal de DYZ3+; C -dois sinais de *SHOX* (vermelho) e D - dois sinais de *SRY*(vermelho).

**APÊNDICE 4:PERCENTUAL DAS LINHAGENS NOS DIFERENTES TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO X**

Participantes	Tecidos	Monossômica (%)	Dissômica (%)	Trissômica(%)
<b>1M</b>	<b>Sangue periférico</b>	<b>94</b>	<b>6</b>	
	Mucosa oral	97	3	
	Sedimento urinário	98	2	
2M	Sangue periférico	-----	-----	
	Mucosa oral	100	-----	
	Sedimento urinário	100	-----	
<b>3M</b>	<b>Sangue periférico</b>	<b>83</b>	<b>17</b>	
	Mucosa oral	98	2	
	Sedimento urinário	96	04	
<b>4M</b>	Sangue periférico	99	1	
	Mucosa oral	97	3	
	<b>Sedimento urinário</b>	<b>94</b>	<b>6</b>	
<b>5M</b>	<b>Sangue periférico</b>	<b>85</b>	<b>15</b>	
	<b>Mucosa oral</b>	<b>95</b>	<b>5</b>	
	Sedimento urinário	98	2	
<b>6M</b>	Sangue periférico	98	2	
	<b>Mucosa oral</b>	<b>94</b>	<b>6</b>	
	Sedimento urinário	95	5	
<b>7M</b>	Sangue periférico	98	2	
	<b>Mucosa oral</b>	<b>95</b>	<b>5</b>	
	Sedimento urinário	-----	-----	
<b>8M</b>	Sangue periférico	99	1	
	<b>Mucosa oral</b>	<b>91</b>	<b>9</b>	
	Sedimento urinário	96	4	
<b>9M</b>	Sangue periférico	99	1	
	<b>Mucosa oral</b>	<b>95</b>	<b>5</b>	
	Sedimento urinário	96	4	
<b>10M</b>	Sangue periférico	99	1	
	Mucosa oral	0,99	1	
	<b>Sedimento urinário</b>	<b>0,71</b>	<b>22</b>	<b>7</b>

**APÊNDICE 5: PERCENTUAL DE CÉLULAS DE CADA LINHAGEM NOS DIFERENTES TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO. LINHAGEM 45,X 1 SINAL; LINHAGEM 46,XN- 2 SINAIS E 47,XNN – 3 SINAIS.**

Participantes	Tecidos	Monossômica	Dissômica	Trissômica
1 Mos	SP	59	41	
	MO	70	30	
	SU	67	33	
2Mos	SP	64	36	
	MO	68	32	
	SU	57	43	
3Mos	SP	87	13	
	MO	85	15	
	SU	77	23	
4Mos	SP	29	54	17
	MO	57	27	16
	SU	77	23	
5Mos	SP	66	34	
	MO	80	20	
	SU	68	32	
6Mos	SP	61	39	
	MO	67	33	
	SU	47	53	
7Mos	SP	96	4	
	MO	93	7	
	SU			
8Mos	SP	38	59	3
	MO	67	33	
	SU	55	45	
9Mos	SP	45	55	
	MO	74	26	
	SU	98	2	
10Mos	SP	72	28	
	MO	80	20	
	SU	73	27	
11Mos	SP	70	29	1
	MO	66	34	
	SU			
12Mos	SP	95	5	
	MO	94	6	
	SU			
13Mos	SP	86	14	
	MO	82	18	
	SU	83	17	
14Mos	SP	60	35	5
	MO			
	SU	76	14	10
15Mos	SP	79	21	
	MO	81	19	
	SU	23	75	2
16Mos	SP	67	33	
	MO	88	12	
	SU	92	8	
17Mos	SP	82	16	2
	MO			
	SU			

**APÊNDICE 6A: VARIAÇÃO ENTRE OS TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO COM CROMOSSOMO ÍNTEGRO OU ANÔMALO DERIVADO DO CROMOSSOMO X.**

PARTICIPANTES		1 Mos			2 Mos			3 Mos			5 Mos		
TECIDOS:		SP	MO	SU									
LINHAGEM 1:	45,X	59	70	67	64	68	57	87	85	77	66	80	68
LINHAGEM 2:	46,XX	41	30	33	36	32	43	13	15	23	34	20	32
LINHAGEM 3:	47,XXX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

COMPARAÇÃO TECIDOS:		SP x MO	SPx SU	MO x SU	SP X MO	SPx SU	MO X SU	SP X MO	SP x SU	MO xSU	SP x MO	SP x SU	MO x SU
LINHAGEM 1:		-8,5	-6,3	2,2	-3,0	5,8	8,8	1,2	6,1	4,9	-9,6	-1,5	8,1
LINHAGEM 2:		15,5	10,8	-4,8	5,9	-8,9	-14,7	-7,1	-27,8	-21,1	25,9	3,0	-23,1
LINHAGEM 3:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PARTICIPANTES		6 Mos			7 Mos			8 Mos		
TECIDOS:		SP	MO	SP	SP	MO	SP	SU	MO	SU
LINHAGEM 1:	45,X	61	67	47	96	93	-	38	67	55
LINHAGEM 2:	46,XX	39	33	53	4	7	-	59	33	45
LINHAGEM 3:	47,XXX	-	-	-	-	-	-	3	-	-

COMPARAÇÃO TECIDOS:		SP x MO	SP x SU	MO x SU	SP X MO	SPx SU	MO X SU	SP X MO	SP x SU	MO xSU
LINHAGEM 1:		-4,7	13,0	17,5	1,6	-	-	-27,6	-18,3	9,8
LINHAGEM 2:		8,3	-15,2	-23,3	-27,3	-	-	28,3	13,5	-15,4
LINHAGEM 3:		-	-	-	-	-	-	-	-	-

LEGENDA:
SP - SANGUE PERIFÉRICO
MO - MUCOSA ORAL
SU - SEDIMENTO URINÁRIO

**APÊNDICE 6B: VARIAÇÃO ENTRE OS TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO COM CROMOSSOMO ÍNTEGRO OU ANÔMALO DERIVADO DO CROMOSSOMO X.**

PARTICIPANTES		10 Mos			11 Mos			12 Mos			13 Mos		
TECIDOS:		SP	SP	SP	SP	MO	SU	SP	MO	SU	SP	MO	SU
LINHAGEM 1:	45,X	72	80	73	70	66		95	94	-	86	82	83
LINHAGEM 2:	46,XX	28	20	27	29	34		5	6	-	14	18	17
LINHAGEM 3:	47,XXX	-	-	-	1			-	-	-	-	-	-
COMPARAÇÃO TECIDOS:		SP x MO	SP x MO	SP x MO	SP x MO	SP x SU	MO x SU	SP x MO	SP x SU	MO x SU	SP x MO	SP x SU	MO x SU
LINHAGEM 1:		-5,3	-0,7	4,6	2,9	-	-	0,5	-	-	2,4	1,8	-0,6
LINHAGEM 2:		16,7	1,8	-14,9	-7,9	-	-	-9,1	-	-	-12,5	-9,7	2,9
LINHAGEM 3:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PARTICIPANTES		15Mos			16 Mos		
TECIDOS:		SP	MO	SU	SP	MO	SU
LINHAGEM 1:	45,X	79	81	23	67	88	92
LINHAGEM 2:	46,XX	21	19	75	33	12	8
LINHAGEM 3:	47,XXX	-	-	2	-	-	-
COMPARAÇÃO TECIDOS:		SP x MO	SP x SU	MO x SU	SP x MO	SP x SU	MO x SU
LINHAGEM 1:		-1,3	54,9	55,8	-13,5	-15,7	-2,2
LINHAGEM 2:		5,0	-56,3	-59,6	46,7	61,0	20,0
LINHAGEM 3:		-	-	-	-	-	-

LEGENDA:
SP - SANGUE PERIFÉRICO
MO - MUCOSA ORAL
SU - SEDIMENTO URINÁRIO

**APÊNDICE 6C: VARIAÇÃO ENTRE OS TECIDOS DAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO COM CROMOSSOMO ÍNTEGRO OU ANÔMALO DERIVADO DO CROMOSSOMO Y.**

PARTICIPANTES
TECIDOS:
LINHAGEM 1:
LINHAGEM 2:
LINHAGEM 3:

	4 Mos		
	SP	MO	SU
45,X	29	57	77
46,XX	54	26	23
47,XXX	17	17	-

	9 Mos		
	SP	MO	SU
45,X	45	74	98
46,XX	55	26	2
47,XXX	-	-	-

	14 Mos		
	SP	MO	SU
45,X	60	-	76
46,XX	35	-	14
47,XXX	5	-	10

COMPARAÇÃO TECIDOS:
LINHAGEM 1:
LINHAGEM 2:
LINHAGEM 3:

	SP x MO	SP x SU	MO x SU
45,X	-32,6	-45,3	-14,9
46,XX	35,0	40,3	6,1
47,XXX	0,0	-	-

	SP x MO	SP x SU	MO x SU
45,X	-24,4	-37,1	-14,0
46,XX	35,8	93,0	85,7
47,XXX	-	-	-

	SP x MO	SP x SU	MO x SU
45,X	-	-11,8	-
46,XX	-	42,9	-
47,XXX	-	-	-

LEGENDA:
SP - SANGUE PERIFÉRICO
MO - MUCOSA ORAL
SU - SEDIMENTO URINÁRIO

**APÊNDICE 7:FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS 45,X NOS DIFERENTES TEMPOS DE CULTURA NAS PARTICIPANTES COM MOSAICISMO CROMOSSÔMICO.**

Participantes	1Mos	2Mos	3Mos	4Mos	5Mos	6Mos	7Mos	8Mos	9Mos	10Mos	11Mos	12Mos	13Mos	14Mos	15Mos	16Mos	17Mos
48 hs	41	65	85	52	58	49	96	42	45	40	51	61	83	47	55	48	13
72 hs	54	58	76	46	41	43	94	48	47	42	56	68	82	45	57	53	19
96 hs	57	56	69	40	50	46	95	47	49	44	53	71	84	42	59	58	17

## ANEXO I: PARECER E APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFRJ - INSTITUTO DE  
PUERICULTURA E PEDIATRIA  
MARTAGÃO GESTEIRA DA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO E DINÂMICA DE REPLICAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER E MOSACISMO CROMOSSÔMICO.

**Pesquisador:** MARIA CECILIA MENKS RIBEIRO

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 4

**CAAE:** 87150318.2.0000.5264

**Instituição Proponente:** Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira - RJ

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.768.383

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, transversal. Serão incluídas pacientes com cariótipo 45,X e pacientes com mosaïcismo cromossômico com alteração numérica ou estrutural acompanhadas no Serviço de Genética e Endocrinologia do IPPMG e de Endocrinologia do HUCFF.

O mosaïcismo cromossômico é um evento pós-zigótico decorrente de erros nas primeiras divisões do zigoto, resultando em uma ou mais linhagens celulares. Ele é definido pela presença de duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes em um único indivíduo.

Segundo os autores, " o mosaïcismo cromossômico parece ser um evento comum, associado aos processos de proliferação celular, ação de agentes mutagênicos e senescência. Há também relação do mosaïcismo com eventos normais do desenvolvimento. Os processos que acarretam mosaïcismo cromossômico envolvem alterações da divisão celular como na poliploidia e aneuploidia, rearranjos estruturais, eventos de transposição e mesmo eventos epigenéticos como a inativação do X.

A Síndrome de Turner caracteriza-se pela ausência total ou parcial do cromossomo X (SYBERT e

Endereço: Rua Bruno Lobo 50 - Ilha do Fundão  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-912  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2590-3842 Fax: (21)2562-6150 E-mail: pesquisa@ppmg.utfj.br

UFRJ - INSTITUTO DE  
PUERICULTURA E PEDIATRIA  
MARTAGÃO GESTEIRA DA



Continuação do Parecer: 2.768.363

McCAULEY, 2004). Citogeneticamente, a síndrome é associada ao cariótipo 45,X observado em 50% a 60% dos casos, as demais apresentam alterações estruturais do cromossomo X ou Y e / ou mosaicismos cromossômicos. (OLIVEIRA et al., 2009; BISPO et al., 2014; HOOK E WARBURTON, 2014).

Aproximadamente 99% dos conceptos com constituição pura 45,X são abortados espontaneamente (MARZUKI et al., 2011; ALVES et al., 2013).

Considerando a alta incidência da perda gestacional nos embriões com monossomia pura, foi sugerido que as nativas com ST apresentam mais de uma linhagem celular, constituindo assim um mosaicismos cromossômico (OLIVEIRA et al., 2009; HOOK e WARBURTON, 2014).

A hipótese da necessidade do mosaicismos para a sobrevivência dos fetos com constituição 45,X (ST) é apoiada pelo argumento de que existiria um efeito feto-protetor produzido por mais um ou mais genes dos cromossomos sexuais X e Y (FERNÁNDEZGARCÍA et al., 2000). Hook e Warburton (2014) sugeriram que todos os indivíduos 45,X com ST apresentariam mosaicismos oculto e a ausência do cromossomo X seria decorrente de erros mitóticos. As linhagens celulares com frequência inferior a 10% nas células sanguíneas podem não ser detectadas pela citogenética tradicional e a aplicação de técnicas moleculares como a FISH e a PCR aumenta substancialmente a detecção de linhagens com baixa frequência (HOOK E WARBURTON, 1983; HELD, KEBER e KAMINSKY, 1992; PREMI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; MARZUKI et al., 2011; HOOK E WARBURTON, 2014). Ademais, uma constituição cromossômica distinta pode estar presente em diferentes tecidos do mesmo indivíduo, acentuando assim a possibilidade de detecção de anomalias cromossômicas ou da presença de um segundo cromossomo sexual quando são avaliados tecidos de origens embrionárias diferentes (NAZARENKO, TIMOSHEVSKY e SUKHANOVA, 1999; PREMI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Neste estudo buscamos esclarecer estas questões, através de uma avaliação criteriosa, utilizando células de diferentes tecidos, para detectar a presença de mosaicismos nas pacientes com monossomia universal e comparar a proporção das células monossômicas nas pacientes com mosaicismos. A avaliação de células da mucosa oral e do sedimento urinário, que são de origem ectodérmica, complementa a avaliação tradicionalmente realizada em células sanguíneas, que são de origem mesodérmica. O estudo da dinâmica de proliferação nas pacientes com mosaicismos também

Endereço: Rua Bruno Lobo 50 - Ilha do Fundão  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-012  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2590-3842 Fax: (21)2582-6150 E-mail: pesquisa@ppmg.ufrj.br

UFRJ - INSTITUTO DE  
PUERICULTURA E PEDIATRIA  
MARTAGÃO GESTEIRA DA



Continuação do Parecer: 2.700.303

possibilita averiguar se existem diferenças celulares intrínsecas nas células com diferentes constituições, como seleção e alteração do ciclo celular, de forma a influenciar a proporção das células com cada constituição. Paralelamente também será possível avaliar, nas células em segunda divisão *in vitro*, a ocorrência de TCI, e diferenças na frequência destes eventos nas células de populações diferentes.

