

CITOGENÉTICA MÉDICA II: OS CROMOSSOMOS SEXUAIS E SUAS ANOMALIAS

Margarete Suñé Mattevi *
Bernardo Erdtmann **

SINOPSE: São relacionados os principais achados clínicos e genéticos em pacientes que apresentam distúrbios no desenvolvimento sexual devido à ocorrência de anomalias, tanto numéricas como estruturais, nos cromossomos X e Y. São descritos, em detalhe, os métodos de estudo de cromatina sexual, baquetas e fluorescência em uso no Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UFRGS.

1. O PAR SEXUAL

O notável desenvolvimento alcançado atualmente pela citogenética humana iniciou-se na segunda metade da década de 50. Até esta data os cromossomos humanos, tais como os dos demais mamíferos, eram considerados como inadequados sob o ponto de vista citológico devido ao seu relativo grande número e às conseqüentes dificuldades de identificação que apresentavam. Ambas estas di-

ficultades foram resolvidas devido, principalmente, ao grande interesse despertado nos citologistas com a descoberta da cromatina sexual e seu comportamento aparentemente anômalo em pacientes com anomalias no desenvolvimento sexual. Enquanto que as novas técnicas empregadas a partir de 1956 (ver Erdtmann e Mattevi, 1971) revelaram resultados surpreendentes em relação ao número dos cromossomos somáticos, com referência aos cromossomos sexuais elas apenas tornaram mais claro ainda um fato já conhecido há longo tempo pelos citologistas, isto é, a existência, na espécie humana, de um mecanismo de determinação sexual do tipo XY (Matthey, 1949).

Em metáfases mitóticas os cromossomos sexuais são identificados devido a eles constituírem um par desigual no homem, enquanto que, nas mulheres, os dois cromossomos X apresentam uma aparência similar ao cromossomo X único do homem.

* Professora Assistente do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS. Mestre em Genética pela UFRGS.

** Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), realizando pós-graduação no Departamento de Genética do Inst. de Biociências — UFRGS.

De acordo com a classificação dos cromossomos humanos, proposta pela conferência de Chicago (1966), os dois cromossomos X da mulher assim como o cromossomo X do homem pertencem ao grupo C (ou 6-12X) sendo provavelmente os maiores do grupo (ver figura 1 do artigo anterior). O cromossomo Y pertence ao grupo G (ou 21-22Y) sendo, também, o maior do grupo (ver figura 2 do artigo anterior). Penrose (1964) fixando, arbitrariamente, o comprimento total do conjunto haplóide dos cromossomos em 100,00 unidades, calculou o comprimento do cromossomo X em 5,89 unidades e o do Y em 1,96 unidades. O fato de o cromossomo Y ser muito menor em tamanho indica que estes cromossomos portam diferentes genes. A existência de tais genes está largamente comprovada na espécie humana e são chamados genes ligados ao sexo ou, mais corretamente, ligados aos cromossomos X. Tais genes mostram um modo particular de herança, a herança ligada ao sexo, que reflete o modo próprio de transmissão do cromossomo X.

2. OS CROMOSSOMOS SEXUAIS EM NÚCLEOS INTERFÁSICOS

2.1 A Cromatina Sexual

Em 1949, Barr e Bertram descobriram a existência de um dimorfismo sexual em núcleos interfásicos de células de mamíferos, fenômeno este cuja ocorrência foi também evidenciada na espécie humana (Moore e Barr, 1954). As potencialidades destas descobertas foram rápida e largamente reconhecidas. Foi demons-

trado que os núcleos interfásicos de uma mulher normal possuem uma pequena massa de cromatina adjacente e interna à membrana nuclear, tendo uma forma hemisférica ou triangular e medindo aproximadamente 1 micra de diâmetro. É denominada comumente de cromatina sexual e, mais raramente, corpúsculo de Barr. As células que a apresentam são ditas cromatino-positivas e aquelas sem o corpúsculo são chamadas cromatino-negativas.

Em embriões do sexo feminino a cromatina sexual torna-se visível entre o 12º e 18º dia de vida embrionária. Em mulheres adultas a cromatina sexual é determinada mais frequentemente em células da mucosa oral obtidas por esfregaços bucais. Esfregaços dos tratos urinários e genitais são também adequados. A proporção de núcleos nos quais a cromatina sexual pode ser identificada depende do tecido estudado e da técnica utilizada. Em nosso laboratório, usando-se esfregaços de mucosa bucal, segundo técnica de Klininger e Ludwig (1957), a qual descreveremos a seguir, uma frequência de 20 a 25% de células cromatino positivas é o padrão normal.

Técnica para estudo da cromatina sexual em mucosa bucal

- 1) Coletar o material com uma espátula e fazer um esfregaço em lâmina desengordurada.
- 2) Fixar em álcool e éter 1:1, durante 5 minutos.
- 3) Secar ao ar.
- 4) Hidrólise ácida (HCl concentrado e H₂ destilada 1:3) a 65°C durante 15 minutos.

- 5) Breve lavagem intermediária em H_2O destilada.
- 6) Coloração com azul de toluidina durante 20 minutos.
- 7) Lavar em H_2O destilada 2 ou 3 vezes.

Para o estabelecimento do sexo nuclear do indivíduo, em procedimentos de rotina, usa-se fazer uma lâmina de cada bochecha, coletando-se, também, um controle normal. As lâminas, tanto do paciente como do controle, deverão ser codificadas e a cromatina sexual investigada com lentes de imersão, sendo contadas um total de 100 células de cada lâmina.

