

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Adriana Valéria Sales Bispo

**Investigação de mosaicismo críptico e potenciais
fatores de riscos para a não disjunção cromossômica
na síndrome de Turner**

**Recife - PE
2015**

Adriana Valéria Sales Bispo

**Investigação de mosaicismo críptico e potenciais fatores
de riscos para a não disjunção cromossômica na síndrome
de Turner**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Neide Santos

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza Cartaxo Muniz

Recife, PE
2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Bispo, Adriana Valéria Sales

Investigação de mosaicismo críptico e potenciais fatores de riscos para a não
disjunção cromossômica na Síndrome de Turner / Adriana Valéria Sales Bispo. –
Recife: O Autor, 2015.

100 f.: il.

Orientador: Neide Santos, Maria Tereza Cartaxo Muniz

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Doenças hereditárias 2. Turner, Síndrome de 3. Cromossomos humanos – Anomalia I. Santos, Neide (orient.) II. Maria, Tereza Cartaxo Muniz (coord.) III. Título.

616.042

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-169

Adriana Valéria Sales Bispo

**Investigação de mosaicismo críptico e potenciais fatores
de riscos para a não disjunção cromossômica na síndrome
de Turner**

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Vilma Loreto da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Adriana Vieira Gomes
Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, PE
2015

À minha eternamente amada e jamais esquecida tia Cláudia (*in memoriam*), por ter proporcionado a base de minha educação, ensinando-me a conquistar tudo que eu sou. Todas as minhas conquistas são inspiradas em ti.

Agradecimentos

Existem grandes marcos na história de cada um, e esse momento sela um dos mais importantes capítulos da minha história, escrito com ajuda de muitas mãos, as quais merecem meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

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

À minha querida família, pelo apoio e amor incondicionais. Amo todos vocês por tudo de maravilhoso que compartilhamos juntos! Com todo carinho, ao menino mais lindo do mundo, meu sobrinho Ryzinho, e minha sobrinha a princesa Lara, a quem tia “Nana” ama de todo o coração!

Ao amor maior do mundo, Alison obrigada por estar sempre ao meu lado, pelo apoio e companheirismo. Te amo imensamente.

À minha amiga e também orientadora Neide, a quem dedico profundo respeito e admiração. Você é meu espelho de ser humano maravilhoso, que acima de todas as conquistas mantém o carisma e a simplicidade. Você sabe que mudou o curso da minha história e sempre terá um lugar especial em meu coração!

À minha querida prof. Tereza Cartaxo pela atenção, carinho sincero e co-orientação verdadeira na elaboração deste trabalho.

Às minhas queridas e maravilhosas amigas, sou abençoada por Deus ter colocado tantas amizades verdadeiras em minha vida!! Sei que estaremos sempre juntas mesmo a quilômetros de distância Nanda, Helenzinha, Polly.

As minhas amadas e saudosas amigas da faculdade, pelo carinho, apoio e amizade. Sou muito grata pela minha bela turminha Zoide, Visnu, Diana, Gleicinha, Lígia e Érica. É maravilhoso conviver com vocês, um belo presente que todos vocês permaneçam em minha vida como verdadeiras amizades após 11 anos!!

As minhas novas amigas e colegas de trabalho Adriana, Alice, Kélvya e Marli pelo carinho e amizade. Ao apoio e suporte dos que fazem o IF-Sertão campus Salgueiro. Obrigada por terem me apoiado nessa incrível aventura de trabalhar e concluir o doutorado!!

Ao professor e amigo Paulo Santos e ao colega Sérgio Paiva, pelo suporte e atenção nas questões estatísticas.

A todos os amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana nosso querido laboratório (o melhor de todos!!), em especial a amiga Cibele, por ter me enxergado !! Obrigada por transformar meu trabalho em um ambiente tão feliz e acolhedor. Adoro vocês todos!!!

Ao grupo de Citogenética Humana, Luana, Juliana, Izabella e Raysa pelo esforço, carinho e dedicação em realizar nosso trabalho e pela amizade que construímos juntas.

À equipe dos laboratórios de Citogenética e de Biologia Molecular do CEONHPE, pelo carinho e ajuda que foram fundamentais para a elaboração da biologia molecular.

Às Dras. Gabriela Ferraz e Andréa Rezende do Serviço de Genética Médica do IMIP e à Dra. Jacqueline Araújo e a equipe da Endocrinologia Pediátrica do HC pela atenção e ajuda no encaminhamento das pacientes para a realização das coletas.

Às pacientes e responsáveis que autorizaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela concessão da bolsa e auxílio financeiro ao projeto.

Obrigada a todos!!

“Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

William Shakespeare

Resumo

A síndrome de Turner (ST) é caracterizada primariamente pelo cariótipo 45,X, mas podem ocorrer linhagens celulares incluindo o cromossomo Y. A precisa identificação do cromossomo Y nessas pacientes é de grande importância clínica devido a um aumento no risco de tumores gonadais. A alta frequência de mosaicismo na ST faz dessa síndrome um importante modelo para investigação do efeito dos polimorfismos dos genes da rota do folato como fatores de risco à não disjunção cromossômica somática. Alterações no metabolismo do folato podem promover aneuploidias por um efeito indireto sobre os padrões de metilação do DNA. Neste trabalho reportamos a frequência de mosaicismo críptico do cromossomo Y e sua associação clínica, como também a descrição de uma alteração cromossômica rara. Adicionalmente, foi investigada uma possível associação entre os polimorfismos de genes da rota do folato e o risco de não disjunção cromossômica somática na ST. A presença de mosaicismo oculto do cromossomo Y foi detectada em 2,7% dos casos, os quais mostraram genitália feminina normal sem sinais de virilização ou desenvolvimento tumoral. Assim, a busca de sequências do Y deve ser realizada na ST independente do cariótipo e/ou sinais clínicos. Não foi possível estabelecer uma associação entre os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *RFC1* e *TYMS*, independentes ou combinados, modulando o risco de não disjunção somática na ST, demonstrando que polimorfismos nesses genes, envolvidos na rota do folato, podem não representar uma importante contribuição para os mecanismos de geração das aneuploidias.

Palavras-chave: Aneuploidia; gonadoblastoma, hipometilação do DNA; Monossomia do cromossomo X.

Abstract

Turner syndrome (TS) is primarily characterized by the 45,X karyotype, but can occur cell lines including the Y-chromosome. The precise identification of Y-chromosome in TS patients is of great clinical importance due to an increased risk of gonadal tumors. The high frequency of mosaicism in TS makes this syndrome an important model to investigate the effect of genetic polymorphisms in folate pathway as risk factors to somatic non-disjunction. Changes in folate metabolism can promote aneuploidies by an indirect effect on the DNA methylation patterns. In this work was reported the frequency of Y-chromosome hidden mosaicism and its clinical association, and also described a rare chromosomal alteration. Additionally, a possible association between gene polymorphisms in folate pathway and the risk of somatic chromosome non-disjunction in TS was investigated. The presence of hidden Y chromosome mosaicism was detected in 2.7% of cases, which showed normal female genitalia without signs virilization or tumor development. Thus, the search for Y sequences should be held at TS regardless of the karyotypes and/or clinical signs. We could not establish an association between polymorphisms of *MTHFR*, *MTR*, *RFC1* and *TYMS* genes, independent or combined, modulating the risk of somatic non-disjunction in TS, showing that polymorphisms in these genes, involved in folate metabolism, may not represent an important contribution to the generation mechanisms of aneuploidies.

Keywords: Aneuploidy; gonadoblastoma, DNA hypomethylation; X-chromosome monosomy.

Lista de Ilustrações

Revisão da Literatura

- Figura 1.** Cariótipo mais comum na ST - 45,X. (Fonte: Caso analisado no presente estudo).....18
- Figura 2.** Quadro clínico da síndrome de Turner. **A.** Diagrama com os principais estigmas clínicos da ST. **B.** Paciente com ST. (Fonte: Adaptado de Vogel e Motulsky, 1996; Sybert and McCauley, 2004).....20
- Figura 3.** Principais regiões dos cromossomos sexuais X e Y. Regiões pseudoautossômicas (PAR1 e PAR2); *SHOX*, gene homeobox da baixa estatura (cromossomo X); *SHOXY*, gene homeobox da baixa estatura (cromossomo Y); *SRY*, locus de determinação sexual (Fonte: adaptado de Gardner e Sutherland, 2004).....22
- Figura 4.** Metabolismo do folato e vias relacionadas. Figura simplificada ilustrando o metabolismo interconectado do folato com suas principais enzimas, inseridas nas elipses, e os substratos, nos retângulos. RFC, carreador de folato reduzido; hFR, receptor de folato de humano; MTHFR, metilenotetrahidrofolato redutase; SHMT, serinahidroximetil transferase; DHFR, dihidrofolato redutase; THF, tetrahidrofolato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; dTMP deoxitimidina monofosfato; DHF, dihidrofolato; GAR, glicinamida ribonucleotídeo; AICAR, aminoimidazol carboxamida ribonucleotídeo; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; X, vários substratos para metilação (Fonte: adaptado de Ulrich et al., 2003).....33

Capítulo I

Figure 1. Electrophoretic analysis of PCR products using Y-chromosome primers. a. Identification of SRY, the 314-bp band (arrowhead with S) indicates the gene presence. b. Identification of TSPY, the 312-bp band (arrowhead with T) shows the gene presence. c. Identification of AMGY and DAZ genes, the 367-bp band (arrowhead with A) and 210-bp band (arrowhead with D) indicates the genes presence, respectively. The 610-bp band (arrowhead with B) present in all PCR products represents the β -Globin gene, used as positive control of the reaction. L, 100-bp ladder (molecular weight marker); 1, male control; 2, female control; 3,4,5 and 6 patients with TS; 7, blank reaction.....47

Figure 2. FISH results of the case with a karyotype 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.23). **A** Whole chromosome paint (WCP) for chromosome X, showing an extra chromosome material not derived from X-chromosome. **B** Subtelomeric probe (subtel) for Xpter/Ypter (green), and the probes for Yq12 (blue) and AZFc (red), confirmed the X;Y trans location.....47

Lista de Tabelas

Capítulo I

Table 1. Primer sequence, annealing temperature and product size.....	45
Table 2. Distribution of Turner syndrome karyotypes.....	45
Table 3. Genetic constitution and clinical reports of Turner patients with Y-chromosome positivity.....	46

Capítulo II

Table I. Allele frequencies of <i>MTHFR C677T</i> , <i>MTHFR A1298C</i> , <i>MTR A2756G</i> , <i>RFC1 A80G</i> , and <i>TYMS 2R</i> polymorphisms in Turner syndrome (cases) and controls.....	54
Table II. Genotype frequencies of <i>MTHFR C677T</i> , <i>MTHFR A1298C</i> , <i>MTR A2756G</i> , <i>RFC1 A80G</i> , and <i>TYMS 2R</i> polymorphisms in Turner syndrome (cases) and controls.	54
Table III. Combined genotypes in Turner syndrome (cases) and controls.....	55
Table IV. Comparison between the numbers of mutated alleles studied per individuals in cases and controls.....	56

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

5.10-metilTHF	5.10-metiltetrahidrofolato
AICAR	Aminoimidazol carboxamida ribonucleotideo
AMGY	<i>Amelogenin gene</i> –Y / Gene amelogenina ligado ao Y
ASA	<i>Allele Specific Amplification</i> / Amplificação alelo específica
AZFc	<i>Azospermia fator c</i> – Fator de Azospermia c
CCB	Centro de Ciências Biológicas
Cyp 46	Cytochrome P/ Citocromo P 46
DAZ	<i>Deleted in Azospermia gene</i> / Gene deletado na azospermia
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
GAR	Glicinamida ribonucleotídeo
GB	Gonadoblastoma
HUOC	Hospital Universitário Osvaldo Cruz
IC	Intervalo de confiança
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MTR	Metionina sintase
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
MTR	5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase/ Metionina sintase
OR	Odds Ratio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em cadeia da Polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> / Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
RFC-1	Carreador de folato reduzido

RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction/ Transcrição reversa</i> -reação em cadeia da Polimerase
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SHMT	Serinahidroximetil transferase
SHOX	<i>Short stature homeobox gene/</i> Gene homeobox da baixa estatura
SISNEP	Sistema nacional de informação sobre ética em pesquisa envolvendo seres humanos
SOX9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
SD	Síndrome de Down
ST	Síndrome de Turner
SRY	<i>Sex-determining Region Y</i> (Lócus de determinação sexual)
THF	Tetrahidrofolato
TSPY	<i>Testi-Specific Protein, Y-linked/</i> Proteína específica do testículo ligada ao Y
TYMS	Timidilato sintase
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WCP	Whole Chromosome Painting – Pintura cromossômica
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura	17
2.1 Síndrome de Turner	17
2.2 Cromossomo Y e Gonadoblastoma	26
2.3 Aneuploidias e Metabolismo do folato – Modelo da ST	29
2.4 Metabolismo do folato.....	32
2.4 Enzimas envolvidas no metabolismo do folato	35
2.4.1 Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).....	35
2.4.2 Metionina sintase (MTR)	36
2.4.3 Timidilato sintase (TYMS).....	36
2.4.4 Carreador de folato reduzido (RFC).....	37
2.5 Metilação do DNA e não disjunção.....	38
3. Objetivos.....	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. Capítulo I.....	42
Y-chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case.....	42
5. Capítulo II.....	50
Polymorphisms in Folate Pathway Genes are not Associated with Somatic Nondisjunction in Turner Syndrome	50
6. Discussão geral.....	59
7. Conclusões	66
8. Referências Bibliográficas	67
9. Produção científica associada a tese.....	82
Correlation of chromosome constitution variations on the expression of Turner's phenotype.....	82
10. Anexos	91
10.1 Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética.....	91
11. Curriculum vitae (Lattes)	92

1. Introdução

A Síndrome de Turner (ST) é a única monossomia compatível com a vida, caracterizada clinicamente pela baixa estatura, disgenesia gonadal, atraso puberal, além de diversos estigmas clínicos. Citogeneticamente, a síndrome é determinada pelo cariótipo 45,X em 50% a 60% dos casos, o restante apresenta outras alterações estruturais do cromossomo X ou Y e / ou mosaicismo. Contudo, devido a alta frequência de abortos espontâneos 45,X, tem se postulado que a presença de um segundo cromossomo sexual é essencial para a sobrevivência do feto e, por conseguinte, virtualmente todas as pacientes com ST são mosaicos e devem apresentar mais de uma linhagem celular.

Estudos têm demonstrado que 5 a 12% das portadoras da ST apresentam um cromossomo Y normal ou estruturalmente alterado. Além disso, tem sido postulado que devido às limitações inerentes a algumas técnicas citogenéticas clássicas, o mosaicismo críptico para o cromossomo Y pode ser mais frequente que o reportado na literatura. Diversas abordagens vêm sendo utilizadas para detectar mosaicismo críptico para o cromossomo Y, porém os resultados são extremamente variáveis levando a uma controvérsia em relação a real incidência de material derivado do cromossomo Y e seu significado clínico. A detecção de sequências do Y nessas pacientes é de crucial importância clínica, pois resulta em um maior risco para o desenvolvimento de virilização e tumores gonadais, sendo recomendada a realização da gonadectomia bilateral profilática quando material derivado do cromossomo Y é detectado no genoma das pacientes com ST e disgenesia gonadal.

A ST é considerada uma das aneuploidias mais comuns em seres humanos, ocorrendo em 1:2500 nascimentos femininos. De modo geral, as

aneuploidias cromossômicas formam uma importante categoria de doenças genéticas que respondem por 35% dos insucessos reprodutivos, malformações congênitas e uma proporção significativa dos casos de retardo mental. Embora o avanço da idade materna seja o principal fator etiológico associado à ocorrência de conceitos aneuplóides, estudos sobre a segregação meiótica têm mostrado que a hipometilação do DNA, causada por alterações no metabolismo do folato, pode estar associada a não disjunção cromossômica.

Folatos são nutrientes essenciais requeridos na síntese de nucleotídeos e nas reações de metilação do DNA. Deficiências de folato celular resultam em quebras cromossômicas, padrão aberrante de metilação do DNA e aneuploidia. As alterações no metabolismo do folato, ocasionada por polimorfismos genéticos, podem promover falhas na segregação cromossômica por um efeito indireto na metilação do DNA, afetando a estrutura da cromatina. Diversos estudos têm investigado a possível associação do folato e o risco de aneuploidia, contudo, apesar de consideráveis esforços nesta área, os resultados são frequentemente conflitantes ou inconclusivos, mantendo a questão não resolvida.

A alta frequência de mosaicismos nas portadoras da ST faz dessa síndrome um importante modelo para investigar o efeito dos polimorfismos de genes da rota do folato como fatores de risco à não disjunção cromossômica somática. A análise de polimorfismos funcionais que afetam o padrão de metilação do DNA na ST poderá contribuir para o entendimento do papel que estes marcadores possam desempenhar na correta segregação cromossômica, além de representar uma importante evidência de um componente genético associado a origem das aneuploidias.

2. Revisão da Literatura

2.1 Síndrome de Turner

A síndrome de Turner (ST) foi descrita em 1930 por Otto Ullrich e posteriormente por Henry Turner, que em 1938 publicou a descrição da tríade: infantilismo sexual, pescoço alado e cúbito valgo em pacientes do sexo feminino com baixa estatura. No ano de 1959, Ford *et al.* demonstraram que a síndrome estava vinculada a monossomia do cromossomo X (Apud Lipay *et al.*, 2005).

A ST consiste em um dos mais prevalentes distúrbios cromossômicos humanos, sendo caracterizada pela ausência total ou parcial de um cromossomo sexual. Esta síndrome afeta aproximadamente 1:2500 nascimentos femininos (Stochholm *et al.*, 2006), entretanto o número de recém-nascidas corresponde a uma pequena fração dos conceitos com ST, uma vez que, embora 1,5% de todas as concepções femininas na espécie humana tenham a constituição cromossômica 45,X, aproximadamente 99% destas são espontaneamente abortadas. Esse fato tem levantado a hipótese de que para ser viável, o conceito 45,X deve possuir outra linhagem celular ao menos em alguns órgãos ou períodos embriogênicos críticos (Oliveira *et al.*, 2009).

Recentemente, apoiado em estudo prévio que demonstrou a necessidade obrigatória do gene *PSF2RA*, localizado na região pseudoautosômica dos cromossomos X e Y, para a viabilidade da placenta (Urbach e Benvenitsy, 2009), Hook e Warburton (2014) reforçaram que todos os indivíduos com ST são na verdade mosaicos crípticos. Dessa forma a monossomia do cromossomo X em embriões viáveis é causada pela não disjunção mitótica, ou seja, erros pós-zigóticos.

Citogeneticamente, a ST é primariamente determinada pela monossomia do cromossomo X com o cariótipo 45,X ocorrendo em 50% a 60% dos casos (Figura 1). Alterações estruturais do cromossomo X, como isocromossomo do braço longo, deleções, cromossomo em anel estão presentes em aproximadamente 30% dos casos, com cariótipos homogêneos ou mosaicos que incluem uma linhagem celular 45,X (Oliveira *et al.*, 2009; Bispo *et al.*, 2013; Freriks *et al.*, 2013). Poucos casos apresentam cariótipos complexos que incluem a formação de cromossomos X derivativos (Burégio-Frota *et al.*, 2010). Recentemente, Denes *et al.* (2015) reportaram que contrário a população normal em que o surgimento de linhagem celulares aneuplóides está presente no processo de envelhecimento celular, o percentual de linhagens celulares diploides (46,XX ou 46,XY) aumentou em um grupo de pacientes ST analisadas após um período de 10 anos, demonstrando que a constituição cromossômica pode alterar ao longo do tempo e por conseguinte, aumentar a expectativa de vida dessas pacientes.



Figura 1. Cariótipo mais comum na ST - 45,X. (Fonte: Caso analisado no presente estudo)

As portadoras da ST frequentemente apresentam uma segunda linhagem celular, que pode incluir o cromossomo Y normal ou estruturalmente alterado em 5 a 12% dos casos (Liehr *et al.*, 2007; Bispo *et al.*, 2013; Freriks *et al.*, 2013). Entretanto, análises citogenéticas clássicas podem não detectar cromossomos estruturalmente anormais se os mesmos são muito pequenos ou raros. Assim, tem sido proposto que mosaicismo oculto, para pelo menos parte do cromossomo Y, pode estar presente mais frequentemente.

Vários estudos têm demonstrado uma frequência de material derivado do cromossomo Y em pacientes com ST variando de 0 a 61%, dependendo da abordagem metodológica (Bianco *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008; Salai *et al.*, 2010; Knauer-Fischer *et al.*, 2015). A identificação precoce de sequências derivadas do cromossomo Y em pacientes com ST é de grande importância clínica, devido a um aumento no risco de tumores gonadais, como gonadoblastoma e virilização, quando o cromossomo Y (ou parte dele) está presente no genoma dessas pacientes (Bianco *et al.*, 2006; Brant *et al.*, 2006).

O quadro clínico da ST consiste de baixa estatura e disgenesia gonadal, levando a atraso no desenvolvimento puberal, amenorreia primária e esterilidade em pacientes com genitália claramente feminina. Também podem ocorrer anomalias cardiovasculares (principalmente coarctação da aorta e defeitos no septo ventricular) e renais (como rins em ferradura e agenesia renal), deficiência auditiva, hipertensão, osteoporose e obesidade, além de distorções como pescoço curto e / ou alado, linfedema de mãos e pés, tórax largo e em escudo, cúbito valgo, implantação posterior dos cabelos baixa, orelhas proeminentes e de implantação baixa, palato arqueado, encurtamento do quarto e quinto metacarpos e metatarsos, ptose palpebral e nevos pigmentados (Figura 2) (Oliveira *et al.*,

2009; Gonzalez e Witchel, 2012; Bispo *et al.*, 2013). Além disso, um aumento na incidência de autoanticorpos tem sido observado nestas pacientes, bem como uma elevada frequência de doenças autoimunes, particularmente tireoidite de Hashimoto, doença celíaca e diabetes mellitus (Mortensen *et al.*, 2012; Goldacre e Seminog, 2014).