Baseado no exposto acima, este estudo se justifica, pois pretende contribuir para a compreensão dos fenômenos citogenéticos associados a etiologia da ST, e a possibilitando aprimorar a abordagem diagnóstica no Laboratório de Genética do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), com repercussão na qualidade da atividade assistencial.\*

Os autores descrevem a metodologia a ser empregada bem como as análises estatísticas, que estão adequadas.

**Objetivo da Pesquisa:**

**OBJETIVO GERAL**

Compreender os processos celulares e cromossômicos envolvidos na etiologia da síndrome de Turner.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aprofundar a caracterização do mosaicismos na ST avaliando a frequência de células com monossomia em núcleos interfásicos de células obtidas da mucosa oral, sedimento urinário e sangue periférico, *sem cultivo*.
2. Investigar a presença de mosaicismos em pacientes com cariótipo 45,X.
3. Verificar a existência de seleção e/ou alteração do ciclo celular, avaliando a frequência de células monossômicas após a primeira, segunda e terceira divisão *in vitro*, após incorporação da 5-BrdU e diferenciação das células.
4. Verificar diferenças na frequência de troca das cromátides irmãs (TCI) espontânea entre as células monossômicas e diploides.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

O projeto apresenta riscos mínimos como será feita a coleta de sangue pode ocorrer incômodo na hora da entrada da agulha e também existe a possibilidade de ficar uma mancha roxa no local da coleta. Os dados desse estudo poderão ser utilizados em revistas e em congressos, contudo

Endereço: Rua Bruno Lobo 50 - Ilha do Fundão  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-912  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2590-3842 Fax: (21)2582-6150 E-mail: pesquisa@ipmg.ufrj.br

UFRJ - INSTITUTO DE  
PUERICULTURA E PEDIATRIA  
MARTAGÃO GESTEIRA DA



Continuação do Parecer: 2.760.363

haverá a preocupação com a não identificação dos indivíduos envolvidos nesse projeto.

**Benefícios:**

Embora esse projeto não traga benefícios imediatos ampliará os estudos nas pacientes com Síndrome de Turner com constituição 45,X ou mosaicismos cromossômicos com alterações estruturais ou numéricas. Auxiliando futuramente tanto em um diagnóstico mais preciso como também que poderá ser utilizado de forma rotineira, repercutindo assim na qualidade assistencial.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Autores responderam adequadamente as pendências colocadas no parecer de 12/06/2018.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

RESPOSTAS ÀS PENDÊNCIAS COLOCADAS NO PARECER DO DIA 12/06/2018:

1. FOI APRESENTADO O FORMULÁRIO, PORÉM ESTE CONTÉM DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE (NOME E PRONTUÁRIO) QUE DEVEM SER OMITIDOS.

RESPOSTA: TODOS OS DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS PAIS E DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA FORAM OMITIDOS.

CONCLUSÃO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Notificação aprovada. O/A pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto até sua conclusão, quando deverá ser apresentado o relatório final sucinto com todas as informações relevantes, de acordo com o item XI.2.d da Resolução CNS Número 466, de 12 de dezembro de 2012.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1088488.pdf	09/07/2018 15:43:11		Aceito
Outros	repostaCEP.docx	09/07/2018 15:42:27	MARIA CECILIA MENKS RIBEIRO	Aceito
Outros	formularioST.pdf	09/07/2018 15:41:45	MARIA CECILIA MENKS RIBEIRO	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE.pdf	04/04/2018	MARIA CECILIA	Aceito

Endereço: Rua Bruno Lobo 50 - Ilha do Fundão  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-912  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2590-3842 Fax: (21)2562-8150 E-mail: pesquisa@ppmg.ufrj.br

UFRJ - INSTITUTO DE  
PUERICULTURA E PEDIATRIA  
MARTAGÃO GESTEIRA DA



Continuação do Parecer: 2.760.363

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16:53:50	MENKS RIBEIRO	Aceito
Folha de Rosto	rostoPB.pdf	04/04/2018 16:45:53	MARIA CECILIA MENKS RIBEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_turner_mosalcismo.pdf	04/04/2018 16:44:37	MARIA CECILIA MENKS RIBEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 12 de Julho de 2018

---

Assinado por:  
José Cesar da Fonseca Junqueira  
(Coordenador)

Endereço: Rua Bruno Lobo 50 - Ilha do Fundão  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-912  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2590-3842 Fax: (21)2582-6150 E-mail: pesquisa@ppmg.ufrj.br

## PRODUÇÕES

Dois artigos foram produzidos utilizando resultados obtidos nesse estudo, um deles já foi publicado em 2020 no *Global Journal of Medical Research* e outro foi publicado em preprints pela *Life*. Ambos podem ser observados abaixo. O segundo foi produzido em co-autoria com outra aluna de Doutorado do Laboratório de Genética do IPPMG, porém ambas contribuíram igualmente para o manuscrito.

Article

Not peer-reviewed version

## Cell Cycle Kinetics and Sister Chromatid Exchange in Mosaic Turner Syndrome

Miriam Beatriz Beatriz Goulart , [Eduardo Vieira Neto](#)\*, Daniela R. Ney Gracia , [Marília Martins Guimarães](#) ,  
Isaías Soares De Paiva , Karina De Ferran , Nathalia Correia Krause Dos Santos , Luciana Santos Barbosa ,  
Amanda F. De Figueiredo , Maria Cecília Menks Ribeiro , Márcia Gonçalves Ribeiro

Posted Date: 27 February 2024

doi: 10.20944/preprints202402.1549.v1

Keywords: Turner syndrome; chromosomal mosaicism; cell lineages; proliferation index; sister chromatid exchange; chromosomal instability



Preprints.org is a free multidiscipline platform providing preprint service that is dedicated to making early versions of research outputs permanently available and citable. Preprints posted at Preprints.org appear in Web of Science, Crossref, Google Scholar, Scilit, Europe PMC.

Copyright: This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions, and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions, or products referred to in the content.

## Article

## Cell Cycle Kinetics and Sister Chromatid Exchange in Mosaic Turner Syndrome

Miriam Beatriz Goulart <sup>1,†</sup>, Eduardo Vieira Neto <sup>2,\*†</sup>, Daniela R. Ney Gracia <sup>1</sup>,  
 Marília Martins Guimarães <sup>3</sup>, Isaías Soares de Paiva <sup>4,5</sup>, Karina de Ferran <sup>3</sup>,  
 Nathalia Correia Krause dos Santos <sup>3</sup>, Luciana Santos Barbosa <sup>1</sup>, Amanda F. de Figueiredo <sup>1</sup>,  
 Maria Cecília Menks Ribeiro <sup>1,6</sup> and Márcia Gonçalves Ribeiro <sup>1,7</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Genetics, Institute of Childcare and Pediatrics Martagão Gesteira (IPPMG), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil; miriamgou@gmail.com (M.B.G.), daneygarcia07@gmail.com (D.R.N.G.), lu.biotech@gmail.com (L.S.B.), amandaffbr@gmail.com (A.F.F.), ceciliamenks@gmail.com (M.C.M.R.), marciaribeiro@medicina.ufrj.br (M.G.R.)

<sup>2</sup> Genetic and Genomic Medicine Division, Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

<sup>3</sup> Pediatric Endocrinology Service, IPPMG, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; marguima54@gmail.com (M.M.G.), karina.ferran@gmail.com (K.F.), nathaliakrausegenetica@gmail.com (N.C.K.S.)

<sup>4</sup> Faculty of Medicine, University of Grande Rio - Unigranrio, Duque de Caxias, RJ, Brazil; ispaivagen@gmail.com (I.S.P.)

<sup>5</sup> Faculty of Medicine, Serra dos Órgãos Educational Center - UNIFESO, Teresópolis, RJ, Brazil

<sup>6</sup> NUMPEX-BIO Laboratory, Campus Duque de Caxias, UFRJ, Duque de Caxias, RJ, Brazil

<sup>7</sup> Medical Genetics Service, IPPMG, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

\* Correspondence: edv9@pitt.edu; Tel.: +1 (909) 270-1558

† These authors contributed equally to this article.

**Abstract:** Turner syndrome (TS) is caused by a complete or partial absence of an X or Y chromosome, including chromosomal mosaicism, affecting 1 in 2,500 female live births. Sister chromatid exchange (SCE) is used as a sensitive indicator of spontaneous chromosome instability. Cells from mosaic patients constitute useful material for SCE evaluations as they grow under the influence of the same genetic background and endogenous and exogenous factors. We evaluated proliferation dynamics and SCE frequencies of 45,X and 46,XN cells of 17 mosaic TS patients. In two participants, 45,X cells exhibited a proliferative disadvantage in relation to 46,XN cells after 72h of cultivation. The analysis of mean PI showed significant differences between 45,X and 46,XN lineages; however there were no intraindividual differences. On the other hand, mean SCE frequencies showed no differences between the two lineages, but there were intraindividual differences in 5 patients. The absence of mean SCE frequency differences between 45,X and 46,XN lineages may indicate that both were equally unstable, as more than 70% of the 46,XN lineages had an anomalous karyotype. However, 46,XN had a higher mean PI, suggesting that the amount of cells with a karyotype distinct from 45,X may increase with time in mosaic TS women.

**Keywords:** Turner syndrome; chromosomal mosaicism; cell lineages; proliferation index; sister chromatid exchange; chromosomal instability

### 1. Introduction

The process of aneuploidy that occurs due to chromosome mis-segregation during meiosis is a major cause of birth defects, infertility, and spontaneous miscarriages [1]. Most constitutional aneuploidies cause embryonic lethality, the most notable exception in humans being trisomy 21, also known as Down syndrome (DS) [2].

Monosomies are relatively common events in early embryonic development, but survival beyond fetal period is exceptional [3]. The embryonic and fetal survival of 45,X concepts although extremely low (0.01%) can result in live births, which can be explained by the fact that it is a monosomy of sex chromosomes.



Turner syndrome is due to a partial or total loss of the second sexual chromosome, resulting in the development of highly variable clinical features, affecting 1 in 2,500 female live births [4,5]. It is a unique chromosome aneuploidy observed in newborns [4–6]. Monosomy of X chromosome is the cytogenetic hallmark for TS [4], but a wide variety of other anomalies of X or Y chromosome have been found, including chromosomal mosaicism, with whole or part of a sex chromosome [4–6]. At least 15-25% of TS patients have mosaicism [4,5].

It has been suggested that 45,X lineages have a prolonged cell cycle that can affect the differentiation of tissues and organs [7]. These preliminary data indicate that there could be an association between a prolonged cell cycle and the phenotypic features in TS [3].

TS phenotype is a result not only of the genomic imbalance from deleted genes, especially those that escape X inactivation or are in the pseudoautosomal region, but also from epigenetic influences, as X-chromosome and autosomal DNA-methylation and gene expression profiles from TS cells differ from normal female 46,XX cells [8,9]. Nonetheless, chromosome instability (CIN) could also play a role in TS complex pathogenesis and clinical variability [8].

Chromosome instability (CIN) is characterized by a high rate of loss and gain of whole chromosome segments per cell cycle resulting in cell-to-cell variability [10, 11]. It is a hallmark in tumorigenesis and is also common during early human embryogenesis [11]. CIN can be associated with monosomy-trisomy of a whole chromosome and other genomic and chromosomal variations [3].

A higher incidence of sister chromatid exchange (SCE) can be associated with CIN, as is seen in some cancers and congenital syndromes [12–16]. Therefore, SCE has been used as a sensitive indicator of spontaneous CIN [12,17–20]. Previous research has reported high SCE incidences in patients with Bloom syndrome, Werner syndrome, and various types of neoplasia [12,13,20].

SCE represents the interchange of DNA between replication products at apparently homologous loci, and at low levels constitutes a normal occurrence. Although the molecular basis for SCE formation is not completely understood, it presumably involves DNA damage and repair [21,22].

On the other hand, there are few reports comparing cell-cycle kinetics and SCE frequencies in mosaic TS patients until the present date. According to Melaragno et al [18], mosaic patients are useful for SCE evaluation because the different cell lineages grow under the influence of the same exogenous and endogenous factors. Previously, Bortolai & Melaragno [23] analyzed by SCE one 45,X/46,XX patient in a small study series. The “mosaic” study design approach not only removes the confounding effects of interindividual differences due to total genetic make-up, but also controls for the effects of environmental influences, since both cell lines in individuals with mosaicism share identical exposure histories [24].

The main aim of the present cross-sectional study was to analyze the proliferation dynamics and SCE frequencies among 45,X and 46,XN lineages from a moderately large cohort of mosaic TS participants.

## 2. Materials and Methods

A total of 17 mosaic Turner syndrome (TS) participants were included in the present study from a cohort of circa 124 TS females diagnosed by the Cytogenetic Laboratory of Institute of Pediatrics and Childcare Martagão Gesteira (IPPMG) and followed by the Endocrinology Department of Clementino Fraga Filho University Hospital (HUCFF), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil, from 1989 to 2022. The study was approved by the Ethical Review Board of IPPMG, UFRJ (Ethical Review Board protocol n. 2.768.383). All participants or their parents gave their written consent.

Peripheral blood cultures were performed using standard protocols modified from Moorhead et al. [25]. Peripheral blood from each participant was added to 5 mL RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and phytohemagglutinin P (Cultilab).

Cultures were incubated for 48, 72 and 96 hours. Cultures were harvested by standard procedures after one hour in MAS (Mitotic Arresting Solution, Genial Genetics, Chester, UK), treated

with a hypotonic solution (0.075 M KCl) and fixed in 3:1 methanol: acetic acid. Cytological preparation and slide mounting were performed according to routine methods.

For bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BrdU (Sigma-Aldrich, Barueri, SP, Brazil) was added in the beginning of the cultures, which were incubated for 72 hours. Differentiation staining was performed using a modified standard technique from previous studies [26,27].

Proliferation index (PI) after BrdU labeling was estimated by scoring fifty metaphases from each cell lineage. A total of 100 metaphase cells (50 metaphases from 45,X and 50 from 46,XN cell lineages) from each participant were scored for the determination of the PI, calculated according to the following equation:  $\text{PI} = (\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3})/\text{N}$ , where M1, M2, and M3 represent the number of metaphases undergoing first, second and third division and N is the total number of cells scored.

The frequencies of 45,X and 46,XN lineages, and evaluation of *in vitro* selection were performed in 48, 72 and 96-hour cultures, counting a total of 100 metaphases (50 cells from 45,X lineage and 50 cells from 46,XN lineage).

To appraise chromosomal instability, sister chromatid exchange (SCE) frequencies among 45,X and 46,XN lineages were compared. Twenty well-spread second-division metaphases from each cell lineage were analyzed and the amount of SCE was computed for each one cell.

The frequencies of SCE were compared between 45,X and 46,XN lineages in an intraindividual analysis, comparing the lineages of the same individual participant, and in an interindividual analysis, considering the pool of monosomic and disomic cells in the group of participants.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed using the following commercial probes specific for chromosomes X and Y, according to manufacturers' instructions: DXZ1/DYZ1 (centromeric regions, Xp11.1-q11.1 and Yq12; Vysis/Abbott, Abbott Park, IL, USA or Zytovision, Bremerhaven, Germany), whole chromosome painting (wcp) for X and Y (Cytocell, Milton, Cambridge, UK), SHOX (Xp22.33 and Yp11.3; Cytocell, Milton, Cambridge, UK), XIST (Xq13.2; Vysis/Abbott, Abbott Park, IL, USA or Cytocell, Milton, Cambridge, UK), DYZ3 (centromeric region, Yp11.1-q11.1; Zytovision, Bremerhaven, Germany), ENXY (pericentromeric regions, Xq11.1 and Yq11.22.1; Lexel, Buenos Aires, Argentina), and SRY (Yp11.31; Vysis/Abbott, Abbott Park, IL, USA).

For statistical analysis, the Tukey's and Šidák multiple comparisons tests were applied to compare interindividual (group) comparisons of the frequencies of lineages 45,X and 46,XN, when considering different cultivation times of the same lineage, or both lineages of each participant at different cultivation times, respectively. The  $\chi^2$  test or Fisher's exact test were used to compare the frequencies of the 45,X and 46,XN lineages after different cultivation times in the same participant (intraindividual analysis). The two-tailed unpaired t-test was used for the intraindividual comparisons of the SCE frequencies of the 45,X and 46,XN lineages, while the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test was used for the PI. One-way ANOVA with Dunnett's post hoc multiple comparison test was used for the comparisons of SCE frequencies between 45,X and several 46,XN karyotype groups. The means for PI and for SCE frequencies of lineages 45,X and 46,XN were compared by two-tailed paired-t test. Pearson's correlation coefficient ( $r$ ) and linear regression were employed to measure the association of PI and of the SCE frequencies between 45,X and 46,XN lineages. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software, Boston, MA, USA) and Stata (StataCorp, College Station, TX, USA) statistics software.

The workflow below summarizes the methods employed in this study (Figure 1):

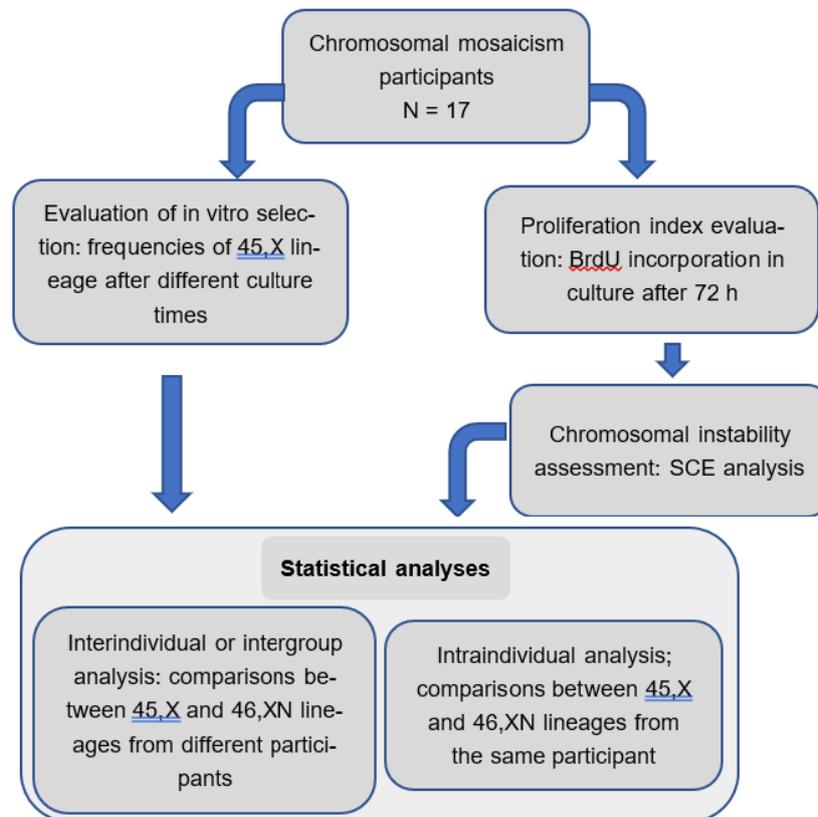


Figure 1. Flowchart showing the methods and statistical analyses used in this study.

### 3. Results

The participants had a diagnosis of TS verified by karyotype and were selected from the medical records of the Laboratory of Genetics of IPPMG and the Pediatric Endocrinology Service spanning over more than 30 years of healthcare. From this cohort of circa 124 participants, 27 were included by convenience sampling and agreed to participate in a larger study constituting the PhD thesis of one of the authors (MBC). A subset of 17 participants with mosaic TS comprises the sample of the present study. Their age ranged from 1.7 to 42 years (Table 1).

Table 1. Karyotypes of participants with Turner syndrome included in this study.

Participant	Karyotype by conventional cytogenetics and FISH	Age (yr.)
1	mos45,X/46,XX	27
2	mos45,X/46,XX	30
3	mos45,X/46,X,ish.r(X)(DXZ1+,XIST++)	16
4	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(Y)(SHOX++,SRY ++,wcpY+)	11
5	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST+)	19
6	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST+)	11
7	mos45,X/46,X,+mar.ish. der(X)(DXZ1+,XIST-)	1.7
8	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST++)	12
9	mos45,X/46,XY	31
10	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST+)	15
11	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST+)	5
12	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST++)	17
13	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST+)	22
14	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(Y)(ENY++)	23
15	mos45,X/46,XX	42
16	mos45,X/46,X,+mar.ish.der(X)(DXZ1+,XIST+)	19
17	mos45,X/46,X,i(Y)(pter->p10->pter).ish (ENY++,SRY++,SHOX++,DYZ3++)	14

Karyotype was confirmed using standard cytogenetic technique and GTG-banding for chromosomal analysis of participants 1, 2, 9, and 15, which showed besides 45,X, a typical 46,XX (1, 2, 15) or 46,XY (9) lineages. Anomalous chromosomes found in 13 participants were characterized by FISH (Figures S1 to S13).

FISH analysis showed that small supernumerary marker chromosomes (sSMC) were derived from the X chromosome in participants 5-8, 10-13, and 16 (Figures S3-S6, S7-S10, and S12). In two participants (4 and 14, Figures S2 and S11), sSMC were derived from the Y chromosome. A ring X chromosome was present in one participant (3, Figure S1) and another participant (17) presented an isochromosome of the short arm of Y chromosome Figure S13).

One copy of XIST (Xq13.2) was present in sSMC of six participants (5, 6, 10, 11, 13 and 16; Figures S3, S4, S7, S8, S10, and S12) and two copies in two participants, 3 within a ring chromosome (Figure S1), and 12 within an sSMC (Figure S9), both derived from X chromosome. In one participant (7, Figure S5), the XIST gene was not detected by hybridization on the sSMC.

The sSMC of participant 4 was positive for Y whole chromosome painting, and presented two copies of SRY and SHOX, suggesting that it was an isochromosome for the short arm of the Y chromosome (Figure S2). On the other hand, the sSMC of participant 14 presented two copies of ENY, suggesting that it was a dicentric sSMC derived from the Y chromosome (Figure S11). Participant 17 presented an isochromosome for the short arm of the Y chromosome with two copies of ENY, SRY, SHOX and DYZ3 (Figure S13).

### 3.1. In Vitro Selection

The occurrence of in vitro cell selection was verified by the amount of cells of 45,X and 46,XN lineages in cultures after 48, 72 and 96 h of incubation. No significant effect of incubation time was found in the proportion of the two lineages for most participants, with two exceptions:

- participant 3: there was a decrease in the number of metaphases in the 45,X lineage and a simultaneous increase in the number of metaphases of lineage 46,X+r(X) over the period ( $p = 0.0274$ ).
- participant 6: there was a decrease in the number of metaphases in the 45,X lineage and an increase in the number of metaphases in the 46,X+mar(X) lineage when comparing 48h and 72h incubation ( $p = 0.0234$ ).

The frequencies of 45,X and 46,XN lineages in the cultures incubated for 48, 72 and 96 h is shown in Figure S14.

The interindividual comparisons of the frequencies of 45,X and 46,XN cell lineages after different cultivation times revealed no significant difference within both 45,X and 46,XN lineages when 48h vs. 72h, 48h vs. 96h, and 72h vs. 96h were compared ( $p$  values= 0.6625, 0.8490 and 0.8803, respectively) (Figure 2).

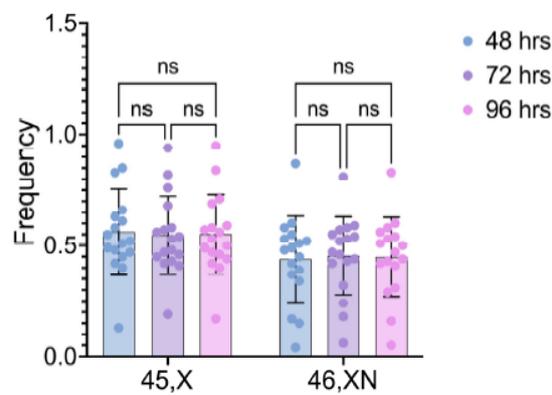


Figure 2. Frequencies of 45,X and 46,XN cell lineages after different culture times. Comparisons done within each cell lineage. ns: non-significant.

The comparisons between the two cell lineages after different cultivation times also did not detect any statistically significant differences ( $p$  values = 0.2082, 0.3511, and 0.2810, for 48h, 72h, and 96h, respectively) (Figure 3).

7

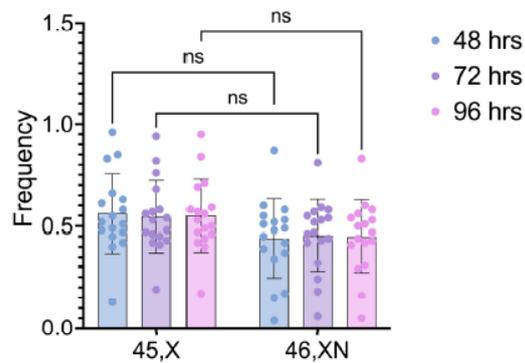


Figure 3. Frequencies of 45,X and 46,XN cell lineages after different culture times. Comparisons done between cell lineages. ns: non-significant.

### 3.2. Proliferation Index (PI)

The proliferation index (PI) of each cell lineage was calculated individually by evaluating the number of cells in first, second and third cell division, according to the BrdU incorporation pattern (Figure 4).

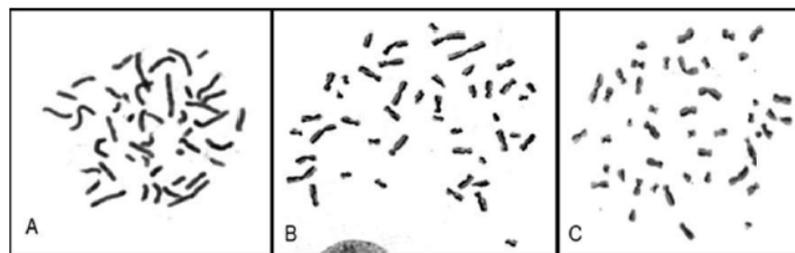


Figure 4. Metaphases in (A) first division (participant 3), (B) second division (participant 9), and (C) third division (participant 3).

The intraindividual comparisons of PI between 45,X and 46,XN lineages showed no significant differences ( $p > 0.5$ ) in participants with Turner syndrome and chromosomal mosaicism included in this study. However, the intergroup comparison of the PI means showed a significant difference between 45,X and 46,XN lineages ( $p = 0.0338$ ) (Table 2).

Table 2. Paired t test on the equality of means for the proliferation index (PI) of lineages 45,X and 46,XN.

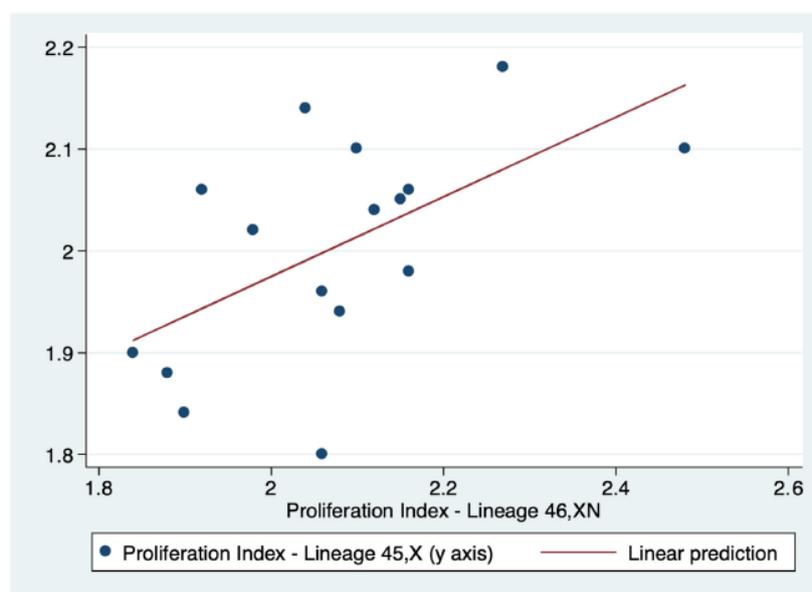
PI	N	Mean	Std. Err.	Std. Dev.(±)	95% Conf. Interval
45,X lineage	17	2.005	0.026	0.106	1.951 2.060
46,XN lineage	17	2.078	0.038	0.155	1.998 2.157
$t = -2.3211$	$p = 0.0338$				

8

There was a positive correlation between the PI of both lineages ( $r=0.5716$ ). Consequently the PI of lineages 45,X and 46,XN tended to move in the same direction: as the PI value of one lineage increased or decreased so did the value of the other lineage (Table 3). Indeed, this correlation was confirmed by linear regression ( $p = 0.017$ ) (Figure 5).