A Origem da Cromatina Sexual

Sabe-se que os indivíduos com cariótipos 46,XY, 45,X ou 47,XYY não apresentam cromatina sexual (são cromatino-negativos), enquanto que os indivíduos 46,XX,47,XXY ou ... 48,XXYY mostram apenas um corpúsculo de cromatina sexual. Observações posteriores demonstraram que os pacientes 47,XXX, 48,XXXY e 49,XXXYY têm dois corpúsculos e os com cariótipos 48,XXXX e 49,XXXXY apresentam três e assim por diante. Estes achados permitem concluir que o número de cromatinas sexuais, em células diplóides, é igual a um menos o número de cromossomos X. Isto pode ser representado pela fórmula $B = n - 1$, onde B é o número de corpúsculos de Barr e n é o número de cromossomos X em células diplóides. Estas observações sugerem que, quando está presente mais de um cromossomo X na célula,

os X supernumerários constituirão os corpúsculos de cromatina sexual visíveis na interfase. Portanto, cada cromatina sexual é formada por um único cromossomo X. Estudos subsequentes indicaram que os autosomos tem influência na determinação do número de cromatinas sexuais, pois vários autores observaram que células masculinas tetraplóides .. (92,XXYY) são cromatino-negativas, apesar da presença de dois cromossomos X, e que células tetraplóides femininas apresentam duas cromatinas sexuais, mesmo na presença de quatro cromossomos X (92,XXXX). É substituída a «regra do $n-1$ », por uma fórmula que leva em consideração o nível de ploidia da célula:

$$B = X - \frac{P}{2} \text{ onde } P \text{ representa o}$$

grau de ploidia.

A Hipótese Russel-Lyon

Pelo estudo do comportamento de genes autossômicos translocados para um dos cromossomos X, Russel e Baughman (1961) observaram que, em fêmeas de camundongos, estes genes tornam-se inativos em algumas células do corpo. Destes experimentos concluiu-se que, em fêmeas normais, um dos dois cromossomos X é inativo e que em células diplóides apenas um dos cromossomos X é necessário para a atividade genética. Trabalhos posteriores de diferentes autores em outros mamíferos, inclusive o homem, vieram confirmar os achados destes autores. Essas conclusões foram também deduzidas por Mary Lyon (1961, 1962, 1963) cuja hipótese pode ser resumida em quatro itens:

- a) Um dos dois cromossomos X nas células de uma mulher normal é geneticamente inativo.
- b) Este cromossomo X inativo constitui a cromatina sexual em células interfásicas.
- c) Esta inativação dá-se ao acaso de tal maneira que o X inativo pode ser de origem materna ou paterna.
- d) A inativação ocorre cedo no desenvolvimento embrionário (na espécie humana por volta do 16º dia de vida) e, uma vez tenha ocorrido, permanece constante para cada linhagem celular.

Esta hipótese é importante, pois, na ausência da «compensação de dosagem», daí decorrente, as fêmeas dos mamíferos teriam em dose dupla produtos dos genes ligados ao cromossomo X enquanto que os machos os teriam em dose simples. Entretanto, supondo-se que um dos cromossomos X das fêmeas seja inativado, as dosagens gênicas efetivas seriam iguais nos dois sexos.

Aplicações Clínicas dos Estudos da Cromatina Sexual

Como a cromatina sexual é um guia útil para indicar o número de cromossomos X nas células somáticas do indivíduo e devido à facilidade de sua identificação, ela tem sido largamente empregada em vários problemas médicos. Sua principal aplicabilidade é, obviamente, na determinação do sexo cromossômico em pacientes com anomalias do desenvolvimento sexual. Além disso o teste tem sido usado nas seguintes

áreas: determinação pré-natal do sexo; estabelecimento da proporção sexual logo após a concepção, pela sua determinação em abortos, e ao nascimento, pelo estudo em recém-nascidos; em transplantes de tecidos; em tumores; em problemas de diferenciação psico-sexual; em anomalias congênitas; e em aspectos da medicina legal, especialmente os relacionados com a identificação de restos de tecidos.

2.2 Apêndices Nucleares em Leucócitos

Davidson e Smith (1954) descreveram, pela primeira vez, a presença de um dimorfismo sexual em leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico, achado este logo confirmado por vários investigadores. Este dimorfismo é caracterizado pela ocorrência de uma massa densa e pedunculada de cromatina que se prende a um dos lobos nucleares através de um filamento delgado e que tem um diâmetro aproximado de 1,5 micra. Estes apêndices, comumente denominados de «baquetas», são encontrados aproximadamente em 2% dos neutrófilos das mulheres normais, estando ausentes nas células masculinas. Tal como a cromatina sexual, as baquetas indicam o número de cromossomos X inativos presentes no indivíduo. Em nosso laboratório usamos o seguinte método para evidenciar as baquetas: é feito um esfregaço de sangue obtido por punção do dedo. Este esfregaço é corado com May-Grünwald e posteriormente com Giemsa. Usamos trabalhar com lentes de imersão e

contar 200 neutrófilos para o estabelecimento do sexo nuclear.