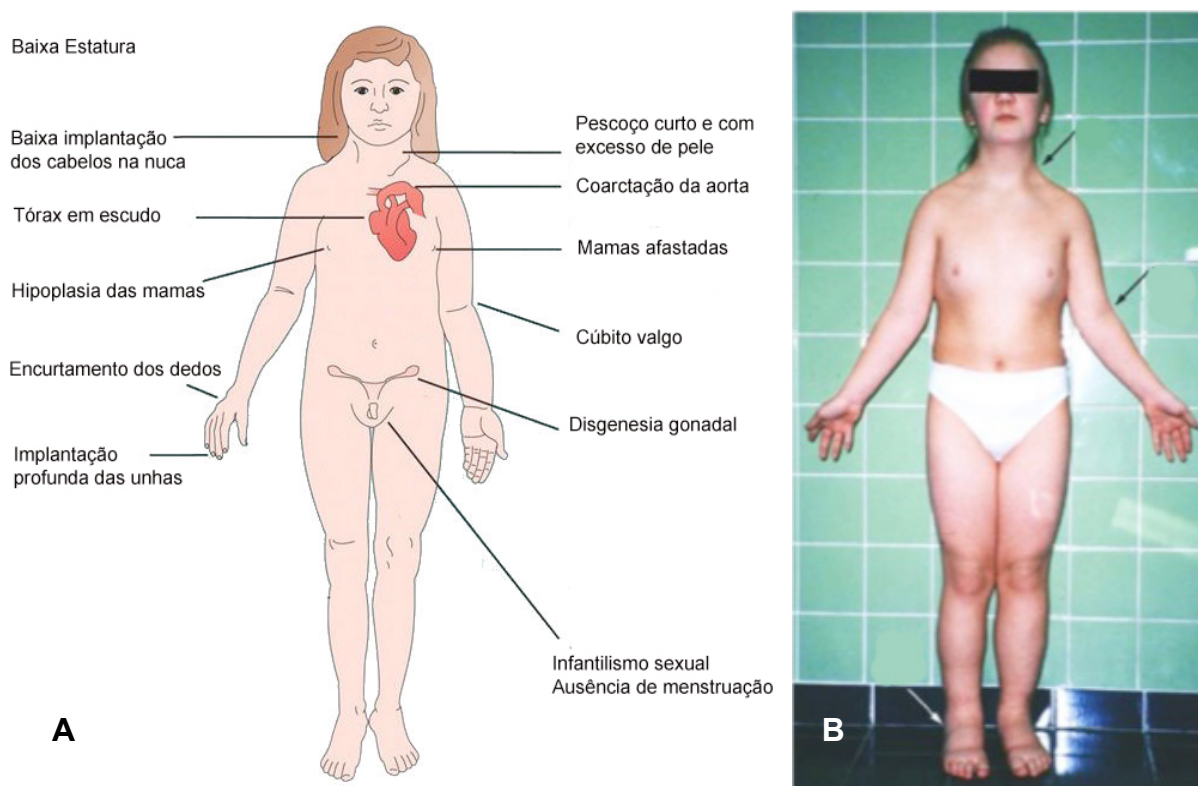


Figura 2. Quadro clínico da síndrome de Turner. **A.** Diagrama com os principais estigmas clínicos da ST. **B.** Paciente com ST. (Fonte: Adaptado de Vogel e Motulsky, 1996; Sybert and McCauley, 2004).

Diferente de outras síndromes cromossômicas, com exceção da baixa estatura que parece ser uma característica geral, as portadoras da ST apresentam características clínicas extremamente variáveis. As consequências fenotípicas da ST podem ser explicadas pela haploinsuficiência de genes do cromossomo X que escapam da inativação, assim uma única cópia do material genético seria incapaz de efetuar as funções normalmente desempenhadas em diploidia, prejudicando o desenvolvimento humano normal, e / ou pelo *imprinting*

genético, definido como um fenômeno epigenético, em que certos genes se expressam exclusivamente em um dos cromossomos parentais. Neste caso, a perda do cromossomo X não “imprimado” resultaria na ausência total de expressão de genes específicos em algumas células (Ubach e Benvenisty, 2009; Lepage *et al.*, 2012).

A ST é geralmente uma condição esporádica e não relacionada a idade materna, de fato em 70% a 80% dos casos a ST é causada pela não disjunção do par XY na meiose paterna. Geralmente o erro ocorre na meiose I da espermatogênese, possivelmente refletindo a ausência de pareamento ao longo do bivalente X-Y com maior vulnerabilidade ao processo de não disjunção. Estudos das aneuploidias sexuais resultantes de erros na espermatogênese evidenciam que os pais das portadoras de ST são mais propensos a produzir espermatozóides com perdas cromossômicas (Uematsu *et al.*, 2002; Zhong e Layman, 2012).

Alguns estudos demonstraram que a origem parental do cromossomo X na ST pode influenciar o fenótipo de acordo com o cromossomo X conservado. Diferenças físicas e comportamentais entre pacientes com $45,X^M$ materno e $45,X^P$ paterno indicam a existência de *imprinting* genético na expressão de alguns genes envolvidos nas anomalias cardiovasculares e renais (Chu *et al.*, 1994), funções sociocognitivas e volume cerebral (Cutter *et al.*, 2006; Ergür *et al.*, 2008), perfil lipídico aterogênico (Sagi *et al.*, 2007) resposta ao hormônio do crescimento e perda de audição (Hamelin *et al.*, 2006). Além disso, fetos abortados apresentam maior incidência de $45,X^P$, evidenciando que o *imprinting* genético pode exercer uma importante função na eliminação de fetos com ST (Martinez-Pasarell *et al.*, 1999). Entretanto, o verdadeiro impacto do *imprinting* parental do cromossomo X na ST permanece controverso, uma vez que recentes estudos não conseguiram replicar essas associações (Denemay *et al.*, 2012; Lepage *et*

al., 2012; Lee *et al.*, 2014).

Os mecanismos precisos da etiologia genética da ST ainda não foram completamente elucidados. Padrões alterados de expressão transcricional dos genes localizados nas regiões pseudoautossômica dos cromossomos sexuais (PAR1 e PAR 2) (Figura 3) são fortes candidatos responsáveis pelo fenótipo da ST. A maioria dos genes das PARs que escapam do processo de inativação estão localizados em Xp, onde 24 genes foram identificados comparados com apenas cinco em Xq, assim é esperado que alterações estruturais envolvendo Xp resultem em fenótipos mais severos (Mortensen *et al.*, 2012).

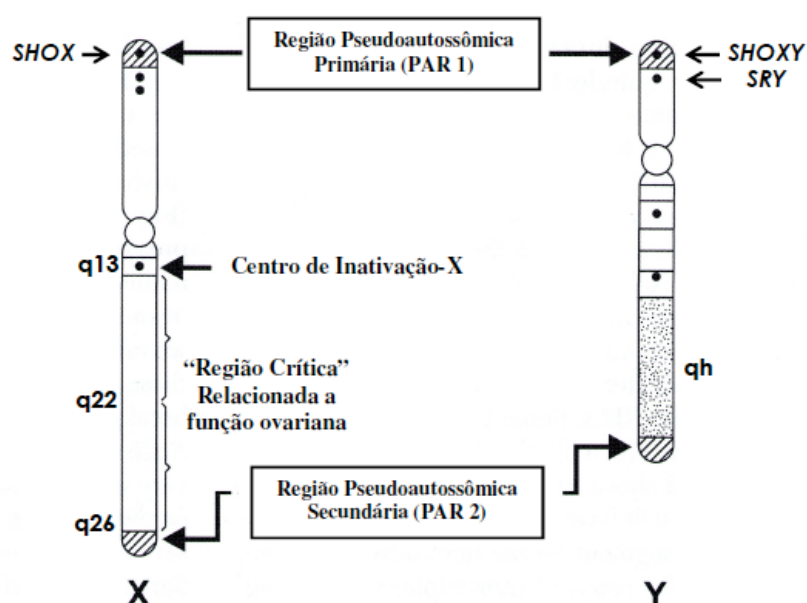


Figura 3. Principais regiões dos cromossomos sexuais X e Y. Regiões pseudoautossômicas (PAR1 e PAR2); *SHOX*, gene homeobox da baixa estatura (cromossomo X); *SHOXY*, gene homeobox da baixa estatura (cromossomo Y); *SRY*, locus de determinação sexual (Fonte: adaptado de Gardner e Sutherland, 2004).

Em um estudo com células tronco embrionárias pluripotentes oriundas de fetos ST foi observado que os genes pseudoautossômicos *ASMTL* (relacionado a atividade das metiltransferases) e *PPP2R3B* (envolvido no controle do ciclo celular) são expressos em níveis significativamente mais baixos quando comparados com células normais (Li *et al.*, 2012). Rajpathak *et al.* (2014)

compararam o perfil global de transcriptoma em fibroblastos humanos com cariótipos 45,X e 46,XX e identificaram diferentes padrões de expressão em 116 genes associados a diferenciação óssea, metabolismo da glicose e desenvolvimento gonadal. Adicionalmente, foi reportado diferenças na expressão de RNAs longos não codificantes, potencialmente envolvidos na supressão tumoral, nas linhagens monossômicas, demonstrando que a regulação da expressão gênica pode ser um mecanismo importante para a definição do fenótipo Turner. De modo geral, o consenso atual é que a base genética da ST é bem mais complexa que antes postulado e provavelmente envolve a interação de diferentes processos como haploinsuficiência, inativação do X, *imprinting* e diferenças nos padrões de expressão e metilação gênica (Li *et al.*, 2012; Rajpathak *et al.*, 2014).

A baixa estatura é um dos principais estigmas clínicos associados a ST e afeta 95% a 99% das portadoras, sendo caracterizada pelo retardo do crescimento que começa na vida intrauterina, persiste através da infância e se agrava durante a puberdade. A altura final da mulher adulta com ST varia de 133 a 157 cm, aproximadamente 20 cm abaixo da população com a mesma origem étnica (Gravaholt, 2004). Esta falha no crescimento, bem como outras alterações esqueléticas (palato alto, quarto metacarpo curto, cúbito valgo, pescoço curto e deformidade de Madelung) é atribuída à haploinsuficiência do gene *SHOX* (*Short stature Homeobox gene*), localizado na região pseudoautossômica dos cromossomos sexuais X (Xp22.3) e Y (Yp11.3) (Figura 3) (Bondy, 2009; Davenport, 2010). Ogata *et al.* (2002) sugeriram que o gene *SHOX* tenha uma função repressora da maturação óssea, pois sua haploinsuficiência está relacionada a uma maior susceptibilidade à ação estrogênica nos tecidos ósseos, que leva a fusão prematura das placas de crescimento.

A falência gonadal está presente em mais de 90% das pacientes, sendo responsável pelo infantilismo sexual, ausência de menstruação (amenorreia primária) e esterilidade (Bondy, 2009). As gônadas disgenéticas (ou em fita) das pacientes com ST são constituídas somente por tecido fibroso, não têm função hormonal nem capacidade de produção de gametas, existindo apenas tecido conjuntivo e estroma ovariano. A falência ovariana na ST resulta da aceleração no processo natural de degeneração dos ovócitos, concomitante a um aumento de fibrose no estroma, possivelmente devido à haploinsuficiência dos genes requeridos no segundo cromossomo X, que são reativados durante a ovogênese (Modi *et al.*, 2003; Bondy, 2009; Davenport, 2010). Gestações espontâneas podem ocorrer em 1,8 - 7,6% das portadoras com ST, entretanto aconselhamento genético é necessário antes da concepção, uma vez que apenas 30 - 40% dessas gestações levam a termo uma criança saudável, havendo um alto risco de abortos espontâneos, anomalias congênitas e aneuploidias (Zhong e Layman, 2012; Chakhtoura e Touraine, 2013).