**Table 3.** Pearson's correlation for the proliferation index (PI) of lineages 45,X and 46,XN.

	Mean	Std. Dev.(±)	Min	Max	45,X PI	46,XN PI
<b>PI</b>						
45,X lineage	2.005	0.106	1.80	2.18	1.000	
46,XN lineage	2.078	0.155	1.84	2.48	0.5716	1.000



**Figure 5.** Linear regression of the proliferation index (PI) of lineages 45,X and 46,XN.

### 3.3. Sister Chromatid Exchange (SCE) Frequency

Chromosomal instability was assessed by calculating the SCE frequencies in 20 second division metaphases of each cell lineage in 72-hour cultures after BrdU labeling. The pictures of second division metaphases of the 17 participants, highlighting SCEs, along with first and third division metaphases, which are employed in PI calculation, are depicted in supplementary Figures S15-S17.

Intraindividual comparisons of SCE frequencies using the unpaired t-test showed a significant difference between the two cell lineages in five participants (2, 3, 4, 7 and 12) (Table 4).

Table 4. SCE frequencies and PI of the two cell lineages of the participants.

Participants	Lineages	SCE mean	p value	PI	$\chi^2$	p value
1	45,X	3.15	0.0551	2.05	0.9387	0.6254
	46,XX	2.6		2.15		
2	45,X	3.65	0.0454*	2.18	0.9859	0.6108
	46,XX	2.95		2.27		
3	45,X	3.95	0.0046**	2.06	1.016	0.6017
	46,X,+r(X)	5.25		2.16		
4	45,X	4.45	0.0046**	2.10	0.1640	0.9213
	46,X,+mar(Y)	3.55		2.10		
5	45,X	4.15	0.3583	2.02	0.7311	0.6938
	46,X,+mar(X)	3.75		1.98		
6	45,X	3.55	0.0779	2.04	0.4380	0.8033
	46,X,+mar(X)	4.25		2.12		
7	45,X	4.2	0.0100**	2.10	0.1829	0.9126
	46,X,+mar(X)	5.55		2.10		
8	45,X	3.45	0.0714	1.88	0.1814	0.9133
	46,X,+mar(X)	4.2		1.88		
9	45,X	3.6	0.7805	2.06	2,123	0.3460
	46,XY	3.75		1.92		
10	45,X	3.7	0.1183	1.98	3,187	0.2032
	46,X,+mar(X)	4.5		2.16		
11	45,X	3.5	0.1544	2.04	0.4600	0.7945
	46,X,+mar(X)	4.1		2.12		
12	45,X	3.8	0.0105*	1.94	1.432	0.4886
	46,X,+mar(X)	4.85		2.08		
13	45,X	4.3	0.0745	1.84	0.2741	0.8719
	46,X,+mar(X)	5.25		1.90		
14	45,X	4.4	0.5248	2.14	0.7435	0.6895
	46,X,+mar(Y)	4.7		2.04		
15	45,X	3.75	0.4647	1.80	4.399	0.1108
	46,XX	4.05		2.06		
16	45,X	4	0.5228	1.90	0.1673	0.9198
	46,X,+mar(X)	4.3		1.90		
17	45,X	4.35	0.0703	1.96	1.000	0.6065
	46,X,i(Yp)	3.3		2.06		

\*p<0.05, \*\*p<0.01.

In 3 participants (3, 7 and 12), the SCE frequencies were higher in 46,XN lineage, compared to 45,X lineage. These 46,XN lineages presented anomalous chromosomes: two participants had an sSMC derived from the X chromosome (46,X+mar(X)), and the third a ring chromosome derived from X chromosome (46,Xr(X)).

In two participants, the SCE frequencies were higher in 45,X lineage. In participant 2, it was higher in relation to 46,XX lineage, and in participant 4, it was higher in relation to the lineage with a sSMC derived from Y chromosome (46,X+mar(Y)) (Figure 6).

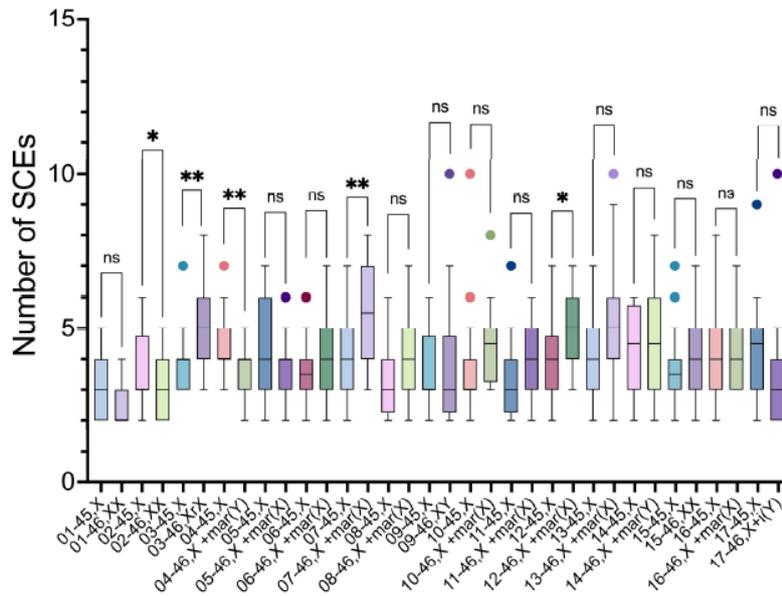


Figure 6. Intraindividual comparisons of SCE frequencies of 45,X and 46,XN lineages from the 17 participants. There were significant differences between the lineages of participants 2, 3, 4, 7, and 12. ns, non-significant ( $p > 0.05$ ), \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$

Regarding interindividual comparisons of SCE frequencies, the analysis showed no significant differences in the means of the 45,X and 46,XN lineages ( $p = 0.2871$ ) (Table 5).

Table 5. Paired t test on the equality of means for the sister chromatid exchange (SCE) frequencies of lineages 45,X and 46,XN.

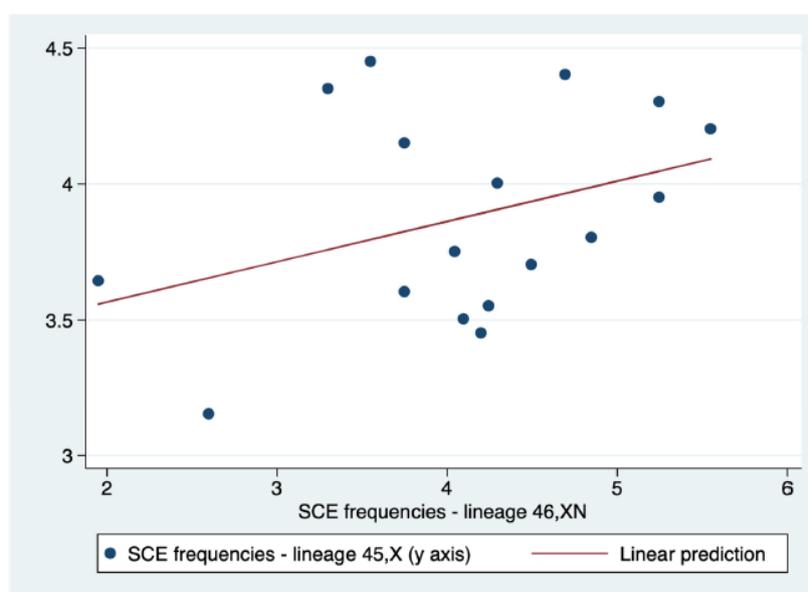
SCE	N	Mean	Std. Err.	Std. Dev. (±)	95% Conf. Interval
45,X	17	3.879	0.093	0.383	3.682 4.076
46,XN	17	4.112	0.227	0.934	3.631 4.592
$t = -1.1012$		$p = 0.2871$			

A weak correlation ( $r = 0.3615$ ) was demonstrated between 45,X and 46,XN lineages SCE frequencies. Therefore, unlike PI, the positive association between the SCE frequencies of the two lineages was weak, and it is not possible to affirm with certainty that higher values of the SCE frequency of the 45,X lineage are associated with correspondingly higher values of the SCE frequency of the 46,XN lineage (Table 6). Additionally, linear regression indicated that the relationship of SCE frequencies of the two lineages are not statistically significant ( $p = 0.154$ ) (Figure 7).

11

**Table 6.** Pearson's correlation for the sister chromatid exchange (SCE) frequencies of the lineages 45,X and 46,XN.

SCE	Mean	Std. Dev ( $\pm$ )	Min	Max	SCE 45,X	SCE 46,XN
45,X	3.879	0.383	3.15	4.45	1.000	
46,XN	4.112	0.934	1.95	5.55	0.3615	1.000



**Figure 7.** Linear regression of the sister chromatid exchange (SCE) frequencies of lineages 45,XN and 46,XN.

The intergroup comparisons of SCE frequencies among the 45,X and the distinct 46,XN lineages showed statistically significant differences between the 45,X lineage and 46,XX, 46,X,r(X), 46,X,+mar(X) lineages (p values= 0.0155, 0.0007 and <0.0001, respectively); between the 46,XX lineage and 46,Xr(X), 46,X,+mar(Y), 46,X,+mar(X) lineages (p values= <0.0001, 0.0328 and <0.0001, respectively); between the 46,X,r(X) lineage and 46,XY, 46,X,i(Yp) lineages (p values= <0.0198 and 0.0004, respectively); and the 46,X,+mar(X) lineage and 46,X,i(Yp) lineage (p value= 0.0060) (Table 7 and Figure 8).

Table 7. p-values of Šidák's multiple comparisons test to support intergroup differences of SCE frequencies among 45,X and 46,XN lineages of mosaic Turner syndrome participants.

Karyotype	46,XX	46,Xr(X)	46,X+mar(Y)	46,X+mar(X)	46,XY	46,X+i(Yp)
45,X	0.0151*	0.0007*	0.9995	<0.0001*	>0.9999	0.8204
46,XX		<0.0001*	0.0328*	<0.0001*	0.9542	>0.9999
46,Xr(X)			0.0841	0.4991	<0.0198*	0.0004*
46,X+mar(Y)				0.9079	0.9998	0.5310
46,X+mar(X)					0.3630	0.0060*
46,XY						0.9997

\*significant values ( $p \leq 0.05$ ); mar=marker chromosome (sSMC); i=isochromosome, r=ring chromosome and p=short arm.

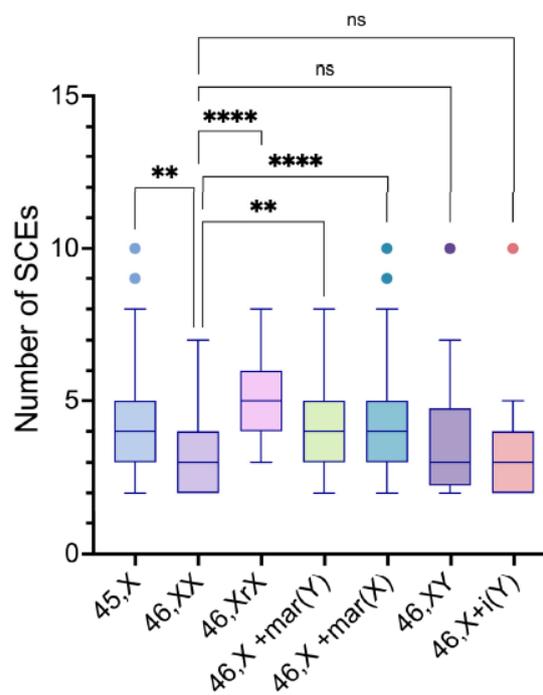


Figure 8. Intergroup comparisons of SCE frequency means among 45,X and the various 46,XN lineages found in the study participants.

#### 4. Discussion

The present study evaluated *in vitro* selection, PI and SCE frequencies of seventeen mosaic TS patients. So far in the literature, only few studies have evaluated cell proliferation of 45,X cells and of cells having other sex or autosomal chromosome anomalies [12,13,20,24,28,29,30–32]. TS individuals who carry structurally abnormal chromosomes are a unique group, and they have provided opportunities to appraise the cellular consequences of chromosomal imbalance.

Evidence of in vitro selection was observed in only two of 17 participants. Participant 3, displaying a ring X chromosome, and 6, displaying an sSMC derived from X chromosome, both of them with a decrease in monosomic cells after increased cultivation times, suggesting that there was a selective disadvantage in vitro of 45,X lineage in these participants. However, interindividual comparisons of the frequencies of 45,X and 46,XN cell lineages revealed no significant differences in the proportions of 45,X and 46,XN lineages after cultivation over time. Summarizing, results from most of the participants in this study did not reveal differences in 45,X and 46,XX cell lineages proportions in culture over time. However, differences were found eventually in some (12%) mosaic TS individuals.

Bortolai and Melaragno [23] also did not observe statistically significant differences between the proliferation of aneuploid and normal cells of a mosaic 45,X/46,XX TS patient after 48, 72 and 96 h cultivation times. We did not detect in vitro selective disadvantage of 45,X lineage in three 45,X/46,XX and one 45,X/46,XY participants in this study (Figure S14). It is possible that cultures for periods longer than 96 h are required to detect the in vitro selective disadvantage of 45,X cell lineages.