2.3 Identificação do Cromossomo Y em Núcleos Interfásicos

A partir das técnicas elaboradas por Caspersson e col. (1969 e 1970) foi descoberto recentemente um método que, pela utilização de derivados da acridina fluorescente, especialmente quinacrina e quinacrina mustarda, é capaz de evidenciar a presença do cromossomo Y em células interfásicas. Verificou-se que este cromossomo, em células em tal estágio quando tratadas com estas substâncias, costuma aperecer como um corpúsculo fluorescente de aproximadamente 0,25 micra de diâmetro, numa frequência de 25 a 50% em células da mucosa bucal (Pearson e col., 1970), variando conforme o tecido estudado até quase 80% em linfócitos (Conen e col., 1970). Esta técnica está sendo também empregada para estudos de cromossomos metafásicos, mas sua principal utilidade clínica atual é a determinação do sexo nuclear em esfregaços da mucosa bucal. Ainda mais, o uso combinado das técnicas de cromatina sexual e fluorescência permite determinar, em esfregaços bucais, o número de cromossomos X e Y do paciente, além de fornecer subsídios consideráveis ao esclarecimento de problemas teóricos básicos em citogenética. Em nosso laboratório empregamos a técnica de coloração fluorescente, para a identificação da presença do cromossomo Y em células em interfase. Como material preferimos esfregaço de sangue que se obtém por punção

digital, por dar percentagem mais alta de células com corpúsculo fluorescente, em relação ao esfregaço da mucosa bucal. Usamos a técnica de coloração apresentada por Caspersson e col. (1970), que basicamente consiste em:

- 1) Fixação do material (metanol ou etanol-ácido acético 3:1) imediatamente após a coleta, por 5 minutos ou mais.
- 2) Hidratação por estágios de álcool e água tamponada (pH 7,0) com tampão fosfato-ácido cítrico.
- 3) Coloração em uma solução de água bidestilada com 0,05 mg/ml de quinacrina dihidroclorídrica (Atebrina), durante vinte minutos.
- 4) Lavar a lâmina durante 1 minuto em água tamponada.
- 5) Montar a lamínula com o próprio tampão e fechar as bordas com esmalte de unhas.
- 6) Sendo necessário conservar as lâminas, colocá-las na geladeira a 4°C com filtro umedecido.

3. ANOMALIAS NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS

3.1 Disgenesias ovarianas

3.1.1 — Disgenesia gonadal, síndrome

me de Turner, agenesia ovariana, síndrome de Bonnevie-Ullrich, são alguns dos numerosos nomes dados a uma entidade clínica de ocorrência exclusiva no sexo feminino, que compreende gônadas rudimentares, au-

sência ou hipodesenvolvimento das características sexuais secundárias, assim como dezenas de anomalias somáticas, entre as quais as mais comuns são: unhas anormais (75% dos casos), baixa implantação do cabelo na nuca (68% dos casos), nevos pigmentados (61%), tórax em escudo (60%), pescoço curto (60%) e cúbito valgo (57%) (Mattevi, 1971; Mattevi e col. 1971). O grande número de denominativos da doença (cêrca de 30, segundo de la Chapelle, 1962) reflete a complexidade dos achados clínicos na mesma. Embora o termo síndrome de Turner (depois de Turner, 1938) pareça ser uma das denominações mais comuns da entidade, a maioria dos autores, após o esclarecimento de sua etiologia cromossômica, prefere denominá-la como disgenesia gonadal ou disgenesia ovariana.

Frequência e condições de aparecimento

A determinação da frequência das disgenesias gonadais tem geralmente sido feita, ao nascer, pela determinação da cromatina sexual, e a maioria dos levantamentos concordam com achados de Maclean e col. (1964) que obtiveram uma frequência de 0,4/1.000 em 10.000 recém-nascidas numa maternidade de Edimburgo.

Apesar de serem em número reduzido as análises demográficas feitas em famílias de pacientes com disgenesia gonadal, os dados obtidos até agora parecem indicar que, ao contrário do que ocorre em outros tipos de anomalias cromossômicas, nesta entidade estes fatores pouco in-

fluem. Os estudos feitos sobre as idades maternas e paternas ao nascimento dos afetados, assim como sobre a ordem de nascimento dos pacientes e a proporção sexual entre as suas irmandades, indicam não estarem estes parâmetros alterados nas disgenesias gonadais. O mesmo acontece com relação à mortalidade pré-natal e ao número médio de gestações apresentados pelas mães dos pacientes. Apenas uma peculiaridade incomum, pois não tem sido observada em outras aberrações cromossômicas, parece caracterizar as disgenesias gonadais: o aumento da frequência de nascimentos de gêmeos entre as irmandades dos afetados. Entretanto, a relação deste fato com a etiologia da doença ainda não foi perfeitamente esclarecida, embora ambos os eventos estejam relacionados com distúrbios meióticos nas mães dos afetados (Mattevi, 1971; Mattevi e cols., 1971).

Estudos Citogenéticos

A aplicação de métodos para o estudo da cromatina sexual levaram a Polani e col. (1954), Wilkins e col. (1954) e Décourt e col. (1954) à importante descoberta de que as pacientes desta síndrome eram cromatino-negativas. Este fato e mais os achados de que estas pacientes eram daltônicas na mesma frequência de que os homens normais, possibilitaram a Polani e col. (1956) sugerir que as mesmas eram geneticamente masculinas (46,XY) ou, alternativamente, tinham um cariótipo 45,X. Tal constituição cromossômica foi demonstrada pela primeira vez em

1959 por Ford, Jones, Polani, Almeida e Briggs e logo confirmada em outros centros de citogenética. Desde que foi demonstrada a etiologia cromossômica da síndrome, muitos estudos citogenéticos foram feitos na mesma (inclusive no Brasil, como a série de 33 pacientes estudada por Nahoum, 1967 e a de 46 pacientes estudada por Mattevi, 1971 e Mattevi e cols., 1971) e diversas outras anomalias do cromossomo X foram observadas. Sabe-se hoje que não só o cariótipo 45,X ocorre nas disgenesias gonadais, mas, também, aberrações de estrutura, como isocromossomos, deleções, cromossomos em anel, assim como grande variedade de mosaicismos (isto é, presença, no mesmo indivíduo, de duas linhagens celulares), tanto numéricos como estruturais, perfazendo um total de aproximadamente 30 cariótipos descritos (Bartalos e Baramki, 1967). Tais cariótipos, num levantamento que fizemos de 787 pacientes descritos na literatura, obedecem à seguinte distribuição:

- 45,X — aproximadamente 40% dos pacientes apresentam tal constituição cromossômica.
- 45,X/46,XX — após o 45,X este tipo de mosaicismos é o cariótipo anormal mais comum nas disgenesias gonadais, aparecendo em 12% dos casos.
- 46,XX — O cariótipo normal ocorre em pouco mais de 20% dos pacientes, sendo sua alta frequência devida, em parte, à inclusão de casos de disgenesia gonadal pura, síndrome que trataremos a seguir.