A região de maior importância para a função ovariana é considerada a Xq13-q26 (Figura 3) e translocações neste segmento resultam em apoptose ovocitária com falência ovariana. Deleções do braço curto do cromossomo X (Xp11) levam à perda do pareamento entre os homólogos e atresia dos ovócitos em aproximadamente metade das pacientes, por outro lado, deleções distais em Xp21 levam a um fenótipo menos severo (Zhong e Layman, 2012). Dois segmentos contêm *loci* relacionados à falência ovariana: *FOP1* (falência ovariana prematura 1) localizado em Xq26-qter e *FOP2* (falência ovariana prematura 2) em Xq13.3-q22. Deleções distais que afetem o segmento cromossômico *FOP1* resultam em falência ovariana entre 24 e 29 anos e mutações em *FOP2* levam a disfunção ovariana mais precocemente, entre 16 e 21 anos (Davison *et al.*, 2000; Badalotti *et al.*, 2006). Alguns genes específicos no cromossomo X

que afetam a função ovariana têm sido identificados, incluindo os genes *FMR1* e *BMP15*, uma vez que mutações em ambos resultam em hipogonadismo hipergonadotrófico (Layman, 2002; Zhong e Layman, 2012)

O diagnóstico da ST pode ser realizado através da avaliação pré-natal, com sinais sugestivos ao ultrassom fetal de rotina que incluem: higroma cístico, hidropsia fetal, edema subcutâneo, fêmur curto, aumento da translucência nuchal, retardo do crescimento, anormalidades cardíacas e renais. Em adição, pode-se encontrar na triagem materna tríplice outros indicativos da ST como a redução nas dosagens de α -fetoproteína, estriol não conjugado e aumento das dosagens de gonadotrofina coriônica (hCG) (Bronshtein *et al.*, 2003; Gonzalez e Witchel, 2012). Apesar de estabelecer o diagnóstico no período pré-natal, existe a necessidade obrigatória de confirmação pós-natal através do cariótipo, uma vez que os sinais nestas avaliações não são patognomônicos (Ranke e Saenger, 2001).

Aproximadamente 15 - 30% das pacientes com ST são diagnosticadas durante o período neonatal, a suspeita clínica nesta fase surge pela presença de edema congênito nas mãos e pés, pescoço alado, baixa implantação do cabelo e / ou orelhas, prega nuchal evidente e anomalias cardíacas. Na infância, a baixa estatura e velocidade de crescimento reduzida incluem os sinais indicativos da ST. Cerca de 26% dos casos são diagnosticados durante a adolescência, quando se investiga a baixa estatura, retardo puberal, elevadas concentrações de FSH (Hormônio folículo estimulante) e amenorreia primária ou secundária. Em média 38% dos casos não são diagnosticados até a fase adulta, onde anovulação e infertilidade são as principais manifestações clínicas que conduzem ao diagnóstico da ST (Gravaholt, 2005; Hjerrild *et al.*, 2008; Gonzalez e Witchel, 2012).

O padrão de inteligência é considerado normal em pacientes com ST, porém algumas dificuldades específicas de aprendizagem são relatadas, como distúrbios de memória visual, atenção e raciocínio matemático, em consequência de problemas na percepção espacial e temporal, além de dificuldades psicossociais, déficits psicomotores e neurofisiológicos (Rovet, 2004; Ross *et al.*, 2006). Entretanto, em alguns casos pode ocorrer deficiência mental acentuada associada a um quadro dismórfico distinto do habitual da ST, incluindo severas malformações congênitas em pacientes portadoras do cromossomo X em anel com tamanho pequeno. Esta deficiência está relacionada à ausência de inativação do cromossomo em anel devido à perda do centro de inativação do cromossomo X, levando a dissomia de vários genes que alteram o mecanismo de compensação de dose e o balanceamento da expressão gênica (Suzigan *et al.*, 2005; Mazzaschi *et al.*, 2014).

Apenas 10 a 20% das meninas com ST secretam estrógenos suficientes para que ocorra o desenvolvimento sexual espontâneo. Portanto, a deficiência estrogênica crônica atinge a maioria das pacientes que necessitam de reposição hormonal para desenvolver as características sexuais secundárias, além do ganho e manutenção da massa óssea. No aspecto geral, o tratamento da ST tem como objetivos principais promover o crescimento, repor esteroides sexuais, corrigir sempre que possível as anomalias congênitas ou adquiridas, oferecer suporte psicossocial e consequentemente melhorar a qualidade de vida dessas pacientes (Suzigan *et al.*, 2005; Morgan, 2007).

2.2 Cromossomo Y e Gonadoblastoma

Anormalidades na organogênese das gônadas podem levar ao desenvolvimento de tumores oriundos das células germinativas, especialmente em pacientes que possuem gônadas disgenéticas como as portadoras da ST. Diversos estudos têm

demonstrado que a presença do cromossomo Y ou fragmentos deste em pacientes com ST está relacionada ao aumento de até 35% no risco em desenvolver o gonadoblastoma (GB) (Mazzanti *et al.*, 2005; Bianco *et al.*, 2009; Zelaya *et al.*, 2014). O GB é uma neoplasia *in situ* composta de células germinativas intimamente misturadas a cordões de células sexuais em ninhos circunscritos, geralmente com uma membrana basal hialina, e com calcificações difusas ou focais (Peña-Alonso *et al.*, 2005).

Embora seja considerado um tumor benigno, o GB frequentemente progride para disgerminomas invasivos (50%) e outros elementos malignos de células germinativas (10%), incluindo carcinoma embrionário, teratoma e tumor do saco vitelínico (Looijenga *et al.*, 2003). Dados epidemiológicos demonstram que o GB origina-se quase exclusivamente em gônadas disgenéticas de indivíduos fenotipicamente femininos com disgenesia gonadal e aproximadamente 95% deles possuem material do cromossomo Y em seu genoma (Su *et al.*, 2006; Kido *et al.*, 2014). A incidência do GB é maior que 35% em pacientes com disgenesia gonadal XY, 12-35% em pacientes com ST, 15-20% em pacientes X/XY e 2-10% em hermafroditas verdadeiros. Este tumor também tem sido encontrado em pacientes com mutações nos genes *WT1* e *SOX9*, deleções 9p, sexo reverso e mais raramente em indivíduos com ausência de detecção do cromossomo Y (45,X/46,XX) (Mazzanti *et al.*, 2005; Kanagal *et al.*, 2013).

A maior incidência de tumores em pacientes com disgenesia gonadal e presença do cromossomo Y pode estar relacionada a dois fatores: o tecido gonadal indiferenciado seria mais propenso a transformações neoplásicas e o gene que produz a disgenesia gonadal conferiria propriedades malignas ao tumor; a prevalência aumentada de neoplasias nessas pacientes pode ser resultado da

presença de tecido gonadal indiferenciado em um ambiente anormal (intra-abdominal), uma vez que as células germinativas XY são programadas originalmente para um local com temperatura mais amena (no escroto) e sob uma taxa metabólica mais baixa. Assim, essa posição anormal ocasiona um aumento na taxa metabólica e conseqüentemente, propensão ao processo oncogênico (Lipay *et al.*, 2005).

Em 1987, Page levantou a hipótese da existência do locus GBY (locus do gonadoblastoma no cromossomo Y) localizado na região pericentromérica Yp, o qual predispõe as gônadas disgenéticas ao desenvolvimento do gonadoblastoma. O principal candidato para o processo oncogênico do GB é o gene *TSPY* (*Testis-Specific Protein, Y-linked*), localizado na região crítica do GBY, visto que alguns estudos detectaram a expressão deste gene em tecidos do tumor. O *TSPY* está presente em múltiplas cópias e sua expressão restrita às células germinativas masculinas sugerem uma função na proliferação espermatogonial (Lau *et al.*, 2003; Kido *et al.*, 2014). Por outro lado, o *TSPY* é expresso ectopicamente em estágios precoces e tardios de gonadoblastomas, carcinoma testicular *in situ* e seminomas. Além disso, a expressão aberrante deste gene estimula a atividade de proteínas sintéticas, acelera a proliferação celular e promove tumorigenicidade em camundongos atímicos (Lau *et al.*, 2009).

Uma vez que não existem marcadores sorológicos para detecção precoce do tumor, a gonadectomia bilateral profilática em pacientes com ST e material do cromossomo Y é geralmente recomendada para evitar o GB e uma possível evolução maligna (Mazzanti *et al.*, 2005). Baseadas neste fato, diversas abordagens metodológicas vem sendo utilizadas para detectar mosaicismos crípticos para o cromossomo Y, incluindo PCR, RT-PCR, FISH e *Southern Blot*, a

fim de estimar o risco associado ao GB. Porém os resultados são extremamente variáveis levando a uma controvérsia em relação a real incidência de material derivado do cromossomo Y e seu significado clínico (Binder *et al.* 1995; Modi e Bhartiya 2007; Barros *et al.* 2011).

2.3 Aneuploidias e Metabolismo do folato – Modelo da ST

As aneuploidias cromossômicas são os tipos mais comuns e significativos de distúrbios genéticos em humanos, ocorrendo em aproximadamente 5% de todas as gestações clinicamente reconhecidas e ~35% dos abortos espontâneos. Entre os conceitos que sobrevivem a termo, as aneuploidias constituem a principal causa genética de malformações congênitas e retardo mental. Apesar de sua importância clínica, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao processo de não disjunção que resultam nas aneuploidias ainda não foram completamente elucidados (Hassold *et al.*, 2007; Hassold e Hunt, 2009; Templado *et al.*, 2013). A idade materna é o único fator de risco bem estabelecido para não disjunção meiótica. Adicionalmente, alterações no padrão de recombinação são outro importante mecanismo relacionado à sua etiologia. No entanto, alguns estudos sugerem que a hipometilação de DNA genômico, causada por disfunções no metabolismo do folato, podem ser associados com um padrão alterado de segregação cromossômica e instabilidade meiótica devido a um efeito indireto na estrutura da cromatina centomérica (Hobbs *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004; Chango *et al.*, 2005; Scala *et al.*, 2006).

Folatos são nutrientes essenciais para processos biossintéticos de um carbono e epigenéticos, sendo requeridos na síntese de nucleotídeos e nas reações de metilação do DNA. Deficiências de folato celular resultam em mutações de ponto, quebras

cromossômicas, padrão aberrante de metilação do DNA, erros de segregação cromossômica e aneuploidia (Hobbs *et al.*, 2000; Coppedè *et al.*, 2010). Com base nessas evidências, James *et al.* (1999) postularam que alterações na via do folato, devido a polimorfismos genéticos de enzimas metabólicas, podem resultar em hipometilação do DNA nas regiões centroméricas, aumentando o risco de não disjunção cromossômica e síndrome de Down (SD). Desde então, vários estudos têm sido realizados em diferentes países para investigar esta associação, no entanto, os resultados são muitas vezes contraditórios ou inconsistentes (Hobbs *et al.*, 2000; Bosco *et al.*, 2003; Kokotas *et al.*, 2009; Brandalize *et al.*, 2010; Jaiswal *et al.*, 2015).

A síndrome de Turner é um importante modelo para investigar o efeito de polimorfismos da rota do folato como possíveis fatores de risco para não disjunção cromossômica somática, porque essas pacientes apresentam uma alta frequência de mosaicismos cromossômicos (Santos *et al.*, 2006; Bispo *et al.*, 2013). Devido à necessidade de um segundo cromossomo sexual para a sobrevivência embrionária, estima-se que virtualmente todos os indivíduos recém-nascidos vivos com ST devem apresentar mais de uma linhagem celular, constituindo assim um mosaicismos (Oliveira *et al.*, 2009; Hook e Warburton, 2014). Até a presente data, apenas dois estudos avaliaram a influência de dois polimorfismos comuns do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) e a não disjunção na ST com resultados conflitantes (Santos *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm avaliado a função dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *TYMS* e *RFC-1*, envolvidos na rota do folato, como fatores de risco para as aneuploidias cromossômicas, especialmente na síndrome de Down. O polimorfismo *MTHFR* 677C>T se mostrou um fator de risco independente para SD nas populações

dos Estados Unidos, Canadá, China e Turquia (Hobbs *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Izci *et al.*, 2015). Por outro lado, estudos realizados na Europa (O'Leary *et al.*, 2002; Stuppia *et al.*, 2002; Coppédè *et al.*, 2009) Japão (Takamura *et al.*, 2004) e Índia (Rai *et al.*, 2014) não relacionaram este polimorfismo como fator de risco independente. Da Silva *et al.* (2005) sugeriram que as mães de crianças com SD tendem a ter um maior número de alelos raros do que os controles quando os genes *MTR*, *MTRR*, *MTHFR* e *CBS* foram avaliados em conjunto.