Although the intraindividual comparisons showed no significant differences between 45,X and 46,XN lineages, the intergroup comparison of the PI means of the 17 participants evaluated in this study showed a significant difference between both lineages ( $p = 0.0338$ ). PI of 46,XN lineage was slightly higher than the 45,X lineage, suggesting 45,X lineages had a proliferative disadvantage in relation to 46,XN lineages. A previous study with skin fibroblast cultures comparing differences in cell cycle of aneuploid cell lines (45,X) to cell lines with structural anomalies of the X chromosome, and normal diploid cell lines, 46,XX and 46,XY, showed the cell cycle of 45,X cell lines was significantly longer compared to euploid controls [3]. A possible explanation for this phenomenon would be a longer S phase, resulting in a prolonged inter-mitotic period in 45,X cells that could lead to a decrease in their quantity during organogenesis, which could contribute to important phenotypical features in TS [3,7].

This differential PI between 45,X and 46,XN lineages could explain the increase in the proportion of diploid cells with age in TS individuals [33], contrasting with the increase of aneuploid cells due to a loss of X chromosome in unaffected women with age [34–35].

SCE are considered to be cytological manifestations of homologous recombination. They occur naturally as events associated with normal DNA replication, with estimates being 3-4 exchanges per-cell per replication cycle [21,36]. In Bloom's syndrome, a very high SCE frequency is found, well above that of cells from unaffected individuals or individuals with any other genetic disorder. SCE can also reflect genomic instability and may serve as a preclinical biomarker for early detection of genomic instability [12,20,22]. Nonetheless, in this study, the amount of SCE in the participants was not remarkable, and the average was similar to the baseline.

SCE frequencies were significantly different between 45,X and 46,XN cell lineages in five participants. In three participants (3, 7 and 12), the SCE frequencies were higher in the lineage with a structurally anomalous sex chromosome compared to 45,X lineage. In participant 2 the SCE frequency was higher in the 45,X lineage compared to the 46,XX lineage, and in participant 4 the SCE frequency of 45,X lineage was higher than that of a lineage with sSMC derived from Y chromosome. However, interindividual comparisons of SCE frequencies revealed no significant differences in the means of 45,X and 46,XN lineages ( $p$  value = 0.2871).

Iqbal, Martin & Simpson demonstrated significantly increased mean SCE frequencies in all fibroblast cell lines with abnormalities of the X chromosome: 45,X; 46,X,del(X)(q13); 46,X,del(X)(p11); and 46,X,i(Xq) compared to normal 46,XX cell lines [37]. In our study, more than 70% of the participants presented a lineage with anomalous chromosomes and only four were mosaics with a normal female (46,XX) or male (46,XY) cell lineage. Consequently, most of the intraindividual comparisons were between cell lineages with a certain amount of genomic instability. However, we employed primary lymphocyte cultures and not established fibroblast cell lines, therefore our results may reflect more closely what is happening in mosaic TS tissues and organs.

The frequency of the Y chromosome in TS is variable [16, 38] usually being found in 3 to 12% of individuals [38-41]. The presence of Y sequences in our study was 23.5% (4/17). Probably, this higher

frequency in our study is due to the significant number of individuals with marker chromosomes (sSMC). From the 4 participants with intact or anomalous chromosomes derived from the Y chromosome, only one showed significant differences in SCE frequencies between the two lineages. Surprisingly, 45,X lineage from this participant showed higher SCE frequency than the lineage with a sSMC derived from Y chromosome cells.

As far as we know, the number of articles that have studied genomic instability in aneuploidies is limited. Yet, all data suggest that cells from Down syndrome, Edward syndrome, Turner syndrome and Patau syndrome patients may be karyotypically less stable than cells from unaffected individuals [2]. Our cross-sectional study with a sample of mosaic TS selected by convenience, with a significant number of participants with sSMC, showed some evidence that the 45,X cell lineage may have a selective disadvantage over time, although there was a significant variation concerning the differences in SCE frequencies between 45,X and 46,XN lineages. Therefore, the presence of chromosomal structural abnormalities, especially the presence of sSMC, could have been responsible for the variation of 46,XN lineages instability observed in our study.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at the website of this paper posted on Preprints.org. Figure S1: FISH results for participant 3; partial metaphases showing the presence of a ring chromosome derived from chromosome X. Figure S2: FISH results for participant 4; partial metaphases showing sSMC derived from Y chromosome. Figure S3: FISH results for participant 5; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from X chromosome. Figure S4: FISH results for participant 5; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from X chromosome. Figure S5: FISH results for participant 7; interphase cells showing an sSMC derived from chromosome X. Figure S6: FISH results for participant 8; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from X chromosome. Figure S7: FISH results for participant 10; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from X chromosome. Figure S8: FISH results for participant 11; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from X chromosome. Figure S9: FISH results for participant 12; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from X chromosome. Figure S10: FISH results for participant 13; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from X chromosome. Figure S11: FISH results for participant 14; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from Y chromosome. Figure S12: FISH results for participant 16; partial metaphases showing the presence of an sSMC derived from X chromosome. Figure S13: FISH results for participant 17; partial metaphases showing isochromosome for short arm of Y chromosome. Figure S14: Frequencies of 45,X and 46,XN cell lineages after different incubation times. Figure S15: Micrographs of metaphases in second division of participants 1 to 6 displaying sister chromatid exchanges. Figure S16: Micrographs of metaphases in second division of participants 7 to 12 displaying sister chromatid exchanges. Figure S17: Micrographs of metaphases in second division of participants 13 to 17 displaying sister chromatid exchanges.

**Author Contributions:** MBG performed experiments, interpreted the results and drafted the initial manuscript. EVN performed the statistical analysis, interpreted the results, drafted the initial manuscript, and participated in its design and coordination. DRNG drafted and edited the initial manuscript. ISP, MMG, KF, NCKS and MGR accomplished participant clinical diagnosis and evaluation. LSB executed technical support. AFF performed G-banding analysis. MCMR reviewed all laboratory results, participated in its design and coordination. MGR participated in its design and coordination. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded by Rio de Janeiro State Research Foundation – FAPERJ (Jovem Cientista do Nosso Estado RJ 2008/ MGR; E-26/103.116/2008 FAPERJ) and National Council for Scientific and Technological Development – CNPq.

**Institutional Review Board Statement:** This study was performed in accordance with the Guidelines and Standards for Research in Human Beings, established by Brazilian National Health Council and with the guidelines of the Declaration of Helsinki. Ethics approval was obtained from the Research Ethics Review Board of Institute of Childcare and Pediatrics Martagão Gesteira (IPPMG), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) (protocol code: 2.768.383; date of approval: 12 July 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all participants, or their parents involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available by the corresponding author upon request.

**Acknowledgments:** We acknowledge Dr. Marcelo Gerardin Poirot Land and Dr. Elaine Sobral da Costa for their support in laboratory maintenance and infrastructure improvements; Sandra Alves Peixoto Pellegrini *in memoriam* for technical support; and Dr. Karinne Condack Mafort Branco for clinical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Radonova L, Svobodova T, Anger M. Regulation of the cell cycle in early mammalian embryos and its clinical implications. *The International Journal of Developmental Biology*. 2019 Feb 6;63(3–4–5):113–22. Doi: 10.1387/ijdb.180400ma
- Potapova TA, Zhu J, Li R. Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos. *Cancer Metastasis Rev*. 2013 Dec;32(3–4):377–89. Doi:10.1007/s10555-013-9436-6.
- Álvarez-Nava F, Soto-Quintana M. The Hypothesis of the Prolonged Cell Cycle in Turner Syndrome. *J Dev Biol*. 2022 May 11;10(2):16. Doi:10.3390/jdb10020016
- Oliveira RMR de, Verreschi IT do N, Lipay MVN, Eça LP, Guedes AD, Bianco B. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J*. 2009 Nov;127(6):373–8. Doi:10.1590/s1516-31802009000600010
- Gravholt CH, Viuff MH, Brun S, Stochholm K, Andersen NH. Turner syndrome: mechanisms and management. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 Oct;15(10):601–14. Doi: 10.1038/s41574-019-0224-4
- Marzuki NS, Anggaratri HW, Suciati LP, Ambarwati DD, Paramayuda C, Kartapradja H, et al. Diversity of sex chromosome abnormalities in a cohort of 95 Indonesian patients with monosomy X. *Molecular Cytogenetics*. 2011 Oct 12;4(1):23. Doi:10.1186/1755-8166-4-23
- Simpson JL, Lebeau MM. Gonadal and statural determinants on the X chromosome and their relationship to in vitro studies showing prolonged cell cycles in 45,X; 46,X,del(X)(p11); 46,X,del(X)(q13); and 46,X,del(X)(q22) fibroblasts. *Am J Obstet Gynecol*. 1981 Dec 15;141(8):930–40. Doi:10.1016/s0002-9378(16)32685-0
- Álvarez-Nava F, Lanes R. Epigenetics in Turner syndrome. *Clin Epigenetics*. 2018;10:45. Doi: 10.1186/s13148-018-0477-0
- Trolle C, Nielsen MM, Skakkebaek A, Lamy P, Vang S, Hedegaard J, et al. Widespread DNA hypomethylation and differential gene expression in Turner syndrome. *Sci Rep*. 2016 Sep 30;6:34220. Doi:10.1038/srep34220
- Thompson SL, Bakhom SF, Compton DA. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol*. 2010 Mar 23;20(6):R285–295. Doi:10.1016/j.cub.2010.01.034
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med*. 2009 May;15(5):577–83. Doi: 10.1038/nm.1924
- Salawu A, Wright K, Al-Kathiri A, Wyld L, Reed M, Sisley K. Sister Chromatid Exchange and Genomic Instability in Soft Tissue Sarcomas: Potential Implications for Response to DNA-Damaging Treatments. *Sarcoma*. 2018;2018:3082526. Doi:10.1155/2018/3082526
- Cobanoglu H, Cayir A. Assessment of the genotoxic potential of tetrachlorvinphos insecticide by cytokinesis-block micronucleus and sister chromatid exchange assays. *Hum Exp Toxicol*. 2021 Dec;40(12\_suppl):S158–63. Doi:10.1177/09603271211036126
- Montenegro MM, Quao CR, Palmeira P, Gasparini Y, Rangel-Santos A, Damasceno J, et al. Gene expression profile suggesting immunological dysregulation in two Brazilian Bloom's syndrome cases. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Feb 19;8(4):e1133. Doi:10.1002/mgg3.1133
- Bianco B, Nunes Lipay MV, Guedes AD, Verreschi ITN. Clinical implications of the detection of Y-chromosome mosaicism in Turner's syndrome: report of 3 cases. *Fertility and Sterility*. 2008 Oct 1;90(4):1197.e17–1197.e20. Doi:10.1016/j.fertnstert.2007.09.014
- Bispo AVS, Burégio-Frota P, Oliveira dos Santos L, Leal GF, Duarte AR, Araújo J, et al. Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case. *Reprod Fertil Dev*. 2014 Oct;26(8):1176–82. Doi:10.1071/RD13207
- Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, et al. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen*. 1998;31(3):228–42.
- Melaragno MI, Ribeiro MC, Smith M de A, Andrade JA, Erwenne CM. Sister chromatid exchange frequency in a retinoblastoma mosaic patient with del(13). *Cancer Genet Cytogenet*. 1988 Jun;32(2):177–81. Doi: 10.1016/0165-4608(88)90280-4
- Oztas S, Gullulu G, Tatar A, Astam N, Akyol I, Karakuzu A, et al. Chromosome and sister chromatid exchange studies in Behçet's patients. *J Dermatol*. 2006 Jun;33(6):406–10. Doi: 10.1111/j.1346-8138.2006.00096.x

20. Xu J, Liu P, Meng X, Bai J, Fu S, Guan R, et al. Association between sister chromatid exchange and double minute chromosomes in human tumor cells. *Molecular Cytogenetics*. 2015 Nov 19;8(1):91. Doi: 10.1186/s13039-015-0192-x
21. Wilson DM, Thompson LH. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007 Mar 1;616(1):11–23. Doi: 10.1016/j.mrfmmn.2006.11.017
22. Latt SA, Schreck RR. Sister chromatid exchange analysis. *Am J Hum Genet*. 1980 May;32(3):297–313.
23. Bortolai A, Melaragno MI. Cell-cycle kinetics of cell lines from patients with chromosomal mosaicism. *Ann Genet*. 2001 Apr-Jun;44(2):93–7. Doi: 10.1016/S0003-3995(01)01070-X
24. Rafferty K, Archer KJ, Turner K, Brown R, Jackson-Cook C. Trisomy 21-associated increases in chromosomal instability are unmasked by comparing isogenic trisomic/disomic leukocytes from people with mosaic Down syndrome. *PLoS One*. 2021;16(7):e0254806. Doi: 10.1371/journal.pone.0254806
25. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*. 1960 Sep 1;20(3):613–6. Doi:10.1016/0014-4827(60)90138-5
26. Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 1974 Sep;251(5471):156–8. Doi: 10.1038/251156a0
27. Korenberg JR, Freedlender EF. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*. 1974;48(4):355–60. Doi: 10.1007/BF00290992
28. Butler MG. Sister Chromatid Exchanges in A Male With A Y/Y Translocation. *Trans Nebr Acad Sci Affil Soc*. 1981;9:9–11.
29. Heidemann A, Schmalenberger B, Zankl H. Sister chromatid exchange and lymphocyte proliferation in a Down syndrome mosaic. *Clin Genet*. 1983 Feb;23(2):139–42. Doi: 10.1111/j.1399-0004.1983.tb01862.x
30. Santovito A, Gendusa C, Cervella P. Evaluation of baseline frequency of sister chromatid exchanges in an Italian population according to age, sex, smoking habits, and gene polymorphisms. *Am J Hum Biol*. 2017 Nov;29(6). Doi:10.1002/ajhb.23034
31. Landi S, Frenzilli G, Milillo PC, Cocchi L, Sbrana I, Scapoli C, et al. Spontaneous sister chromatid exchange and chromosome aberration frequency in humans: the familial effect. *Mutat Res*. 1999 Aug 18;444(2):337–45. Doi: 10.1016/s1383-5718(99)00094-7
32. Laurie CC, Laurie CA, Rice K, Doheny KF, Zelnick LR, McHugh CP, et al. Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer. *Nat Genet*. 2012 May 6;44(6):642–50. Doi:10.1038/ng.2271
33. Denes AM, Landin-Wilhelmsen K, Wettergren Y, Bryman I, Hanson C. The proportion of diploid 46,XX cells increases with time in women with Turner syndrome—a 10-year follow-up study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2015 Feb;19(2):82–7. Doi:10.1089/gtmb.2014.0240
34. Machiela MJ, Zhou W, Karlins E, Sampson JN, Freedman ND, Yang Q, et al. Female chromosome X mosaicism is age-related and preferentially affects the inactivated X chromosome. *Nat Commun*. 2016 Jun 13;7(1):11843. Doi:10.1038/ncomms11843
35. Catalán J, Falck GCM, Norppa H. The X Chromosome Frequently Lags Behind in Female Lymphocyte Anaphase. *Am J Hum Genet*. 2000 Feb;66(2):687–91. Doi: 10.1086/302769
36. Payne M, Hickson ID. Genomic instability and cancer: lessons from analysis of Bloom's syndrome. *Biochem Soc Trans*. 2009 Jun;37(Pt 3):553–9. Doi:10.1042/BST0370553
37. Iqbal MA, Martin AO, Simpson JL. Increased sister chromatid exchanges in human cell lines characterized by monosomy X or structural abnormalities of the X chromosome. *Hum Genet*. 1984;68(3):205–8. Doi:10.1007/BF00418389
38. Gravholt CH, Viuff M, Just J, Sandahl K, Brun S, van der Velden J, et al. The Changing Face of Turner Syndrome. *Endocr Rev*. 2023 Jan 12;44(1):33–69. Doi: 10.1038/s41574-019-0224-4
39. Thunström S, Landin-Wilhelmsen K, Bryman I, Hanson C. Side differences in the degree of mosaicism of the buccal mucosa in Turner syndrome. *Mol Genet Genomic Med*. 2019 Aug 29;7(10):e00938. Doi:10.1002/mgg3.938
40. Liehr T, Mrasek K, Hinreiner S, Reich D, Ewers E, Bartels I, et al. Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC) in Patients with a 45,X/46,X,+mar Karyotype – 17 New Cases and a Review of the Literature. *Sexual Development*. 2008 Jan 18;1(6):353–62. Doi: 10.1159/000111767
41. Wang H, Wang T, Yang N, He Y, Chen L, Hong L, et al. The clinical analysis of small supernumerary marker chromosomes in 17 children with mos 45,X/46,X,+mar karyotype. *Oncol Lett*. 2017 Jun;13(6):4385–9. Doi: 10.3892/ol.2017.5965