5 e 3% dos pacientes apresentam, respectivamente, cariótipos em mosaico envolvendo o cromossomo Y, no primeiro caso e deleções do cromossomo X, no segundo.

Os restantes 20% dos afetados apresentam as mais diversas anomalias do cromossomo X, tanto de número como de estrutura, com ou sem mosaicismos. Os dados permitem concluir, portanto, que as anomalias cromossômicas são responsáveis pela etiologia de cerca de 80% dos indivíduos com disgenesia gonadal.

3.1.2 Disgenesia gonadal pura

Esta entidade, também conhecida por síndrome de Stewart, é uma disgenesia ovariana que se distingue da síndrome de Turner pelo fato das mulheres afetadas apresentarem, além da disgenesia gonadal e hipodesenvolvimento das características sexuais secundárias, quase total ausência de estigmas somáticos, acompanhada de estatura normal ou eunucóide. A grande maioria dos cariótipos encontrados nesta síndrome é 46,XY, ocorrendo, em frequência bem mais baixa, o 46,XX. Outro aspecto importante que deve ser salientado é a alta recorrência familiar observada nesta entidade, sugerindo uma etiologia gênica.

3.1.3 Mulheres com cromossomos X múltiplos

Tanto a síndrome de Klinefelter, a ser discutida mais adiante, como

a síndrome de Turner, eram reconhecidas como tais antes da descrição de seus cariótipos. Em contraste, as mulheres portadoras de cromossomos X em excesso não constituem uma entidade clínica definida e só foram descobertas através dos estudos citogenéticos.

Esta aberração cromossômica foi observada pela primeira vez por Jacobs e col. (1959a) que descreveram a presença de um cariótipo 47,XXX numa mulher adulta que apresentava algumas anomalias no desenvolvimento sexual. Desde então numerosos exemplos desta síndrome têm sido descritos. O termo «super-fêmea» (derivado da citogenética de *Drosophila*) foi inicialmente empregado como denominativo da condição, mas, hoje, seu uso está praticamente abandonado. O fato de os indivíduos portadores desta constituição cromossômica apresentarem dois corpúsculos de cromatina sexual na mucosa bucal e em outros tecidos, permite o fácil diagnóstico da entidade em estudos populacionais. Tais tipos de pesquisas têm sido feitas, tanto em recém-nascidas, como em hospitalares para retardados mentais. O fato de se ter encontrado ser a condição poli-X mais freqüente entre retardadas mentais do que em recém-nascidas, sugere que tal constituição cromossômica predisponha ao retardo mental. Ocorrem, nas mulheres 47,XXX, certas anomalias clínicas no desenvolvimento sexual, numa freqüência regular. Entretanto, algumas mulheres com três cromossomos X parecem completamente normais, tanto quanto à inteligência como ao desenvolvimento sexual, tendo sido

descritas várias que tiveram filhos. Pacientes com mais de três cromossomos X (tetra e penta X) são também conhecidas.

3.2 Disgenesias Testiculares

Klinefelter e col. em 1942 descreveram uma condição clínica na qual os pacientes do sexo masculino, eram afetados por ginecomastia, ausência de espermatogênese e aumento na excreção do hormônio folículo-estimulante (FSH). A partir desta data esta entidade clínica tem sido objeto de numerosos estudos que culminaram, em 1959, com a descoberta de sua etiologia cromossômica.

Embora o epônimo síndrome de Klinefelter seja a denominação mais usada para a entidade, outros nomes, tais como pseudohermafroditismo feminino com disgenesia gonadal (Nelson, 1956), disgenesia testicular (Plunkett e Barr, 1956), microorquidismo cromatino-positivo (Ferguson-Smith, 1958), etc., têm sido empregados.

Bishop e Polani (1960) estabeleceram os seguintes critérios para o diagnóstico da síndrome: microorquia (usualmente testículos firmes, pequenos e descidos), ginecomastia e títulos elevados de gonadotrofinas.

Entretanto Hornstein (1963) que estudou esta entidade de maneira exaustiva, distingue sintomas opcionais e obrigatórios citando entre estes últimos a presença de:

padrão cromatínico positivo e, após a puberdade, atrofia ou hipoplasia testicular.

Entre os opcionais mais freqüentes relaciona a ocorrência de: aumento na excreção de gonadotrofinas, azoospermia ou aspermia, ginecomastia e retardo mental. Dependendo do desenvolvimento somático, o mesmo autor classifica os pacientes com a síndrome de Klinefelter em:

1. Tipo euncoide, onde as pernas longas é a principal característica.
2. Tipo displástico, no qual os pacientes têm estrutura um pouco menor do que a média.
3. Um tipo muito próximo à norma somática.

Incidência

A) População em geral

Estudos feitos através da determinação da cromatina sexual no Canadá, Suíça e Escócia indicam que, entre recém-nascidos do sexo masculino, a incidência da síndrome gira em torno de 1/500 nascimentos. Kaplan e Norfleet (1961) estudando 1.000 homens adultos encontraram dois indivíduos afetados e estes achados sugerem que as determinações de freqüência feitas ao nascer correspondem a incidência na idade adulta.