Em um estudo de meta-análise, Coppédè *et al.* (2013) indicaram que o polimorfismo *MTR* 2756A>G constitui um fator de risco para a SD em mulheres caucasianas. No Brasil, os resultados obtidos em diferentes estudos com SD e ST se mostraram contraditórios. Alguns trabalhos evidenciaram associação entre polimorfismos da via do folato e o risco de não disjunção (Grillo *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; Brandalize *et al.*, 2009; Zampiere *et al.*, 2012; Costa-Lima *et al.*, 2013), enquanto outros não conseguiram demonstrar esta relação (Oliveira *et al.*, 2008; Fintelman-Rodrigues *et al.*, 2009; Amorim *et al.*, 2013; Victorino *et al.*, 2014).

Os resultados de vários estudos que avaliaram as interações gene-gene sugerem um elevado risco de não disjunção na SD para portadores de combinações com ambos os alelos 677T e 1298C do gene *MTHFR*, e / ou outros polimorfismos genéticos de diferentes genes participantes da rota metabólica do folato, incluindo o *MTR*, *TYMS*, *MTRR* e *RFC1* (Coppédè *et al.*, 2006; Rai *et al.*, 2006; Scala *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Coppédè *et al.*, 2009). Além disso, interações entre três ou mais polimorfismos, incluindo o alelo *MTHFR* 677T, têm sido associadas a um aumento significativo do risco para SD (da Silva *et al.*, 2005; Coppédè *et al.*, 2007; Biselli *et al.*, 2008). De maneira geral, estes resultados indicam que interações complexas entre

diferentes polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico, e não a presença de uma única variante, podem modular o risco das aneuploidias.

2.4 Metabolismo do folato

O folato ou ácido pteroilglutâmico faz parte do complexo vitamínico B (vitamina B9), considerado um nutriente essencial para o homem, está presente em altas concentrações no levedo de cerveja, vegetais folhosos, carnes, grãos e vísceras. O ácido fólico é a forma totalmente oxidada (monoglutamyl) desta vitamina que é utilizada comercialmente, enquanto o folato é o termo genérico que representa todas as formas da vitamina B9, incluindo seus muitos derivados encontrados nos sistemas biológicos. Naturalmente o ácido pteroilglutâmico é composto por três componentes estruturais, o anel de pteridina, o ácido p-aminobenzóico e o resíduo glutamato (Assaraf, 2007). Os mamíferos não são capazes de sintetizar ácido fólico “*de novo*” por isso devem obtê-lo através da dieta alimentar ou pela flora bacteriana do intestino, uma vez que a ingestão adequada de folato é vital para a divisão e homeostase celular, e sua deficiência determina sérias desordens funcionais (Stover, 2011).

O metabolismo do folato é regulado por uma via complexa que envolve até 30 diferentes enzimas. As enzimas do folato atuam como cofatores em inúmeras reações bioquímicas devido à sua capacidade de doar ou receber unidades monocarbonadas na biossíntese dos precursores de nucleotídeos (purinas e timidilato), catabolismo de histidina e ácido fórmico, síntese de aminoácidos (serina, metionina e glicina), assim como na metilação de ilhas CpG no DNA (Koppen *et al.*, 2010; Nazki *et al.*, 2014).

Diversos sistemas são necessários para permitir a entrada do folato na célula, mas a absorção celular de sua forma predominante no plasma (5-metil THF) é mediada principalmente pelo transportador de folato reduzido (RFC1). Após sua absorção, o

folato é rapidamente reduzido e metilado para formar 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenoTHF) substrato chave para esse metabolismo.

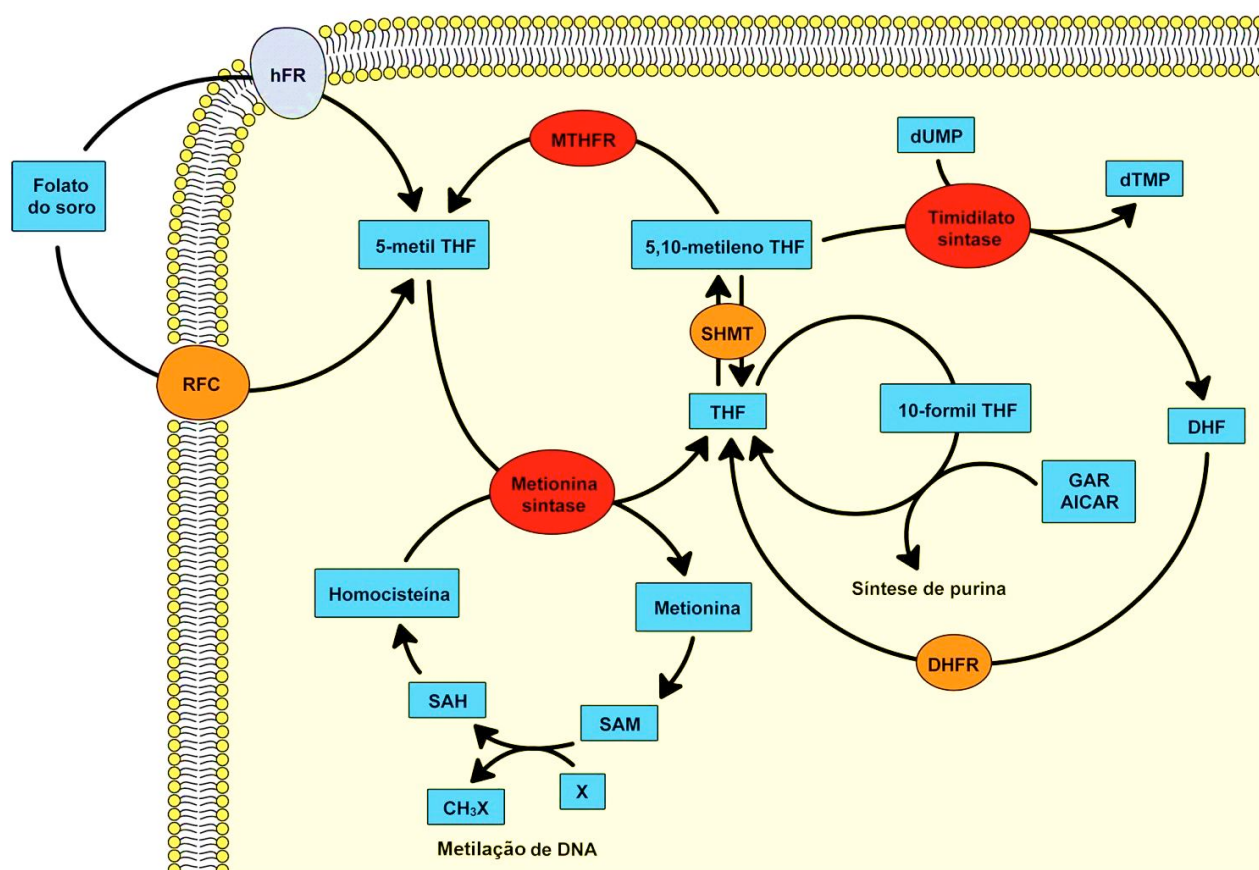


Figura 4. Metabolismo do folato e vias relacionadas. Figura simplificada ilustrando o metabolismo interconectado do folato com suas principais enzimas, inseridas nas elipses, e os substratos, nos retângulos. RFC, carreador de folato reduzido; hFR, receptor de folato humano; MTHFR, metilenotetrahidrofolato redutase; SHMT, serinahidroxi metil transferase; DHFR, dihidrofolato redutase; THF, tetrahidrofolato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; dTMP deoxitimidina monofosfato; DHF, dihidrofolato; GAR, glicinamida ribonucleotídeo; AICAR, aminoimidazol carboxamida ribonucleotídeo; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; X, vários substratos para metilação (Fonte: adaptado de Ulrich et al., 2003).

Subsequentemente, a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) reduz irreversivelmente o 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF (Zhao *et al.*, 2009). Na etapa seguinte deste metabolismo, a enzima metionina sintase (MTR) catalisa a remetilação da homocisteína à metionina, utilizando o 5-metilTHF como doador do radical metil e a

vitamina B12 (ou cobalamina) como cofator para esta reação (Figura 4). A metionina é então adenilada para formar S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador intracelular de grupos metil, utilizado em mais de 100 reações de transmetilação, incluindo a metilação do DNA, RNA, proteínas, neurotransmissores e lipídeos (Niclot *et al.*, 2006; Coppédè *et al.*, 2010; Nazki *et al.*, 2014).

Outra importante função dos derivados metabólicos do folato é a síntese dos precursores de ácidos nucleicos. A timidilato sintase (TYMS) é uma enzima crítica na biossíntese de nucleotídeos (pirimidinas), convertendo dUMP (deoxiuridina monofosfato) a dTMP (deoxitimidina monofosfato), com a conversão simultânea de 5,10-metilenotetrahidrofolato em dihidrofolato (Figura 4). Esta enzima desempenha um papel crucial na biossíntese de DNA por ser a única fonte *de novo* de timidilato. Desta forma, a TYMS é importante para a conservação da integridade gênica e alterações ligadas a esta enzima têm sido associadas com danos cromossômicos (Ulrich *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2009).

O ácido fólico é, portanto, essencial para os processos epigenéticos e manutenção da estabilidade genômica. A deficiência de folato celular resulta em padrões alterados de metilação do DNA, mutações de ponto, quebras cromossômicas e aumento na frequência de micronúcleos (Coppédè, 2009). Além disso, alterações no metabolismo do folato, resultantes de polimorfismos funcionais dos genes que codificam as principais enzimas metabólicas, têm sido associadas com diversas doenças humanas incluindo vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, defeitos no tubo neural e aneuploidias (Liew e Gupta, 2015).

2.4 Genes codificantes das enzimas envolvidas no metabolismo do folato

2.4.1 Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

O gene *MTHFR* está localizado no cromossomo 1 (1p36.3) e apresenta 11 éxons (Goyette *et al.*, 1998). Existe mais de 40 polimorfismos descritos para o gene *MTHFR*, entretanto, dois polimorfismos têm sido amplamente estudados por reduzirem a atividade da enzima. O polimorfismo 677C>T (rs1801133) provoca a substituição de uma alanina por uma valina no aminoácido 222 do domínio catalítico da enzima. Os portadores do genótipo 677TT têm uma redução de 70% na atividade enzimática da MTHFR, enquanto os indivíduos heterozigotos 677CT mantêm cerca 35% de sua função *in vitro* (Izmirli, 2013). Na posição 1298A>C (rs1801131), o polimorfismo determina a substituição de um glutamato por uma alanina no aminoácido 429 no domínio regulatório da enzima. Esta substituição também gera uma enzima com atividade reduzida, sendo mais pronunciada nos homozigotos (CC) comparado ao estado heterozigoto (AC). A enzima MTHFR desempenha um papel crucial no metabolismo do folato e a presença desses polimorfismos confere uma desregulação no adequado fornecimento de radicais metil para as reações celulares (Mandaviya *et al.*, 2014).

A frequência populacional do alelo T para o polimorfismo 677 mostrou grande variação regional e étnica em indivíduos saudáveis. A prevalência do genótipo 677TT varia de 1% na população negra dos EUA e da África até 25% em caucasianos europeus e americanos (Botto e Yang, 2000). Na população brasileira a frequência do genótipo 677TT é maior em pessoas com ascendência europeia (10%), e consideravelmente baixa entre negros (1,45%) e índios (1,2%) (Arruda *et al.*, 1998). Por outro lado, quanto a distribuição do alelo C do polimorfismo 1298, a frequência do genótipo 1298CC varia entre 4-12% em homozigose e 38-42% em heterozigose

1298AC nos estudos com população predominantemente branca (Peng *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2003).