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## ARTIGO REALIZADO EM COLABORAÇÃO



GLOBAL JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH: F  
DISEASES  
Volume 20 Issue 13 Version 1.0 Year 2020  
Type: Double Blind Peer Reviewed International Research Journal  
Publisher: Global Journals Inc. (USA)  
Online ISSN: 2249-4618 & Print ISSN: 0975-5888

## Complex sSMC Involving X and Y Chromosomes in two Patients with 45,X/46,X,+mar Karyotype

By Miriam Beatriz Goulart, Monique Oliveira Freitas, Evelyn Kahn,  
Marilia Martins Guimarães, Isaias Soares Paiva, Sandra Alves Peixoto Pellegrini,  
Maria Cecilia Menks Ribeiro & Marcia Gonçalves Ribeiro

*Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)*

**Abstract-** Complex small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) consist of chromosomal material derived from two or more different chromosomal regions and constitute one of the smallest subsets of sSMC. Most of complex sSMCs are represented by a der(22)t(11;22) in Emanuel syndrome. As far as we know, only one recent report has described sSMCs involving simultaneously X and Y chromosomes in Turner Syndrome.

We report two patients, a female and a male, both with a complex sSMC derived from X and Y chromosomes in mosaic with a 45,X cell line. In both patients, the marker chromosomes were early replicating and the *XIST* gene was absent. FISH and PCR confirmed the presence of Yp loci (*TSPY*, *AMGY*, *SRY*, *DYZ3*), and negative for *DYZ1*. The *DAZ4* sequence was present only in patient 1. Our findings suggested that complex sSMC involving X and Y chromosome could be a kind of sSMC of the gonosomes.

**Keywords:** *molecular cytogenetics, mosaicism, sex chromosomes, complex small supernumerary marker chromosome, turner syndrome.*

**GJMR-F Classification:** NLMC Code: QS 677



*Strictly as per the compliance and regulations of:*



© 2020. Miriam Beatriz Goulart, Monique Oliveira Freitas, Evelyn Kahn, Marilia Martins Guimarães, Isaias Soares Paiva, Sandra Alves Peixoto Pellegrini, Maria Cecilia Menks Ribeiro & Marcia Gonçalves Ribeiro. This is a research/review paper, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 Unported License <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>, permitting all non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

# Complex sSMC Involving X and Y Chromosomes in two Patients with 45,X/46,X,+mar Karyotype

Miriam Beatriz Goulart <sup>α1</sup>, Monique Oliveira Freitas <sup>β1</sup>, Evelyn Kahn <sup>ρ</sup>, Marília Martins Guimarães <sup>ω</sup>,  
Isaias Soares Paiva <sup>ξ</sup>, Sandra Alves Peixoto Pellegrini <sup>ξ</sup>, Maria Cecília Menks Ribeiro <sup>x</sup>  
& Marcia Gonçalves Ribeiro <sup>y</sup>

**Abstract**—Complex small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) consist of chromosomal material derived from two or more different chromosomal regions and constitute one of the smallest subsets of sSMC. Most of complex sSMCs are represented by a der(22)t(11;22) in Emanuel syndrome. As far as we know, only one recent report has described sSMCs involving simultaneously X and Y chromosomes in Turner Syndrome.

We report two patients, a female and a male, both with a complex sSMC derived from X and Y chromosomes in mosaic with a 45,X cell line. In both patients, the marker chromosomes were early replicating and the *XIST* gene was absent. FISH and PCR confirmed the presence of Yp loci (*TSPY*, *AMGY*, *SRY*, *DYZ3*), and negative for *DYZ1*. The *DAZ4* sequence was present only in patient 1. Our findings suggested that complex sSMC involving X and Y chromosome could be a kind of sSMC of the gonosomes.

**Keywords:** molecular cytogenetics, mosaicism, sex chromosomes, complex small supernumerary marker chromosome, turner syndrome.

## I. INTRODUCTION/BACKGROUND

Complex small supernumerary marker chromosome (sSMC) consist of chromosomal material derived from two or more different chromosomal regions (Liehr, 2012). sSMC are only identifiable by molecular cytogenetic analysis, because their size and the variability of involved chromosomal regions (Trifonov *et al.*, 2008). The characterization of the structure, regions and genes involved in the sSMC are important for the genotype-phenotype correlation (Liehr, 2012).

**Corresponding Authors** †: Laboratório de Genética do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). e-mails: miriamgou@gmail.com, niquecullen@gmail.com

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this manuscript.

**Author** § x: Laboratório de Genética do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

**Author** ρ v: Serviço de Genética Médica do IPPMG, UFRJ.

e-mails: ekahn@terra.com.br, marciagen@yahoo.com.br

**Author** ω: Serviço de Endocrinologia Pediátrica do IPPMG, UFRJ.

e-mail: marguima54@gmail.com

**Author** ξ: UNIGRANRIO and UNIFESO. e-mail: ispaiva@gmail.com

**Author** x: Laboratório NUMPEX-BIO. Campus Duque de Caxias. UFRJ. e-mail: cecilia.menks@gmail.com

Complex sSMC constitute 8.4% of all sSMC, and are observed mainly in Emanuel syndrome (ES; 82.2%) (Liehr *et al.*, 2013). Fewer than 100 cases are known (Liehr *et al.*, 2013). Excluding ES cases, as they are difficult to identify and their frequency is underestimated (Trifonov *et al.*, 2008; Liehr *et al.*, 2013).

Parental studies in 57 complex sSMCs (excluding ES) showed that 36% of them were *de novo*, and the remainder (64%) were inherited from a balanced translocation in one parent. Mosaic cases with karyotype 47,XN,+mar/46,XN were only seen in *de novo* complex sSMCs (Liehr *et al.*, 2013).

sSMC can be present in numerically abnormal karyotype like in a Turner syndrome (TS) karyotype (45,X/46,X,+mar), leading to female or male phenotypes (Liehr *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2017). In TS, the sSMC are derived from one of the gonosomes in more than 99% of the cases; there are also exceptional reports on sSMC derived from autosomes (Liehr *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2017; Sheth *et al.*, 2009; Jafari-Ghahfarokhi *et al.*, 2015).

Recently, a complex sSMC from X and Y chromosomes have been described in a Turner syndrome (Li *et al.*, 2020). Here we report two mosaic patients, a TS patient and an unidentified syndrome male, with a 45,X cell line and a cell line with complex sSMC involving X and Y chromosomes, characterized by Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and Polymerase Chain Reaction (PCR).

## II. METHODS

Patient 1 (P1) come from a cohort of 21 TS patients with marker chromosomes, and Patient 2 (P2) from another cohort of 19 patients with uncharacterized marker chromosomes, evaluated in Cytogenetic Laboratory of IPPMG, UFRJ. The informed consent was obtained from the patients or their parents (Approved by the Ethics Committee of IPPMG/UFRJ nº 13/09).

Chromosomes were examined using G banding and differential replication staining (late BrdU labelling). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were performed using commercial probes: Whole Chromosome Painting (wcp) X and Y, XYpter and XYqter, *SHOX* (Xp22 and Yp11.3), *KAL1* and *STS* (Xp22.3); *XIST* (Xq13.2), *DYZ3* (Yp11.1-q11.1), *SRY*

(Yp11.31) and DYZ1 (Yq12), according manufacturers' instructions.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood using a commercial DNA isolation kit and the polymerase chain reaction (PCR) was performed using six primers sets for Y-chromosome-specific sequences: *SRY* (Yp11.31), *TSPY1* (Yp11.2), *AMGY* (Yp11.2), *DAZ4* (Yq11.23), *DYZ3* (Yp10-q10) and *DYZ1* (Yq12).

### III. CLINICAL INFORMATIONS

**P1:** female, referred at 7 years of age due to short stature. First child of an unrelated couple, a young mother and an unknown father. Vaginal delivered at 40<sup>th</sup> week gestation; birth weight of 2.6kg and birth length of 48cm. She developed short stature, developmental delay and intellectual disability. Menarche was induced at 17<sup>th</sup> year. On physical examination at 30<sup>th</sup> year she presented: short stature (145cm; not treated with growth hormone), relative macrocephaly, ocular hypertelorism, high-arched palate, short neck, low posterior hairline, shield shaped thorax, widely spaced nipples, cubitus valgus, multiple pigmented nevi, hyperconvex nails, hypoplasia of the second toe, bicuspid aortic valve and obesity (Fig. 1a) and a typically female external genitalia.

Ultrasound examination showed reduced uterus and unidentified ovaries. Prophylactic gonadectomy was recommended.

**P2:** male, referred at 4 years of age due to neuropsychomotor developmental delay, autistic behaviour, aggressiveness and hyperactivity. First child of a healthy and unrelated young couple. Maternal thrombocytopenia. Vaginal delivered at 38<sup>th</sup> week gestation; birth weight of 2.3Kg, birth length of 47cm and head circumference of 32cm. He didn't walk until his 15<sup>th</sup> month of age. Speech delay was evident by 2 years of age. Recurrent episodes of pneumonia. On physical examination at 8 years, he presented triangular face, ocular hypertelorism, arched eyebrows, long eyelashes, long palpebral fissures, high-arched palate, diastema, widely spaced nipples, single transverse palmar crease (Fig. 1b) and a typically male external genitalia (normal scrotum, palpable testes and a normal sized penis). Ultrasound examination showed normal prostate size and absente Müllerian remnants. No specific syndrome could be related to this patient clinical symptoms.



**Figure 1:** Appearance of P1 and P2: a) P1: 30-years-old, woman showing minor facial dysmorphic features and hypoplasia of the second toe. b) P2: 8-years-old, boy phenotype showing minor facial dysmorphic features, ocular hypertelorism and bilateral transverse palmar crease.

**P1:** Karyotype was 45,X/46,X,+mar; the marker chromosome was a dicentric sSMC, with early replication, and alternating morphology. The mother presented normal karyotype.

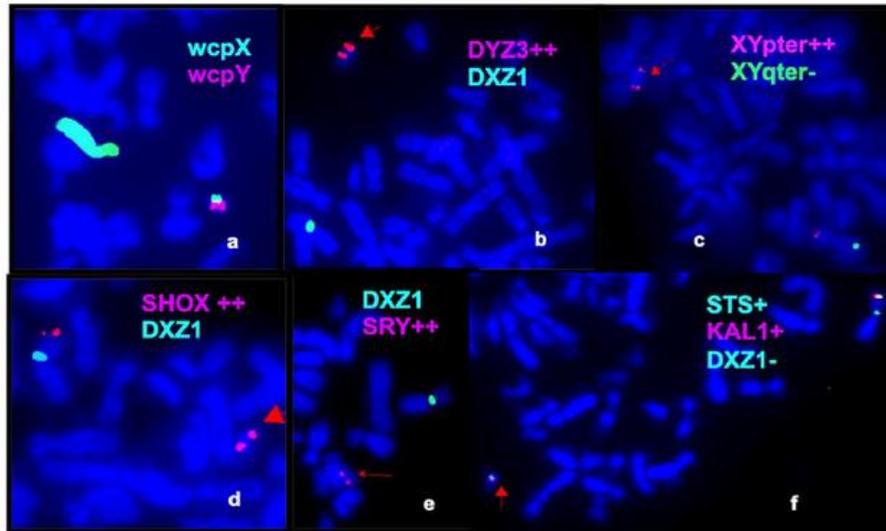
The sSMC was positive for both X and Y with wcp, and presented two copies of XYpter, *DYZ3*, *SRY* and *SHOX*, one copy of *KAL1* and *STS*; was negative for *XIST*, *DYZ1* and XYqter (Fig. 2). The wcp analysis also showed the presence of cryptic cell populations, one with the presence of an sSMC derived from

chromosome X(wcpX+) and another with a sSMC derived from chromosome Y(wcpY+), but the frequency of these cells was too low to be determined. The frequency of nuclei with two DXZ1 signals was 1,7%. In each metaphase only one sSMC was observed.

PCR was positive for *TSPY1*, *AMGY*, *SRY*, *DYZ3* and *DAZ4*, and negative for *DYZ1*.