B) Em Instituições para Retardados Mentais

As freqüências encontradas variam muito entre os diversos estudos feitos, estando a média próxima a 1%.

C) Em Clínicas para Infertilidade

Estudando a incidência de pacientes com a síndrome de Klinefelter nestes tipos de clínicas, os autores tem obtido resultados muito diversos, possivelmente devido às diferentes composições dos grupos de indivíduos que consultam nestas clínicas. A freqüência mais baixa encontrada foi de 2.4% por Jordan e Niermann (1962) e a mais alta foi de 20% por Nowakowski e col. (1959).

Estudos Citogenéticos

Polani e col. (1958), estudando a incidência de daltonismo entre os pacientes com a síndrome de Klinefelter, sugeriram que estes indivíduos teriam dois cromossomos X. Em 1959 Jacobs e Strong descrevem o cariótipo destes indivíduos como sendo .. 47,XXY, resultado este subsequentemente confirmado por diversos outros autores. O cariótipo 47,XXY é o mais comum nesta síndrome, embora tenham sido descritas outras constituições cromossômicas, as quais também envolvem acréscimos de cromossomos X e, também, Y e cujos efeitos fenotípicos parecem condicionar, essencialmente, a mesma condição clínica. Assim foram descritos, mais raramente, indivíduos com a síndrome de Klinefelter com cariótipos 48,XXXXY e 49,XXXXXY. O quadro clínico dos pacientes 48, XXXY parece não diferir substancialmente daquele dos indivíduos 47,XXY, mas os pacientes com quatro cromossomos X e um Y (49,XXXXXY) tendem a apresentar anomalias congênitas adicionais (Scherz e Roeckel, 1963) que incluem: malformações do es-

queleto, hipodesenvolvimento da genitália e aumento do risco de retardo mental grave.

Outras variantes encontradas na síndrome de Klinefelter são as constituições cromossômicas 48,XXYY e 49,XXXYY. Estudando estes pacientes Barr e col. (1964) concluíram que cromossomos Y adicionais nesta síndrome têm um efeito fenotípico variável e ainda não perfeitamente delineado possivelmente aumentando a predisposição para maior ocorrência de anomalias vasculares e cutâneas em pacientes idosos.

Alguns pacientes com a síndrome de Klinefelter apresentam cariótipos com mosaicismos dos cromossomos sexuais. Assim, entre 128 pacientes portadores de cariótipos anormais e com várias idades, Court Brown e col. (1964) encontraram 23 mosaicos. Dêstes, 15 eram 46,XY/47,XXY, dois eram 46,XX/47,XXY, dois eram 48,XXXYY/49,XXXXYY, enquanto quatro apresentaram mosaicismo triplo, assim distribuídos: 45,X/46,XY/47,XXY, 46,XX/46,XY/47,XXY, 46,XY/47,XXY/48,XXXYY e o último 46,XX/47,XXY/48,XXXYY. Leon e col. (1966) em São Paulo descrevem, também, um caso de mosaicismo triplo do tipo 46,XY/47,XXY/48,XXY.

As origens dos cromossomos sexuais adicionais na síndrome de Klinefelter são interpretadas como devidas a não-disjunções meióticas nos casos sem mosaicismo e a não-disjunção mitóticas nos indivíduos que apresentam mosaicismo. É fato bem estabelecido, também, que o aumento da idade materna ao nascimento do afetado, é um fator importante na etiologia da síndrome.

3.3 O cariótipo XYY

A ocorrência do cariótipo 47,XYY foi descrita pela primeira vez por Hauschka e col. (1962) num homem de 44 anos, normal e fértil, o qual teve seus cromossomos estudados devido ao fato de mais da metade de sua prole apresentar anomalias congênitas que, ficou verificado, não tinham relação com o cariótipo anormal do pai). Nos três anos que se seguiram foram relatados alguns indivíduos com tal cariótipo, constituindo um grupo heterogêneo de crianças e adultos, cujos sintomas não permitiam enquadrá-los num quadro clínico definido. Foi então que Jacobs e cols. (1965), estudando os cromossomos de 197 presidiários, oligofrênicos e com comportamento agressivo, encontraram oito indivíduos que apresentaram um cromossomo Y adicional. Estes autores verificaram, também, que a estatura média dêstes homens (186 cm.) era significativamente superior do que a dos restantes prisioneiros com cariótipo normal (170 cm.). Desde a publicação dêste trabalho, foram realizados outros estudos em diversas prisões, tendo sido encontrada uma maior ocorrência de dois cromossomos Y, especialmente quando os pacientes eram selecionados por apresentarem alta estatura e comportamento anti-social (Bartlett e col., 1968; Close e col., 1968; Wiener e col., 1968). Além dêsses casos, descritos em pessoas com aparência normal e localizadas por apresentarem distúrbios psicológicos, o cariótipo 47,XYY é também observado em pacientes com genitalia ambígua e

outras malformações menos comuns. Hienz (1969) revisando aproximadamente 100 casos relatados na literatura de indivíduos com cariótipos 47,XXX, distingue quatro padrões fenotípicos:

- a) Estatura acima da média, inteligência normal, sem história criminal, sem malformações somáticas, desenvolvimento sexual normal.
- b) Estatura acima da média, retardo mental, história criminal, sem malformações somáticas, desenvolvimento sexual normal.
- c) Estatura acima da média, inteligência normal ou ligeiro retardo mental sem história criminal, sem malformações somáticas, presença de hipogonadismo e outras anomalias genitais (tais como criptorquidismo).
- d) Estatura acima da média, inteligência normal ou retardo mental, sem história criminal, várias malformações somáticas e genitais.