2.4.2 Metionina sintase (MTR)

A metionina sintase, também conhecida como 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase (MTR), é outra enzima importante no metabolismo do folato, a qual mantém os níveis adequados de folato intracelular e previne o acúmulo de homocisteína. O aumento dos níveis sanguíneos de homocisteína tem sido associado à maior probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares, defeitos congênitos e síndrome de Down (Watkins *et al.*, 2002; Niclot *et al.*, 2006).

O gene *MTR* está localizado na região terminal do cromossomo 1 (1q34) e apresenta 12 éxons (Gos e Szpecht-Potocka, 2002). O polimorfismo descrito mais comum 2756A>G (rs1805087) acarreta a substituição de um ácido aspártico por uma glicina na proteína. Tem sido postulado que essa troca por um aminoácido não polar, a glicina, leva a perturbações na estrutura tridimensional e na função da proteína (Chen *et al.*, 1997). Dessa forma, este polimorfismo tem sido associado à indução da hipometilação do DNA, um importante fator na carcinogênese (Skibola *et al.*, 2002).

A distribuição do polimorfismo 2756A>G varia de acordo com as populações estudadas. Sharp e Little (2004) observaram a frequência do genótipo 2756GG em 2-3% japoneses, chineses e europeus, em 6% dos negros americanos e 10-11% entre canadenses. No Brasil foi descrita uma frequência de 1-3,7% do genótipo 2756GG em controles saudáveis (Lima *et al.*, 2008).

2.4.3 Timidilato sintase (TYMS)

A enzima timidilato sintase (TYMS) exerce uma função crucial na manutenção do fornecimento equilibrado de desoxinucleotídeos necessária para a síntese e reparo do DNA, através da síntese *de novo* de pirimidinas (Candelaria *et al.*, 2005). Esta enzima

catalisa a metilação redutiva de 2'-deoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) em 2'-deoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP) utilizando o 5,10-MTHFR como doador de radicais metil (Kanaan *et al.*, 2009). Desta forma, a TYMS compete com a enzima MTHFR pelo mesmo substrato (5,10-metilenTHF) para realizar esta conversão (Skibola *et al.*, 2002).

O gene *TYMS* está localizado no braço curto do cromossomo 18 (18p11.32) e seu produto apresenta 313 aminoácidos (Hishida *et al.*, 2003). O gene possui um polimorfismo na região promotora acentuadora (TSER, *thymidylate synthase inenhancer region*), mais especificamente, na região 5' não traduzida (5'-UTR), imediatamente anterior ao códon de iniciação ATG. Esta sequência polimórfica consiste em 28pb repetidos *em tandem* duas (2R) ou três (3R) vezes. A presença de 3R versus 2R, mostrou aumentar a transcrição do mRNA e a expressão da proteína *in vitro* e *in vivo*, conseqüentemente, uma expressão aumentada deste gene, pode aumentar a conversão de dUMP para dTMP, reduzindo a chance de má incorporação de uracil no DNA (Kawakami, 1999; Hishida *et al.*, 2003). No estudo conduzido por Sharp e Little (2004), a frequência do genótipo 2R/2R variou de 19-23% na população branca, enquanto na população negra 14-20% dos indivíduos eram portadores homozigotos da variante (3R3R).

A enzima TYMS atua na manutenção da estrutura e no mecanismo de reparo do DNA, sendo responsável pela única fonte de timidilato no interior da célula (Kanaan *et al.*, 2009, Zhuang *et al.*, 2009). A inibição dessa enzima resulta na diminuição da quantidade de deoxitimidina trifosfato (dTTP), indução de quebras cromossômicas, formação de sítios frágeis e morte celular (Marsh, 2005).

2.4.4 Carreador de folato reduzido (RFC)

Diversos sistemas permitem a entrada do ácido fólico nas células, entretanto a absorção da forma plasmática de folato ocorre predominantemente via carreador de

folato reduzido (RFC), ou carreador de folato reduzido humano (RFCh). O RFCh é uma proteína transmembrana expressa principalmente na mucosa intestinal, contudo existem evidências da atuação do RFCh em tecidos especializados, incluindo transporte de folato transplacentário, através da barreira hemato-cerebral e na membrana basolateral dos túbulos renais (Zhao *et al.*, 2009).

O Carreador de folato reduzido é codificado pelo gene *SLC19A1*, amplamente conhecido como gene *RFC-1*, o qual está localizado no braço longo do cromossomo 21 (21q22.2). Em 2000, Chango *et al.* identificaram um polimorfismo relativamente frequente 80G>A (rs1051266) do gene *RFC-1*, o qual resulta na substituição do aminoácido histidina por arginina na estrutura da molécula. Este polimorfismo tem sido associado a uma diminuição da afinidade do receptor e alterações no transporte transmembrana do folato, e consequente aumento nos níveis de homocisteína plasmática (Chango *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2009). Em relação à frequência das variantes do polimorfismo 80G>A, O'Leary *et al.* (2005) identificaram o genótipo 80GG em 30% dos euro-descendentes e em 20% dos negros africanos.

Dada à importância do RFCh para a homeostase de folato na célula, alterações em sua função transportadora, mediadas principalmente pela presença de polimorfismos, podem contribuir para condições fisiopatológicas associadas com a deficiência de folato, incluindo hipometilação do DNA e o risco de não disjunção, que ainda podem ser agravados por adicionais mudanças na atividade catalítica de outras enzimas chaves no metabolismo do folato (Coppedè *et al.*, 2013).

2.5 Metilação do DNA e não disjunção

A metilação do DNA é uma marca epigenética herdável que regula a estrutura da cromatina e a expressão gênica em processos como a inativação do cromossomo X,

imprinting, gametogênese, embriogênese e silenciamento de elementos de DNA repetitivo, estando geralmente associada à repressão transcricional (Gopalakrishnan *et al.*, 2009). O processo de metilação envolve a adição covalente de um grupo metil (CH_3), doado por SAM, na posição 5 da base citosina em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG). Em humanos os padrões de metilação são estabelecidos e mantidos pelas DNA metil-transferases (DNMTs) DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, as quais, são essenciais para regulação da cromatina, expressão gênica e estabilidade genômica (Barra *et al.*, 2012). Em experimentos com animais, a remoção dos genes que codificam as enzimas DNMTs é letal, enquanto em humanos a desregulação dessas enzimas tem sido associada à hipometilação global do DNA, aneuploidia, poliploidia, fusões, quebras cromossômicas e o desenvolvimento de vários tipos de câncer (Rodenhiser e Mann, 2006; Herrera *et al.*, 2008).

A metilação do DNA combinada à desacetilação das histonas promovem a hipercondensação característica da cromatina centromérica e pericentromérica, essencial para estabilização e correta segregação dos cromossomos (Stimpson e Sullivan, 2010). Desregulações induzidas no gene *DNMT1* em culturas de células de fibroblastos humanos resultam em descondensação da cromatina e consequente aneuploidia (Barra *et al.*, 2012). Gopalakrishnan *et al.* (2009) identificaram uma interação entre DNMT3b e CENP-C (proteína constitutiva do centrômero – C), essencial para a divisão celular. Esses autores demonstraram que a perda da função de ambas proteínas promovem significativo decréscimo da metilação do DNA na região do centrômero, causando erros na segregação cromossômica durante a mitose em células humanas.

Estudos clínicos e experimentais têm reforçado a importância da metilação pericentromérica para correta disjunção cromossômica (Hobbs *et al.*, 2000). Por exemplo, uma desordem autossômica recessiva rara, a síndrome ICF (Imunodeficiência,

instabilidade Centromérica e anomalias Faciais), exibe profunda instabilidade cromossômica associada à hipometilação centromérica do DNA α -satélite, descondensação da heterocromatina e rearranjos complexos dos cromossomos em estruturas multirradiadas. Defeitos na função de linfócitos B, tais como reduzida produção de imunoglobulinas, retardo mental, atraso no desenvolvimento e anomalias faciais constituem alterações fenotípicas comuns em pacientes com ICF. A origem genética desta síndrome é atribuída a uma mutação no gene que codifica a DNA metiltransferase 3B (*DNMT3B*) e dá suporte a relação causal entre hipometilação do DNA, descondensação pericentromérica e segregação anormal dos cromossomos (Valinluck *et al.*, 2004; Gisselsson *et al.*, 2005; Gopalakrishnan *et al.*, 2009).

Estudos realizados com 5-azacitidina (5-aza-C), um potente agente desmetilador, proporcionaram evidências adicionais da associação entre hipometilação do DNA e instabilidade cromossômica. Culturas de células tratadas com 5-aza-C apresentaram hipometilação pericentromérica, erros de segregação cromossômica e aneuploidias (Leyton *et al.*, 1995; Mosiolek *et al.*, 2005). Além disso, tem sido evidenciado que as aneuploidias e a instabilidade cromossômica, presentes na maioria dos cânceres humanos, estão diretamente relacionadas à hipometilação do DNA, confirmando que o padrão de metilação do DNA também contribui para a carcinogênese. Juntos, esses dados demonstram que a metilação adequada do DNA pericentromérico é essencial para a organização e segregação cromossômica normal (Herrera *et al.*, 2008; Gopalakrishnan *et al.*, 2009).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Inferir o potencial desenvolvimento do gonadoblastoma associado a presença do cromossomo Y, bem como investigar o efeito de polimorfismos genéticos na rota do folato modulando o risco de não disjunção cromossômica somática em pacientes com síndrome de Turner.

3.2 Objetivos específicos

1. Selecionar as portadoras da ST a partir da realização do exame citogenético nas pacientes com a suspeita clínica;
2. Inferir o potencial desenvolvimento de malignidade, identificando sequências específicas do cromossomo Y no genoma nas pacientes com ST;
3. Estabelecer uma possível preferência de rearranjos entre cromossomos específicos nos casos Y-positivos, determinando a localização física destes segmentos no cariótipo através da técnica de FISH;
4. Verificar a possível associação e / ou uma interação entre os polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C, *MTR* A2756G, *RFC* G80A e as repetições 2R/3R do *TYMS*, de genes envolvidos no metabolismo do folato, e a não disjunção cromossômica somática nas pacientes com ST.

4. Capítulo I

Y-chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case.

Adriana Valéria Sales Bispo¹, Pollyanna Burégio-Frota², Luana Oliveira dos Santos¹, Gabriela Ferraz Leal³, Andrea Rezende Duarte³, Jacqueline Araújo⁴, Vanessa Cavalcante da Silva⁶, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{5,7}, Thomas Liehr⁸, Neide Santos¹.

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

²Laboratório de Pesquisa Translacional Prof. C. Anthony Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP).

³Unidade de Genética Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP).

⁴Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital das Clínicas HC/UFPE.

⁵Centro de Oncohematologia Pediátrica de Pernambuco, Hospital Oswaldo Cruz/UPE.

⁶Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo-EIM, Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP

⁷Instituto de Ciências Biológicas, UPE – Recife, PE, Brasil

⁸Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics.

Manuscrito publicado no Periódico **Reproduction, Fertility and Development**

ISSN: 1031-3613

eISSN: 1448-599

Fator de Impacto: 2,577 Qualis B1 – CB1 Capes

Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case

Adriana Valéria Sales Bispo^{A,I}, Pollyanna Burégio-Frota^B, Luana Oliveira dos Santos^A, Gabriela Ferraz Leal^C, Andrea Rezende Duarte^C, Jacqueline Araújo^D, Vanessa Cavalcante da Silva^F, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{G,E}, Thomas Liehr^H and Neide Santos^A

^ADepartamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, PE, Brasil.