The redefined karyotype was: mos 45,X/46,X,+mar.ish.der(X;Y)(DYZ3++,SHOX++,SRY++,KAL1+,XYpter++,wcpX+,wcpY+,XIST-,STS-,DXZ1-,DYZ1-)

## COMPLEX SSMC INVOLVING X AND Y CHROMOSOMES IN TWO PATIENTS WITH 45,X/46,X,+mar KARYOTYPE



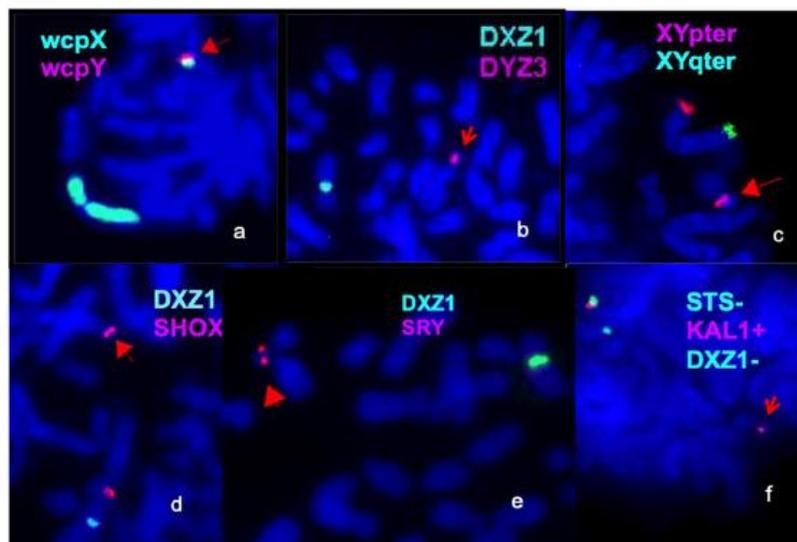
**Figure 2:** FISH results for P1. Partial metaphases showing the presence of: a) both signals of wcpX and wcpY (red arrow) indicating the participation of X and Y chromosomes in complex sSMC; b) two copies of DYZ3 (red arrow); c) two copies of XYpter (red arrow); d) two copies of SHOX (red arrow); e) two copies of SRY (red arrow) and f) one copy of STS/ KAL1 (red arrow).

**P2:** Karyotype was 45,X/46,X,+mar, the marker chromosome was a *de novo* ring sSMC, early replicating. Both parents presented normal karyotype.

The sSMC was positive simultaneously for X and Y with wcp, and presented one copy of XYpter, DYZ3, SRY, SHOX, and KAL1; it was negative for XIST, STS, DYZ1(Yq12) and XYqter (Fig. 3). Sometimes the sSMC appeared to be dicentric.

PCR was positive for TSPY, AMGY, SRY, DYZ3 and negative for DAZ4 and DYZ1.

The redefined karyotype was: mos 45,X/46,X,+mar.ish.der(X;Y)(DYZ3+,SHOX+,SRY+,KAL1+,XYpter+,wcpX+,wcpY+,XIST-,STS-,DXZ1-,DYZ1-)



**Figure 3:** FISH results for P2. Partial metaphases showing the presence of: a) both signals of wcpX and wcpY (red arrow) indicating the participation of X and Y chromosomes in complex sSMC; b) DYZ3 (red arrow); c) XYpter (red arrow); d) SHOX (red arrow); e) SRY (red arrow) and f) KAL1 (red arrow).

#### IV. DISCUSSION AND CONCLUSION

We report two original cases of complex sSMC, a TS patient and a unidentified syndrome male patient involving X and Y chromosomes, both mosaic with a 45,X cell line. Molecular techniques were crucial to determine the presence of the Y chromosome material in these patients. The presence of Y chromosome segments could increase the risk for gonadoblastoma. Prophylactic gonadectomy is recommended by expert consensus in TS patients with euchromatic Y-chromosome, due to an increased risk (around 10%) of gonadoblastoma (Gravholt *et al.*, 2017). The gonadectomy was recommended to P1.

In P2, the sex differentiation and a normal male external genital were possible because of the presence of *SRY* gene, despite of a 45,X lineage. The clinical variability could be strongly influenced by the concentration and distribution of the 45,X cell line in the various tissues, and the differential expression of genes located on the Y chromosome (Patsalis *et al.*, 2005; Lindhardt *et al.*, 2012). Males with a 45,X/46,XY karyotype and its variants seem to have a strong chance of normal testicular function (Lindhardt *et al.*, 2012). However, the association of the phenotypic characteristics with the presence or absence of Y-chromosomal loci, hosting genes other than *SRY* remains uncertain (Patsalis *et al.*, 2005; Lindhardt *et al.*, 2012). In both patients, the absence of *XIST* on sSMC, and the early replication suggested that the sSMC was not inactivated. This may lead to different clinical outcomes, especially about mental development (Liehr *et al.*, 2007). Studies in TS females have indicated that a severe phenotype and intellectual disability could be primarily caused by active partial X disomy resulting from the deletion or impaired expression of the *XIST* (Migeon *et al.*, 2000).

Complex sSMC of P1 had two copies of *SHOX* gene, and patient 2 one copy. *SHOX* haploinsufficiency have been associated with short stature and various skeletal features in TS patients, such as scoliosis, high arched-palate, and micrognathia (Li *et al.*, 2017). The short stature in P1 should be due the presence of a 45,X cell line.

Complex cryptic mosaicism for sSMC derived from chromosome X has been described earlier (Liehr, 2012; Santos *et al.*, 2010). Some Y-chromosome microdeletions in critical regions could provide instability on the Y-chromosome leading to the development of a 45,X cell line (Patsalis *et al.*, 2005). Adikusuma *et al.* (2017) using CRISPR/Cas9 technology to remove Y chromosome sequences showed that both centromere removal and chromosome shredding induced Y chromosome loss. In both P1 and P2, the rearrangement occurred near the pseudoautosomal region; this region could be prone to rearrangements because of its sequence homology. Structural

chromosome rearrangements involving both X and Y chromosomes are very unusual (Bispo *et al.*, 2014). Liehr *et al.* (2013) reviewed 73 complex sSMC (excluding ES), which only three were derived from sex chromosomes, one with material from X chromosome and two with material from the Y chromosome. Although complex markers represent a small percentage (~0.9%) of sSMCs, this may be underestimated as highlighted in recent studies applying aCGH (Reddy *et al.*, 2013). A complex sSMC involving both X and Y chromosomes in a TS patient in a group of 75 marker chromosomes, was reported (Li *et al.*, 2020).

We present the cytomolecular characterization of two original mosaicism cases with 45,X cell lines and a complex sSMCs involving X and Y chromosomes. These findings suggest that complex sSMCs involving X and Y chromosomes could be much more frequent than previously described (Bispo *et al.*, 2014).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Amanda Figueiredo and Daniela R. Ney Garcia for suggestions and critical review. Luciana Santos Barbosa and Thais Junqueira Rizzo for technical assistance. This study was supported by FAPERJ (Jovem Cientista do Nosso Estado RJ 2008/MGR; E-26/103.116/2008 FAPERJ), CNPq and CAPES.

#### Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

#### Author Contributions

MBG performed the FISH and replication experiments of patient 1, interpreted the results drafted and the initial manuscript. MOF performed the FISH and replication experiments of patient 2 and interpreted the results. ISP performed PCR. ISP, EK, MMG and MGR did patient' clinical diagnosis and treatment. SAPP performed G-banding analysis. MCMR reviewed all laboratory results, participated in its design and coordination, and helped draft the initial manuscript. MGR participated in its design and coordination, and helped draft the initial manuscript.

#### REFERENCES RÉFÉRENCES REFERENCIAS

- Adikusuma F, Williams N, Grutzner et al (2017) Targeted deletion of an Entire Chromosome Using CRISPR/Cas9. *Mol Ther.*25:1736-1738.
- Bispo AV, Burégio-Frota P, Oliveira dos Santos L, et al. (2014) Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case. *Reprod Fertil Dev* 26:1176-1182.
- Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, et al. (2017) Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International

- Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol* 177:G1-G70.
4. Jafari-Ghahfarokhi H, Moradi-Chaleshtori M, Liehr T, et al. (2015) Small supernumerary marker chromosomes and their correlation with specific syndromes. *Adv Biomed Res* 4:1-9.
  5. Li N, Zhao L, Li J, Ding Y, et al. (2017) Turner syndrome caused by rare complex structural abnormalities involving chromosome X. *Exp Ther Med* 14:2265-2270.
  6. Li, T, Sang, H, Chu, G, et al. (2020). Genotype-phenotype correlation in 75 patients with small supernumerary marker chromosomes. *Mol Cytogenet* 13: 1-15.
  7. Liehr T, Mrasek K, Hinreiner S, et al. (2007) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in patients with a 45,X/46,X,+mar karyotype - 17 new cases and a review of the literature. *Sex Dev* 1:353-362.
  8. Liehr T (2012) Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC) A Guide for Human Geneticists and Clinicians. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 241pp.
  9. Liehr T, Cirkovic S, Lalic T et al. (2013) Complex small supernumerary marker chromosomes - an update. *Mol Cytogenet* 6:1-6.
  10. Lindhardt Johansen M, Hagen CP, Rajpert-De Meyts E, et al. (2012) 45, X/46,XY mosaicism: phenotypic characteristics, growth, and reproductive function—a retrospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1540-1549.
  11. Migeon BR, Ausems M, Giltay J, et al. (2000) Severe phenotypes associated with inactive ring X chromosomes. *Am J Med Genet* 93:52-57
  12. Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, et al. (2005) Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. *Am J Med Genet A* 135:145-149.
  13. Reddy KS, Aradhya S, Meck J, et al. (2013) A systematic analysis of small supernumerary marker chromosomes using array CGH exposes unexpected complexity. *Genet Med* 15:3-13.
  14. Santos M, Mrasek K, Madrigal I, et al. (2010) Characterization of a complex cryptic mosaicism for an sSMC derived from the X chromosome present in a boy with congenital malformations. *Am J Med Genet A* 152A:2661-2663.
  15. Sheth F, Ewers E, Kosyakova N, et al. (2009) A small supernumerary marker chromosome present in a Turner syndrome patient not derived from X- or Y-chromosome: a case report. *Mol Cytogenet* 2: 1-4.
  16. Trifonov V, Fluri S, Binkert F, et al. (2008) Complex rearranged small supernumerary marker chromosomes (sSMC), three new cases; evidence for an underestimated entity? *Mol Cytogenet* 1:1-7.
  17. Wang H, Wang T, Yang N, et al. (2017) The clinical analysis of small supernumerary marker chromosomes in 17 children with mos 45, X/46,X,+mar karyotype. *Oncol Lett* 13:4385-4389.

## GLOSSÁRIO

**Anáfase:** estágio da mitose do ciclo de divisão celular, durante o qual conjuntos de cromossomos se movem para os do fuso polos opostos.

**Análogos de bases:** substâncias com estrutura semelhante à das bases nitrogenadas que podem ser incorporadas ao DNA, substituindo-a, como por exemplo a BrdU.

**Aneuploidia:** ocorre quando o número de cromossomos a mais não é múltiplo exato do número haplóide, decorrente da não disjunção de um ou mais cromossomos durante a meiose.

**Apoptose:** é uma forma de morte celular, também conhecida como morte celular programada, caracterizada pela fragmentação do DNA, vacuolização do citoplasma, alteração da membrana e morte da célula sem lise ou danos as células vizinhas. É um fenômeno normal que ocorre frequentemente no organismo.

**Cariótipo:** conjunto total de cromossomos de uma célula organizado de acordo com o tamanho, forma e número. O termo também pode ser usado, para a fotomicrografia dos cromossomos de um indivíduo sistematicamente organizado e para o processo de preparo da fotomicrografia.

**Centrômero:** é uma região constricta do cromossomo durante a mitose, que mantém as cromátides irmãs unidas. É também o local do DNA onde o cinetócoro é formado, aprendendo microtúbulos ao fuso cromático.

**Ciclina:** um membro de uma família de proteínas lábeis que são sintetizadas e degradadas em momentos específicos dentro de cada ciclo celular e regulam a progressão do ciclo celular por meio de interações com cinases dependente de ciclina (CDK.):

**Ciclo celular:** estágios ente duas divisões mitóticas sucessivas, que consiste nas fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M.

**Cinase dependente de ciclina (CDK):** um membro de uma família de cinases de proteínas, que ativado por ciclinas e um conjunto elaborado de proteínas regulatórias positivas e negativa, fosforila alguns fatores de transcrição cuja atividade é necessária para um estágio particular do ciclo celular.

**Citocinese:** processo de separação das células-filhas no final da mitose.

**Citogenética:** é a ciência que estuda os cromossomos. Ela foi formada pela associação dos conhecimentos da Citologia com os princípios da Genética, tendo a célula como objeto de estudo e, os mecanismos da herança e da continuidade genética como método.

**Corpúsculo de Barr (cromatina sexual):** uma massa densamente corada, vista no núcleo das células femininas normais, que representa o cromossomo X inativo (também conhecido como cromatina sexual).

**Cromátides:** uma cópia de um cromossomo formado pela replicação do DNA e que ainda está unida a outra através do centrômero. As duas cromátides idênticas são denominadas cromátides-irmãs.

**Cromátides irmãs:** para justaposto de cromátides que surge da replicação de um cromossomo.

**Cromatina:** O complexo de DNA e proteínas em cromossomos eucarióticos; originalmente designado assim pela facilidade com que se cora após exposto a determinados corantes.

**Cromossomo:** Estrutura composta por uma molécula de DNA muito longa e proteínas associadas, contendo informação genética de um organismo. É especialmente evidente durante a meiose ou a mitose, quando cada cromossomo é condensado, formando uma estrutura semelhante a um carretel, compacta e visível sob microscópio óptico.

**Cromossomo em anel:** decorrente de quebras em ambos os braços do cromossomo, provocando a perda das porções terminais do cromossomo e a fusão das extremidades, originando uma estrutura em anel.

**Cromossomos autossômicos:** nos seres humanos, os cromossomos de 1 a 22, excluídos os cromossomos gonossômicos ou sexuais X e Y.

**Cromossomos marcadores:** são definidos como cromossomos estruturalmente anormais, que não podem ser identificados ou caracterizados somente pela citogenética tradicional. Eles são em geral de tamanho igual ou menor do que o cromossomo 20 da mesma metáfase.