3.4 Hermafroditismo e Pseudo-hermafroditismo

3.4.1 Hermafroditismo verdadeiro

Considera-se como hermafrodita verdadeiro um indivíduo que apresenta coexistência de tecido testicular e tecido ovariano. Para o correto diagnóstico deste estado intersexual deve-se, como regra geral, evidenciar histologicamente a presença de ambos os tecidos. Os dois tipos de tecido gonadal podem estar separados, ou podem localizar-se juntos

um do outro e, neste caso, são designados como um ovotestis. Dependendo da distribuição do tecido gonadal o hermafroditismo verdadeiro pode ser classificado em:

- a) Hermafroditismo lateral, onde o tecido testicular é encontrado em um lado e o ovariano no outro.
- b) Hermafroditismo bilateral, onde os tecidos ovarianos e testiculares são encontrados em ambos os lados.
- c) Hermafroditismo unilateral, onde tecidos ovarianos e testiculares são encontrados em um dos lados e, no outro, ocorre testículo, ovário, ou gônada rudimentar.

A genitália externa pode mostrar todas as graduações, desde a condição masculina típica até a feminina típica. Dos 161 pacientes relacionados por Overzier (1963), 94 apresentaram genitália masculina, 49 feminina, em quatro casos foi ambígua e em 14 não havia informação. Nenhum dos pacientes era fértil embora alguns produzissem óvulos e espermatozoides.

Estudos Citogenéticos

A grande maioria dos hermafroditas verdadeiros apresentam cromatina sexual positiva e os estudos cromossômicos nêles feitos demonstraram alta predominância do cariótipo 46, XX (Shearman e col. 1964). Em um número reduzido de afetados foi descrito o cariótipo 46,XY, assim como vários padrões de mosaicismos, tais como: 45,X/46,XY; 46,XX/46,XY e, mais raramente, formas mais complexas.

3.4.2 Pseudo-hermafroditismo

Considera-se como pseudo-hermafroditas aqueles indivíduos que apresentam vários tipos de desenvolvimento sexual anormal, cujas gônadas podem ser ovários ou testículos, mas não ambos. Se os testículos estão presentes o paciente é considerado como um pseudo-hermafrodita masculino e se, ao contrário, estão presentes os ovários, como pseudo-hermafrodita feminino. Pseudo-hermafroditismo é um termo amplo que compreende condições clínicas variadas de origens diversas e, ainda, não totalmente esclarecidas. Os estudos cromossômicos realizados nestas entidades têm revelado cariótipos normais, especialmente em casos de pseudo-hermafroditismo feminino, e, portanto, não serão considerados neste artigo. No caso dos pseudo-hermafroditas masculinos trataremos particularmente da síndrome dos testículos feminizantes pois, embora apresente cariótipo «normal», é uma condição clínica hereditária que ilustra o delicado balanço que é envolvido na diferenciação sexual.

Feminização Testicular

A denominação «feminização testicular» foi empregada por Morris (1953) que descreveu duas pacientes e revisou 79 outros casos semelhantes da literatura. Os pacientes com esta condição clínica têm uma aparência típica feminina, com mamas e outras características sexuais secundárias bem desenvolvidas, mas apresentam pêlos pubianos e axilares escassos ou ausentes. São ame-

norréicas e estéreis. A vagina, que varia em comprimento, não se comunica com os outros anexos. A genitália interna usualmente está ausente e as gônadas, que podem estar localizadas intra-abdominalmente, no canal inguinal ou nos grandes lábios, constituem-se sempre de testículos.

Grumbach e Barr (1958) verificaram que estas pacientes apresentam um padrão negativo de cromatina. Seus cromossomos foram investigados pela primeira vez por Jacobs e col. (1959b) que evidenciaram um cariótipo 46,XY, sendo esta constituição cromossômica confirmada por outros autores. Portanto, na feminização testicular, os testículos desenvolvem-se na presença do cromossomo Y, mas são incapazes de induzir o desenvolvimento do fenótipo masculino. Há uma forte pré-disposição familiar nesta síndrome e as pacientes comumente têm irmãs ou tias cujas histórias são sugestivas deste estado intersexual. Há evidência de que a condição seja herdada por um gene simples, transmitido pela mãe da paciente. Este gene pode ser ligado ao cromossomo X ou, alternativamente, ser um gene autossômico dominante que se expressa unicamente nos indivíduos com cariótipo 46,XY. A interpretação genética das genealogias se faz difícil devido ao fato das pessoas afetadas não se reproduzirem.

RESUMO: Uma revisão dos achados clínicos e citogenéticos observados em pacientes com anomalias nos cromossomos sexuais é apresentada, incluindo alguns dados obtidos por um dos autores. Também são descritas

as técnicas para a identificação da cromatina sexual, «drumsticks» polimorfonucleares e o cromossomo Y (o último por fluorescência) em uso corrente no Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SUMMARY: A review of the clinical and cytogenetic findings observed in patients with sex chromosome anomalies is presented, including some data obtained by one of the authors. A description is also made of the techniques for the identification of the sex chromatin, polymorphonuclear drumsticks and the Y chromosome (the latter by fluorescence mi-