^BLaboratório de Pesquisa Translacional Prof. C. Anthony Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Rua dos Coelhos 300, Boa Vista, 50070-050, Recife, PE, Brasil.

^CUnidade de Genética Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Rua dos Coelhos 300 Boa Vista. 50070-050, Recife, PE, Brasil.

^DUnidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital das Clínicas HC/UFPE, Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, PE, Brasil.

^ECentro de Oncohematologia Pediátrica de Pernambuco, Hospital Oswaldo Cruz/UPE, Rua Arnóbio Marques 310, Santo Amaro, 50100-130, Recife, PE, Brasil.

^FLaboratório de Erros Inatos do Metabolismo-EIM, Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, Rua Sena Madureira 1500, Vila Mariana, 04021-001, São Paulo, SP, Brasil.

^GInstituto de Ciências Biológicas, Rua Arnóbio Marques 310, Santo Amaro, 50100-130, Recife, PE, Brasil.

^HJena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Kollegiengasse 10, D-07743 Jena, Germany.

^ICorresponding author. Email: bispo_adriana@hotmail.com

Abstract. Turner syndrome (TS) is a common genetic disorder in females associated with the absence of complete or parts of a second sex chromosome. In 5–12% of patients, mosaicism for a cell line with a normal or structurally abnormal Y chromosome is identified. The presence of Y-chromosome material is of medical importance because it results in an increased risk of developing gonadal tumours and virilisation. Molecular study and fluorescence *in situ* hybridisation approaches were used to study 74 Brazilian TS patients in order to determine the frequency of hidden Y-chromosome mosaicism, and to infer the potential risk of developing malignancies. Additionally, we describe one TS girl with a very uncommon karyotype 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3?2;q11.23) comprising a partial monosomy of Xp22.3?2 together with a partial monosomy of Yq11.23. The presence of cryptic Y-chromosome-specific sequences was detected in 2.7% of the cases. All patients with Y-chromosome-positive sequences showed normal female genitalia with no signs of virilisation. Indeed, the clinical data from Y-chromosome-positive patients was very similar to those with Y-negative results. Therefore, we recommend that the search for hidden Y-chromosome mosaicism should be carried out in all TS cases and not be limited to virilised patients or carriers of a specific karyotype.

Additional keywords: gonadoblastoma, X-monosomy.

Received 29 June 2013, accepted 13 September 2013, published online 21 October 2013

Introduction

Turner syndrome (TS) is a relatively common chromosomal abnormality affecting ~1/2500 of live-born girls (Stochholm *et al.* 2006). The most consistent clinical manifestations are short stature and gonadal dysgenesis, leading to delayed pubertal development, primary amenorrhea and sterility; a

variety of dysmorphic stigmata is facultative. A karyotype 45,X accounts for 50–60% of the cases, while the remaining patients have a structurally abnormal X chromosome, including Xp or Xq deletion, isochromosome formation of the long arm and ring chromosomes. Karyotypes can, but must not, be mosaics with a second cell line containing a normal or abnormal sex

chromosome. Few cases present complex karyotypes including reciprocal translocations between autosomes and derivative X chromosomes (Burégio-Frota *et al.* 2010; Elleuch *et al.* 2010; Paramayuda *et al.* 2012; Zhong and Layman 2012).

Cytogenetic analysis detects a Y chromosome in 5–9% of TS patients, mostly as an isodicentric derivative, and a further 3% of the cases have an unidentifiable marker chromosome, which is Y-derived in ~1/3 of the cases (Liehr *et al.* 2007), and is most often, but not always derived from an X or a Y chromosome (Sheth *et al.* 2009). Banding cytogenetic analysis may not detect structurally abnormal chromosomes if they are small or rare. Thus, it has been proposed that a hidden mosaicism, for at least part of the Y chromosome, may be present more frequently. Several studies have demonstrated a frequency of Y-chromosome-derived material in TS patients ranging from 0 to 61%, depending on the methodological approach (Patsalis *et al.* 1998; Gravholt *et al.* 2000; Bianco *et al.* 2006; Araújo *et al.* 2008; Sallai *et al.* 2010). Early identification of Y-chromosome-derived sequences in TS patients is of great clinical importance due to an increased risk of gonadal tumours, such as gonadoblastoma, and virilisation, when the Y chromosome (or part of it) is present in the genome of patients with dysgenetic gonads (Tsuchiya *et al.* 1995; Bianco *et al.* 2006; Brant *et al.* 2006).

Gonadoblastoma (GB) is a neoplasm composed of germ cells and sex-cord elements resembling immature Sertoli or granulosa cells that has the potential for malignant transformation (Peña-Alonso *et al.* 2005). This tumour is mainly found in females with gonadal dysgenesis and almost 95% of them have Y-chromosome material in their genome (Horn *et al.* 2005). Since there are no serum markers for screening and early tumour detection, prophylactic gonadectomy is generally recommended before developing GB (Magtibay 2004; Mazzanti *et al.* 2005). Therefore, using diverse molecular approaches, such as polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription PCR (RT-PCR), fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) and Southern blot analysis, several studies have evaluated the occurrence of cryptic Y-chromosome mosaicism in TS patients in order to estimate the associated risk of GB. However, the results have been extremely variable leading to a controversy regarding the incidence of Y-chromosome-derived material in the genome of such patients (Binder *et al.* 1995; Mancilla *et al.* 2003; Modi and Bhartiya 2007; Barros *et al.* 2011).

In the present study, the frequency of hidden Y-chromosome mosaicism was investigated in 74 Brazilian TS patients to infer the potential risk of developing malignancies. PCR-based molecular study and FISH approaches were used to screen these patients for Y-chromosome-specific sequences and the presence of its material was correlated with individual clinical data. Additionally, we describe a girl with TS and an uncommon X; Y translocation.

Materials and methods

Patients

From May 2006 to March 2013 banding cytogenetic analyses performed in 74 patients with clinical indication of TS confirmed this diagnosis. All patients attended the Service of Medical Genetics at the Institute of Integral Medicine Professor

Fernandes Figueira and the Service of Paediatric Endocrinology at Clinics Hospital of the Federal University of Pernambuco. Detailed clinical data for patients were obtained by physical examination, ultrasound evaluation and review of the medical records. The age at the time of diagnosis ranged from newborn to 35 years of age.

This study was designed according to the guidelines and regulating norms of the National Health Council for researches involving human subjects and its resolution No. 196 of October 10, 1996. Informed consent was obtained from all patients or their parents. The project has been approved by the Ethical Committee (Record: CEP/IMIP N° 802/06).

Cytogenetic and FISH analyses

Cytogenetic studies were based on peripheral lymphocytes using standard procedures for their preparation and banding of the chromosomes. Twenty to fifty GTG-banded metaphases were analysed for each patient.

FISH analysis was performed according to standard procedures. Besides commercially available centromere specific probes cep X and Y-specific probes (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil) in the studied cases, in Case 5 also the subtelomeric probe (subtel) for Xpter/Ypter, and the probes for Yq12 and AZFc, and the Kalmann syndrome region in Xp22.3 (LSI KAL; Abbott) were applied. Home-made probes consisting of a subcenM-FISH Mix for the X chromosome as described in Starke *et al.* (2003) and the probe RP11–631P15 in Yq11.23 were also used in Case 5.

Molecular analysis

Genomic DNA was isolated from 200 µL of peripheral blood using a commercial DNA isolation kit (DNA Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin; GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil). To avoid contamination with male DNA, a female operator performed all DNA extractions.

DNA was amplified using four primer sets encompassing genomic regions of the Y chromosome – *SRY*, *TSPY*, *AMGY*, *DAZ*. The co-amplification of the β -globin gene was performed as a quality control for all experiments. Primer sequences, annealing temperatures and size of the amplified fragments are described in Table 1. Multiplex PCR was performed in a final reaction volume of 25 µL containing 100–200 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.02 mM of each dNTP, 10 pmol of each Y-chromosome primer, 8 pmol β -globin primers and 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen/Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil). The amplification reaction was carried out in a thermal cycler and consisted of a 5-min denaturing step at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at annealing temperatures varying from 58 to 64°C according to the primers and 1 min at 72°C. After a final extension cycle of 10 min at 72°C, the PCR reaction was electrophoresed on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and recorded.

Several precautions were taken to avoid false-positive results, including the processing of all samples by the same female operator and the use of a positive control of the reaction (β -globin gene). Healthy male and female DNA and blank reactions were used as controls for all runs. In addition, the

Table 1. Primer sequence, annealing temperature and product size

Gene	Primer sequence	Annealing temperature	Fragment (bp)
<i>SRY</i>	F: 5' GGA ATT CCC TAA CTC TAA GTA TCA GTG T 3' R: 5' GGA ATT CCG CAA ACT GCA ATT CTT CGG C 3'	58°C	314
<i>AMGY</i>	F: 5' AGC TTG GTT CTA TCC CAT CC 3' R: 5' ACA TTT GTC AGC AGC TTG TG 3'	64°C	367
<i>DAZ</i>	F: 5' TAA ATC TGT TGG ATC CTC TCA GC 3' R: 5' CAC AGA ACC AGG TTC TAA ATA AAC A 3'	64°C	210
<i>TSPY</i>	F: 5' GGC TTC TCA TTC CAC TCC AA 3' R: 5' CCT CTT CAG GTG GCT TCA TC 3'	60°C	312
<i>β-Globin</i>	F: 5' CCT GAG AGC TTG CTA GTG ATT 3' R: 5' TAG TCC CAC TGT GGA CTA CTT 3'	58–64°C	610

samples of each patient were tested by PCR three times to confirm the results.

Results

All 74 patients studied disclosed diverse classical TS stigmata, such as short and webbed neck, lymphedema of hands and feet, low posterior hairline, widely spaced nipples, epicanthal folds, shortening of the metacarpal bones and high arched palate. The most common features were short stature (present in 90% of the cases) and gonadal dysgenesis with delayed pubertal and primary amenorrhea (in 85% of the patients). None of the cases presented signs of virilisation. Table 2 shows a summary of the detected karyotypes for all 74 patients. The most frequent karyotype was 45,X, present in 63.5% of the cases, followed by mosaicism involving structural anomalies of the X chromosome. There were three patients with mosaic karyotypes including the Y chromosome, three cases with mosaicism for a ring derived from the X chromosome and one case with a 45,X/46,X,+mar karyotype.

The PCR approach specified in the Materials and Methods section was performed in all TS patients regardless of their karyotype, and showed the presence of Y-chromosome-specific sequences in five of the patients (6.8%). Two of those had a karyotype that did not suggest the presence of Y-chromosome material, indicating a 2.7% frequency of hidden Y-chromosome mosaicism in the TS patients analysed. The molecular and clinical data of the Y-chromosome-positive patients is summarised in Table 3. Prophylactic laparoscopic gonadectomy was offered for all patients with Y-chromosome material to prevent gonadal lesions or tumours; however, they have opted for periodic and meticulous gonadal monitoring via ultrasound or tomography.

Patients 1, 2, 4 and the male control were positive for all investigated regions by PCR. On the other hand, in Patients 3 and 5 the *DAZ* and *TSPY* sequences were detected, but not the *SRY* and *AMGY* segments. The results of PCR amplification for Y-chromosome sequences are shown in Fig. 1. All Y-chromosome-positive patients showed normal female genitalia with no signs of virilisation. Additionally, the clinical data from these TS patients was very similar to those with Y-chromosome-negative results.