**Cromossomos homólogos:** ocorrem em pares e geralmente semelhantes em tamanho e forma, vindo um do genitor masculino e o outro da genitora. Os cromossomos contêm a mesma disposição de genes.

**Cromossomos sexuais:** Cromossomos cuja presença/ausência é correlacionada ao sexo do portador; um cromossomo que tem um papel na determinação do sexo.

**Crossing over:** um processo no qual os cromossomos trocam material genético por quebra e posterior reunião de suas moléculas de DNA.

**Deleção:** perda de uma sequência de DNA de um cromossomo. O DNA perdido pode ser de qualquer comprimento, desde uma única base a uma grande parte de um cromossomo.

**Dicêntrico:** cromossomo estruturalmente anormal com dois centrômeros.

**Diplóide:** Um organismo ou célula com dois conjuntos de cromossomos ( $2n$ ) ou dois genomas. Os tecidos somáticos dos seres humanos são de constituição cromossômica diplóide, ao contrário dos gametas (óvulos e espermatozóides) que são haplóides (monoplóides).

**DNA (Ácido desoxirribonucléico):** material genético portador de informação que compreende os genes. O DNA é uma macromolécula composta de uma longa fita ou cadeia de desoxirribonucleotídeos, unidos por ligações fosfodiéster. Cada desoxirribonucleotídeo contém um grupo fosfato, o açúcar de 5 carbonos 2-

**Endoreduplicação:** é o processo pelo qual uma célula renuncia o típico ciclo celular e em vez disso, passa por um curso alternativo de desenvolvimento que consiste em repetidas rodadas de replicação do DNA sem divisão celular.

**Epigenética:** é definida como modificações do genoma, herdável durante a divisão celular, que não envolve uma mudança na sequência do DNA.

**Estresse replicativo:** é referido a qualquer condição que envolva retardo ou impedimento na progressão da forquilha de replicação ou comprometimento da dinâmica de replicação durante a fase S do ciclo celular

**Euplóide:** Um organismo ou célula que tem um número cromossômico que é um múltiplo exato do número monoplóide ( $n$ ) ou haplóide. Termos usados para identificar níveis diferentes em uma série euplóide são diplóide, triplóide, tetraplóide etc.

**Fase  $G_0$ :** fase de repouso que pode ocorrer em  $G_1$  da interfase do ciclo celular. .

**Fase  $G_1$ :** intervalo do ciclo celular de divisão e processo meiótico que precede a fase S. Também chamado de Gap1.

**Fase  $G_2$ :** intervalo do ciclo celular de divisão e processo meiótico que segue a fase S. Também chamado de Gap2.

**Fase  $G_1/G_2$ :** intervalo da meiose II que precede a prófase II da meiose.

**Fase M:** fase mitótica do ciclo celular

**Fase S:** parte da interfase do ciclo de divisão celular, na qual ocorre a síntese do DNA.

**Fenótipo:** As manifestações externas, detectáveis, que são determinadas por um genótipo específico, que não é visível a olho nu.

**Hibridização *in situ* Fluorescente – FISH (do inglês *Fluorescence in situ Hybridization*):** é uma técnica de **citogenética molecular** que consiste na ligação de sequências de DNA marcadas com fluorocromos (sondas) aos genes ou cromossomos-alvos complementares.

**Gameta:** Uma célula haplóide, especializada, do tipo reprodutivo, que se funde com um gameta do sexo oposto para formar um zigoto diplóide; nos seres humanos são denominados de ovócito e espermatozóide.

**Gene:** são regiões funcionais ao longo da molécula de DNA que constituem os cromossomos. Cada gene é composto por uma sequência específica de DNA.

**Gene *IGFBP-2*:** esse gene é uma das proteínas carregadoras dos fatores de crescimento similares à insulina tipo I e II (IGF-I e IGF-II). Correlaciona-se inversamente com a ação do hormônio de crescimento (GH), ou seja, diminui quando o GH aumenta. Em combinação com as determinações de IGF-I e de IGFBP-3, que aumentam com a ação do GH, a IGFBP-2 pode ser usada para avaliar a ação desse hormônio. Além disso, tem sido empregada como marcador em alguns casos de carcinoma de próstata, especialmente no metastático. A expressão do IGFBP-2 aumenta durante a progressão da doença da próstata de hiperplasia prostática benigna (HPB) para câncer de próstata metastático. Observa-se que o bloqueio do IGFBP-2 parece ser uma abordagem eficaz para inibir o crescimento do tumor e a metástase.

**Gene *KDM5C*:** esse gene é membro da família homóloga SMY. Ele codifica uma proteína desmetilase. A lisina 4 da histona H3 trimetilada (*Trimethylated histone H3 lysine 4, H3K4me3*) é um substrato do KDM5C e desempenha um papel importante na regulação da transcrição gênica. Mutações nesse gene tem sido associada a deficiência intelectual ligada ao cromossomo X (*X-linked intellectual disability, XLID*).

**Gene *SHOX (short stature homeobox)*:** esse gene pertence à família dos homeobox. Ele se localiza na região pseudo-autossômica 1 (PAR1) dos cromossomos X e Y. A haploinsuficiência desse gene está associada ao atraso de crescimento idiopático, anomalias esqueléticas e ao fenótipo de baixa estatura dos indivíduos com síndrome de Turner

**Gene *SRY*:** esse gene localizado no braço curto do cromossomo Y (lócus p11.2), que possui função reguladora, disparando uma cascata de eventos que resultam na diferenciação da gônada primitiva em testículo.

**Gene *TIMP1*:** pertence à família de genes TIMP. As proteínas codificadas por esta família de genes são inibidores naturais das metaloproteinases da matriz (MMPs), um grupo de peptidases envolvidas na degradação da matriz extracelular. A transcrição deste gene é altamente induzível em resposta a muitas citocinas e hormônios. Além disso, sua expressão em alguns cromossomos X inativos sugere que a inativação deste gene é polimórfica nas mulheres.

**Gene *TIMP3*:** pertence à família de genes TIMP. As proteínas codificadas por esta família de genes são inibidores das metaloproteinases da matriz, um grupo de peptidases envolvidas na degradação da matriz extracelular (ECM). Mutações neste gene estão associadas à distrofia do fundo do olho de Sorsby, uma doença autossômica dominante.

**Gene *XIST*:** o centro de inativação do cromossomo X (XIC), localizado no braço longo do cromossomo X no lócus Xq13.3. Essa região contém o lócus do gene

**XIST.** Esse gene é expresso, exclusivamente, no XIC do cromossomo X inativo, e é essencial para o início e a propagação da inativação do X.

**Gene ZFX:** *este gene no cromossoma X é estruturalmente semelhante a um gene relacionado no cromossoma Y. Codifica um membro da família das proteínas dedo de zinco do tipo krueppel C2H2. Estudos com células hematopoiéticas progenitoras e adultas de camundongos sugeriram, que esse gene participa da regulação transcricional e da auto-renovação em ambos tipos celulares, mas é necessário para no crescimento e diferenciação das progenitoras.*

**Genótipo:** é a constituição genética de uma célula individual ou de um organismo. Combinação particular de alelos observada em um indivíduo específico.

**Haplóide:** uma célula que tem um apenas um conjunto cromossômico ou um organismo composto de tais células.

**Haploinsuficiência:** produção diminuída de um gene devido a uma mutação ou perda de um a alelo resultando num fenótipo anormal.

**Heterocromatina:** regiões cromossômicas condensadas densamente coradas, tidas como sendo na maior parte geneticamente inertes.

**Homólogo:** igual, que mantém com outro, que tem a mesma estrutura fundamental, uma relação de correspondência.

**Imprinting genômico:** é um fenômeno normal provocado pelas alterações na cromatina que ocorre na linhagem germinativa de um dos genitores, em localizações características no genoma.

**Interfase:** O estágio no ciclo celular entre duas divisões nucleares quando, os cromossomos estão distendidos e funcionalmente ativos.

**Isocromossomo:** é cromossomo estruturalmente anômalo, no qual um braço está ausente e o outro está duplicado à maneira de um espelho. O mais comum é o isocromossomo do braço longo do cromossomo X, i(Xq), presente em alguns indivíduos com ST.

**Linfócito:** é um tipo de célula no sangue responsável pela especificidade da resposta imune adaptativa. Há dois tipos principais: as células B, que produzem anticorpos, e as células T, que interagem diretamente com outras células efetoras do sistema imune e com as células infectadas.

**Linhagem:** A progênie de uma célula, geralmente determinada por marcação experimental das células, de modo que todos os seus descendentes possam ser identificados.

**Ligado ao X:** O padrão de herança de genes encontrados no cromossomo X, mas não no cromossomo Y.

**Ligado ao Y:** O padrão de herança de genes encontrados no cromossomo Y, mas não no cromossomo X (raro).

**Lócus:** posição ocupada por um determinado gene ao cromossomo. Cada cromossomo carrega muitos genes. **Loci:** plural de lócus.

**Meiose:** duas divisões nucleares sucessivas (com as correspondentes divisões celulares) que produzem gametas (animais e humanos) ou esporos (plantas e fungos), que têm metade do material genético da célula original.

**Microtúbulos:** parte de um sistema cabos d maior diâmetro do citoesqueleto, Eles são compostos de subunidades polimerizadas de tubulina formando um tubo oco.

**Mitose:** processo de divisão celular comum, que resulta na formação de duas células geneticamente idênticas a célula-mãe.

**Metáfase:** Um estágio intermediário da divisão nuclear no qual os cromossomos se alinham no plano equatorial da célula.

**Monossomia:** é o cariótipo em que um dos cromossomos do par está ausente, formando uma constituição cromossômica com 45 cromossomos, como por exemplo, na ST.

**Mosaicismo cromossômico:** é definido pela presença de duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes em um único indivíduo.

**Nucleotídeo:** Uma molécula composta de uma base nitrogenada, um açúcar e um grupo fosfato; o bloco estrutural dos ácidos nucléicos.

**Par de bases:** Dois nucleotídeos em uma molécula de RNA ou DNA que estão emparelhados por ligações de hidrogênio- por exemplo, G com C e A com T.

**Poliploidia:** descreve uma célula ou um organismo que contém mais de dois conjuntos de cromossomos. É muito comum nas plantas, mas rara em animais ou humanos.

**Pontos de checagem (checkpoints):** é uma etapa no ciclo celular dos eucariontes, na qual ciclo pode se suspenso até que as condições sejam apropriadas para avançar para continuar o processo de divisão. Há vários checkpoints, mas os mais importantes são três: checkpoint G1, na transição G1/S; checkpoint G2 na transição G2/M e o checkpoint do fuso mitótico, na transição metáfase para anáfase.

**Poteína ligase de ubiquitina(CHRF):** é uma ligase de ubiquitina responsável pela ubiquitinação\* de proteínas alvo, como as cinases PLK1 e Aurora A, favorecendo sua degradação pelo proteossomo.

**Reação em cadeia da polimerase (PCR):** é um método *in vitro* para amplificar um segmento específico de DNA que usa dois *primers* que se hibridizam com pontas opostas do segmento em polaridade oposta e, durante ciclos sucessivos, iniciam a replicação exponencial apenas desse segmento.

**Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR):** é uma técnica que tem como principais características a detecção e quantificação de fluorescência emitida durante cada ciclo de uma reação de PCR e a sensibilidade de detectar poucas cópias de DNA presentes em uma dada amostra.

**Rearranjo:** A produção de cromossomos anormais pela quebra e reunião incorreta dos segmentos cromossômicos; são exemplos as inversões, deleções e translocações.

**Regiões pseudoautossômicas(PAR1 e PAR2):** são regiões cromossômicas homólogas na extremidade do cromossomo X ou do cromossomo Y. Estas duas regiões pareiam com frequência durante a meiose masculina e sofrem recombinação. A região pseudoautossômica 1 (PAR1) está localizada na ponta dos braços curtos 'p' (Xp22 e Yp11) e a região pseudoautossômica 2 (PAR2) está localizada na ponta dos braços longos 'q' (Xq28 e Yq12).

**RNA (ácido ribonucleico):** Um ácido nucleico unifilamentar similar ao DNA, mas tendo o açúcar ribose, em vez de desoxirribose, e uracil, em vez de timina, como uma de suas bases.

**Retinoblastoma:** é um câncer ocular raro, mais comumente encontrado em crianças, correspondendo a 3% dos cânceres infantis.

**Segregação:** é a produção de dois fenótipos separados, correspondendo a dois alelos de um gene, seja em indivíduos diferentes (segregação meiótica) ou em tecidos diferentes (segregação mitótica).

**Segregação cromossômica:** A separação de um cromossomo na divisão celular, de modo que cada célula filha recebe um número igual de cromossomos.

**Telófase:** O estágio final da mitose ou da meiose, no qual as células-filhas se separam.

**Telômero:** extremidade de um cromossomo, associado com a sequência de DNA característica que é replicada várias vezes. Essa região está associada a proteínas que evitam que os cromossomos se unam uns aos outros, pois um cromossomos quebrados tendem a se fundir.

**Translocação:** a relocação de um segmento cromossômico para uma posição diferente da original.

**Tretrassomia:** é uma anomalia dos cromossomos causada pela presença de dois cromossomos extras em indivíduos, como por exemplo, na tetrassomia do cromossomo X (48,XXXX, em vez de 46,XX).

**Trissomia:** presença de cópias ou representantes de um mesmo cromossomo, em vez do par usual, como acontece na trissomia do 21 (Síndrome de Down) pela presença de três cromossomos 21.

**Tumores hematopoiéticos:** são tumores de células progenitoras sanguíneas que se subdividem, principalmente em tumores de linhagem linfóide ou linhagem mielóide.

**Tumores sólidos:** estruturas complexas caracterizadas pela existência de células cancerígenas e seu microambiente tumoral, que podem incluir fibroblastos, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais, células imunes.

**\*Ubiquitinação:** consiste na marcação de proteínas-alvo por moléculas de Ub, encaminhando-as a diferentes destinos, sendo os mais conhecidos: ativação ou inativação da proteína marcada, mudança de localização ou função e degradação.

### **Bibliografia:**

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2010. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª Edição. Editora Artmed.

GENECARD disponível em:<<https://www.genecard.org>> Acesso em: 06 de out. 2023.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* *Introdução à Genética*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 742p.

HERSHKO, A. *et al.* Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **J Biol Chem**, v. 258, n. 13, p. 8206–14, 1983.

THOMPSON & THOMPSON. *Genética médica*. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 525p.