croscopy) currently in use at the Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS — Agradecemos ao Dr. Francisco M. Salzano as valiosas sugestões recebidas durante a preparação deste artigo, bem como a cuidadosa revisão do mesmo. Nossas pesquisas estão sendo financiadas pelas seguintes entidades, às quais agradecemos: Conselho Nacional de Pesquisas, Conselho de Pesquisas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 — BARR, M. L. & BERTRAM, E. G. A morphological disfunction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein syntesis. *Nature*, 163:676, 1949.
- 2 — BARR, M. L., CARR, D. H., SOLTAN, H. C., WIENS, R. G. and PLUNKETT, E. R. The XXYY variant of Klinefelter's syndrome, *Canad. Med. Ass. J.* 90:575, 1964, apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «Klinefelter's syndrome.» In: Id. *Medical cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. cap.10, p.169.
- 3 — BARTALOS, M. & BARAMKI, Theodore A. *Medical cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. 419p.
- 4 — BARTLETT, D. J. et alii. Chromosomes of male patients in a security prison. *Nature*, 219(5152):351-4, July 27, 1968.
- 5 — BISHOP, P. M. F. & POLANI, P. E. True hermaphroditism and Klinefelter's syndrome. *The Lancet*, 2(7156):928-9, Oct. 22, 1960.
- 6 — CASPERSSON, T. et alii. DNA — binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. *Experimental Cell Research*, 58(1):141-52, Nov. 1969.

- 7 — CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Differential binding of alkylating fluorocromes. *Experimental Cell Research*, 60(3): 315-9, June 1970.
- 8 — CHICAGO conference: Standardization in human cytogenetics. *Birth Defects: Original Article Series*, 2(2):1-21, Dec. 1966.
- 9 — CLOSE, H. G. et alii. The incident of sex chromosomal abnormalities in mentally subnormal males. *Cytogenetics*, 7(4):277-85, 1968.
- 10 — CONEN, P. E.; LEWIN, P.; VAKIL, D. Rapid Y chromosome identification in blood smears. *The American Journal of Human Genetics*, 22(6):22a — 3a, Nov. 1970.
- 11 — COURT BROWN, W. M. et alii. Abnormalities of sex chromosome complement in man. London, Her Majesty's Stationery Office, 1964. 239p. (Privy Council. Medical Research Council. Special Report Series, 305).
- 12 — DAVIDSON, W. M. and SMITH, D. R. A morphological sex difference in the polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Brit. Med. J.*, 2:6, 1954, apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «Sex chromatin and nuclear appendages.» In: Id. *Medical cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1964. cap.4, p.88.
- 13 — DÉCOURT, Luciano et alii. Sobre o sexo genético nas pacientes com síndrome de Turner. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 1(2):203-6, jun. 1954.
- 14 — ERDTMANN, Bernardo & MATTEVI, Margarete S. Citogenética médica I: Estudos nos autossomos. *Revista de Medicina ATM*, 6:141-161, 1971.
- 15 — FERGUSON-SMITH, M. A. Chromatin-positive Klinefelter's syndrome (primary microrchidism) in a mental-deficiency hospital. *The Lancet*, 1(7027):928-31, May 3, 1958 [Original Articles]
- 16 — FORD, C. E. et alii. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *The Lancet*, 1(7075):711-13, Apr. 4, 1959.
- 17 — GRUMBACH, Melvin & BARR, Murray. Cytologic tests of chromosomal sex in relation to sexual anomalies in man. *Recent Progress in Hormone Research*, 14:255-324, 1958 [Proceedings of the Laurentian Hormone Conference 1957]
- 18 — HAUSCHKA, Theodore S. et alii. An XYY man with progeny indicating familial tendency to non-disjunction. *The American Journal of Human Genetics*, 14(1):22-30, Mar. 1962.
- 19 — HIENZ, Hermann A. YY — syndrome forms. *The Lancet*, 1(7586): 155-6, Jan. 18, 1969.
- 20 — HORNSTEIN, O., Zur Klinik und Histopathologie des männlichen primären Hypogonadismus. II. Mitteilung. Kastratismus und sogenanntes Klinefelter-syndrom als Krankheitsformen mit bekannter

- Atiologie, Arch. Klin. Exp. Dermat. 217:149, 1963, apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «Klinefelter's syndrome.» In: Id. *Medical cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. cap.10, p.171.
- 21 — JACOBS, Patricia A. & STRONG, J. A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*, 183(4657):302-3, Jan. 31, 1959.
- 22 — JACOBS, Patricia A. et alii. Evidence for the existence of the human «super female». *The Lancet*, 2(7100):423-5, Sept. 26, 1959. [Original Articles]
- 23 — JACOBS, Patricia A. et alii. Chromosomal sex in the syndrome of testicular feminisation. *The Lancet*, 2(7103):591-2, Oct. 17, 1959. [Original Articles]
- 24 — JACOBS, Patricia A.; BRUNTON, Muriel; MELVILLE, Marie M. Aggressive behaviour, mental sub-normality and the XYY male. *Nature*, 208(5017):1351-2, Dec. 25, 1965.
- 25 — JORDAN, P. and NIERMANN, H., Formen der Sterilität des Mannes und ihre Behandlung unter besonder Berücksichtigung des Klinefelter-syndroms und des Kryptorchismus, *Fritsch. Prakt. Dermat. Venerol.* 4:159, 1962, apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «Klinefelter's syndrome.» In: Id. *Medical cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. cap.10, p.171.
- 26 — KAPLAN, Norman M. & NORFLEET, Robert G. Hypogonadism in young men (with emphasis on Klinefelter's syndrome) *Annals of Internal Medicine*, 54(3):461-81, Mar. 1961.
- 27 — KLINEFELTER JR., Harry; REIFENSTEIN JR., Edward C.; ALBRIGHT, Fuller. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without A.leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 2(11):615-27, Nov. 1942.
- 28 — KLINGER, H. P. and LUDWIG, K. S. A universal stain for the sex chromatin body, *Stain Techn.* 32:235, 1957 apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «Sex chromatin and nuclear appendages.» In: Id. *Medical cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. cap.4, p.89.
- 29 — LA CHAPELLE, Albert de. Cytogenetical and clinical observations in female gonadal dysgenesis. *Acta Endocrinologica*. Suppl., 65: 1-122, 1962.
- 30 — LEON, Nelson; WAJEHENBERG, Bernardo Léo; BEÇAK, Willy. Precocious puberty in a case of Klinefelter's syndrome. *Acta Endocrinologica*, 53(3):353-9, Nov. 1966.
- 31 — LYON, Mary F. Gene action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L) *Nature*, 190(4773):372-3, Apr. 22, 1961.

- 32 — LYON, Mary F. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *The American Journal of Human Genetics*, 14(2): 135-48, June 1962.
- 33 — LYON, Mary F. Attempts to test the inactive — X theory of dosage compensation in mammals. *Genetical Research*, 4(1):93-103, Feb. 1963.
- 34 — MACLEAN, N. et alii. Sex-chromosome abnormalities in newborn babies. *The Lancet*, 1(7328):286-90, Feb. 8, 1964.
- 35 — MATTEVI, Margarete Suñe. Estudos citogenéticos, clínicos e familiares numa série de pacientes com disgenesia gonadal. Pôrto Alegre, 1971. [Tese de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul]
- 36 — MATTEVI, Margarete Suñe et alii. Cytogenetic, clinical and genealogical analysis in a series of gonadal dysgenesis patients and their families. [No prelo]
- 37 — MATTHEY, R. (1949) «Les chromosomes des vèrtebres. Rouge, Louisane apud MITTWOCH, Ursula. Sex chromosomes. New York, Academic Press, 1967. p.269.
- 38 — MOORE, Keith L. & BARR, Murray L. Nuclear morphology, according to sex, in human tissues. *Acta Anatomica*, 21(3):197-208, 1954.
- 39 — MORRIS, John McLean. The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 65(6):1192-211, June 1953.
- 40 — NAHOUM, Jean Claude. Disgenesias gonádicas femininas; estudo de 33 pacientes. Rio de Janeiro, 1967. [Tese de Docencia Livre de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro]
- 41 — NELSON, Warren O. Sex differences in human nuclei with particular reference to the «Klinefelter Syndrome», gonadal agenesis and other types of hermaphroditism. *Acta Endocrinologica*, 23(3): 227-45, Nov. 1956.
- 42 — NOWAKOWSKI, H. et alii. Chromosomenbefunde beim echten Klinefelter-syndrom. *Acta Endocrinologica*, 34(4):483-95 Aug. 1960.
- 43 — OVERZIER, C., Intersexuality. New York: Academic Press, 1963 apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «True hermaphroditism.» In: Id. *Medical cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. cap.11, p.182.
- 44 — PEARSON, P. L.; BOBROW, M.; VOSA, C. G. Technique for identifying y chromosomes in human interphase nuclei. *Nature*, 226 (5240):78-80, Apr. 4, 1970.
- 45 — PENROSE, L. S. A note on the mean measurements of human chromosomes. *Annals of Human Genetics*, 28:195-6, 1964.

- 46 — PLUNKETT, Earl R. & BARR, Murray L. Testicular dysgenesis; affecting the seminiferous tubules principally, with chromatin-positive nuclei. *The Lancet*, 2(6948):853-6, Oct. 27, 1956.
- 47 — POLANI, Paul E.; HUNTER, W. F.; LENNOX, Bernard. Chromosomal sex in Turner's syndrome with coarctation of the aorta. *The Lancet*, 2(6829):120-1, July 17, 1954 [Preliminary Communication]
- 48 — POLANI, Paul E.; LESSOF, M. H.; BISHOP, P. M. F. Colour-blindness in «ovarian» agenesis» (gonadal dysplasia) *The Lancet*, 2(6934):118-20, July 21, 1956.
- 49 — POLANI, P. E. et alii. Colour vision studies and the X-chromosome constitution of patients with Klinefelter's Syndrome. *Nature*, 182(4642):1092-3, Oct. 18, 1958.
- 50 — RUSSELL, L. B. and BANGHAM, J. W., Variegated type position effects in the mouse, *Genetics* 46:509, 1961 apud BARTALOS, Mihály & BARAMKI, Theodore A. «Sex chromatin and nuclear appendages.» In: Id. *Medical cytogenetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967. cap.4, p.92.
- 51 — SCHERZ, Robert G. & ROECKEL, Irene E. The XXXXY syndrome; a report of a case and review of the literature. *The Journal of Pediatrics*, 63(6):1093-8, Dec. 1963.
- 52 — SHEARMAN, R. P., SINGH, S., LEE, C.W.G., HUDSON, B., and ILBERY, P. L. T. (1964) Clinical, hormonal and cytogenetic findings in a true hermaphrodite. *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Empire* [N. S.] 71, 627-633, apud MITTWOCH, Ursula. *Sex chromosomes*. London, Academic Press, 1967. p.279.
- 53 — TURNER, Henry H. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology*, 23(5):566-74, Nov. 1938.
- 54 — WIENER, Saul et alii. XYY males in a Melbourne prison. *The Lancet*, 1(7534):150, Jan. 20, 1968.
- 55 — WILKINS, L.; GRUMBACH, M. M.; VAN WYK, J. J. Chromosomal sex in «ovarian agenesis.» *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 14(10):1270-1, Oct. 1954.

Rua Alcides Cruz, 196 - ap. 8 — 90000 — Pôrto Alegre — RS — Brasil.