Table 2. Distribution of Turner syndrome karyotypes

Karyotype	Number of patients	Frequency (%)
45,X	47	63.5%
45,X/46,XX	1	1.4%
45,X/47,XXX	1	1.4%
46,X,i(Xq)/45,X	12	16.2%
46,X,r(X)/45,X	3	4.1%
46,X,del(Xp)/45,X	1	1.4%
46,X,inv dup(Xq)/45,X	1	1.4%
45,X/46,X,+mar	1	1.4%
45,X/46,XY	3	4.1%
46,X,i(Xq)	4	5.4%
Total	74	100%

FISH analysis was carried out in order to confirm the PCR results and precisely determine the physical location of the hidden Y-chromosome material in the patient's karyotypes. FISH results confirmed Y-chromosome positivity in the cases that were shown by PCR to have cryptic Y-chromosome material. In Case 4, none of the 100 metaphases analysed showed a Y-chromosome-specific signal. However, 10/500 interphase nuclei presented a Y-chromosome signal. In five of the ten nuclei two Y-chromosome-specific signals were visible. This could be indicative for an isodicentric Y chromosome, which could have been unstable during mitosis. G-banding chromosome analysis showed a karyotype of 46,X,i(Xq) in Case 5 and molecular PCR approaches detected Y sequences (*DAZ* and *TSPY*). The *SRY* and *AMGY* loci were lost. Further clarification by molecular cytogenetics revealed the chromosomal constitution of the patient as 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3?2;q11.23). The rearrangement was unbalanced, comprising a partial monosomy of Xp22.3?2 including deletion of the subtelomere region in Xpter but not including the KAL-gene region, together with a partial monosomy of Yq11.23 to Yqter (Fig. 2).

Discussion

Molecular detection of Y-chromosome mosaicism is of fundamental clinical value due to its association with gonadal malignancy. In the present study, hidden Y-chromosome

Table 3. Genetic constitution and clinical reports of Turner patients with Y-chromosome positivity

Patient	Karyotype	Age (years)	Y sequences				Clinical features
			<i>SRY</i>	<i>AMGY</i>	<i>TSPY</i>	<i>DAZ</i>	
1	45,X[15]/46,XY[5]	15	+	+	+	+	Short stature, nail hypoplasia, reduced uterus and ovaries not visualised at ultrasound, no signal of virilisation and normal female genitalia.
2	45,X[11]/46,XY[9]	17	+	+	+	+	Short stature, primary amenorrhea, delayed puberty, absence of sexual features, reduced uterus and ovaries not visualised at ultrasound, no signal of virilisation and normal female genitalia, nail hypoplasia, low posterior hairline, cubitus valgus, bone age below chronologic age. FSH = 82.8.
3	45,X[31]46,XY[4]	9	–	–	+	+	Primary amenorrhea, delayed puberty, absence of sexual development, absence of breast development, magnetic resonance of the pelvis with paramagnetic contrast showed reduced uterus, ovaries not visualised, no masses or collections on its topography and absence of pelvis lymphadenopathy, no signal of virilisation and normal female genitalia. FSH >100, LH = 31.8, TSH = 1.77, prolactin = 11.1, testosterone = 0.418, free T4 = 1.21.
4	45,X[50]	23	+	+	+	+	Short stature, webbed neck, low posterior hairline, hypoplasia of the fourth metacarpal bone, primary amenorrhea, delayed puberty, hypergonadotrophic hypogonadism, uterus and ovaries normal at ultrasound, bone age below chronologic age, osteopenia, no signal of virilisation and normal female genitalia. FSH >100, LH = 98.32, testosterone = 0.02, TSH = 1.35, oestradiol = 4.
5	46,X,i(Xq)[25]	18	–	–	+	+	Short stature, low hairline, cubitus valgus, hypoplasia of the fourth metacarpal bone, highly arched palate, the larche at 7 years old which disappeared at age of 9, no signal of virilisation and normal female genitalia. TSH = 12.6, free T4 = 1.0.

mosaicism was observed at a relatively low frequency – i.e. in 5 out of 74 TS patients. This report described the first study on TS patients from north-eastern Brazil and even though we present the lowest frequency of Y-chromosome mosaicism (2.7%), the results are consistent with other studies conducted in Brazilian patients reporting cryptic Y-chromosome-material presence of 5.5%, 3%, 4.8% or 3.8% (Mendes *et al.* 1999; Nishi *et al.* 2002; Araújo *et al.* 2008; Barros *et al.* 2011).

Using molecular methods, previous studies reported a highly variable frequency of cryptic Y-chromosome mosaicism in TS, depending mainly on the methodology applied and possibly the population studied. Other factors that may have contributed to this variability include differences in the selection of the patients, the Y-chromosome sequences analysed and the number of patients studied with marker or ring chromosomes (Mancilla *et al.* 2003; Modi and Bhartiya 2007; Semerci *et al.* 2007). We detected occult Y-chromosome sequences in two cases, one with 45,X and the other with a previous 46,X,i(Xq) karyotype. Similar findings were reported previously in TS patients (Binder *et al.* 1995; Álvarez-Nava *et al.* 2003; Mancilla *et al.* 2003; Mazzanti *et al.* 2005). Sallai *et al.* (2010) investigated four Y-chromosome regions in 130 Hungarian patients by RT-PCR and found cryptic mosaicism in six of them, having the following chromosome constitution: 45,X (three cases), 45,X/46,X,+mar (two cases) and 45,X/46,X,del(Xq) (one case). Taken together with our findings, this supports a systematic search for Y-chromosome sequences in TS patients regardless of their karyotypes.

Bianco *et al.* (2009) performed PCR analysis applying three Y-chromosome-specific sequences (*SRY*, *TSPY* and *DYZ3*) in

87 TS cases and found 16 patients (18.5%) with hidden Y-chromosome mosaicism for the *SRY* sequence, while the other markers were present in only four (4.6%) of them. Up to now, there has been no consensus on which of the Y-chromosome sequences are relevant in studies with this purpose. Based on its localisation and importance in the signalling cascade of sex-determining events, the *SRY* gene has been the most investigated sequence. Additionally, the detection of this marker is almost unanimous in studies with TS patients and Y mosaicism (Mendes *et al.* 1999; Mancilla *et al.* 2003; Semerci *et al.* 2007; Bianco *et al.* 2009). Nevertheless, despite its high occurrence in previous reports, we were unable to detect the *SRY* sequence in two of our patients, showing that the Y-chromosome, when present, is not always intact and may even lack the Ypter region. Therefore, we suggest the use of at least the four markers used in the present study (*SRY*, *AMGY*, *TSPY* and *DAZ*) that encompass genomic regions of the Y chromosome to screen TS patients.

Another important point that deserves further consideration is which TS patients should be assessed at the DNA level. Some authors have recommended the search for Y-chromosome sequences only in patients with evidence of virilisation, clitoromegaly or when a chromosome marker cannot be characterised by banding cytogenetics (Page 1994; Chu 1999; Frías and Davenport 2003). According to Bianco *et al.* (2006), this recommendation should be extended to all patients who have a 45,X karyotype in peripheral blood. Contrary to these proposals, we identified carriers of cryptic Y-chromosome material in one case with a previous 46,X,i(Xq) karyotype without

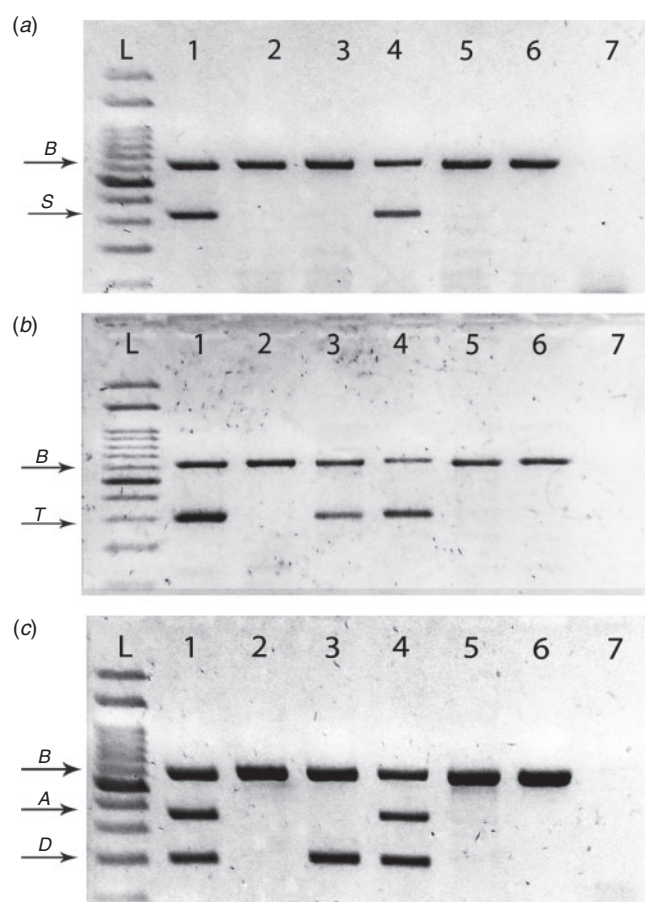


Fig. 1. Electrophoretic analysis of PCR products using Y-chromosome primers. (a) Identification of *SRY*; the 314-bp band (arrowhead with S) indicates the gene's presence. (b) Identification of *TSPY*; the 312-bp band (arrowhead with T) shows the gene's presence. (c) Identification of the *AMGY* and *DAZ* genes; the 367-bp band (arrowhead with A) and 210-bp band (arrowhead with D), respectively, indicates the gene's presence. The 610-bp band (arrowhead with B) present in all PCR products represents the β -globin gene, used as a positive control of the reaction. L, 100-bp ladder (molecular weight marker); 1, male control; 2, female control; 3, 4, 5 and 6, patients with TS; 7, blank reaction.

mosaicism, and in patients who had neither signs of virilisation nor marker chromosomes (Table 3). Indeed, there was no association with Y-chromosome-material positivity and the clinical signs of the patients. Additionally, in our series, three patients presented a lineage with a marker or ring chromosome and none of them disclosed the presence of Y material in their genome.

We also described a girl with a karyotype 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3?2;q11.23). Such X;Y unbalanced translocations are very unusual structural chromosome rearrangements in females, with only ~70 cases reported previously. Males with t(X;Y) may have X-linked disorders, such as contiguous gene syndromes, depending on the extent of the Xp deletion, while most females are phenotypically normal except for short stature (Frints *et al.* 2001; Bukvic *et al.* 2010; Palka-Bayard-de-Volo *et al.* 2012). However, our patient presented a classical TS phenotype, as seen in only a

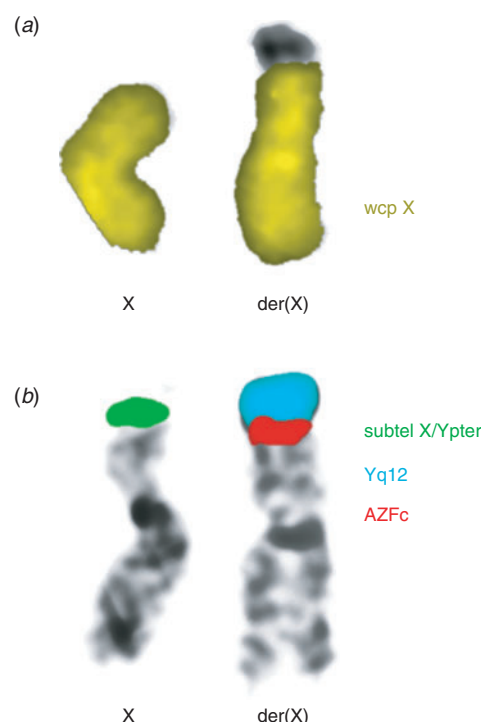


Fig. 2. FISH results of the case with a karyotype 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3?2;q11.23). (a) Whole chromosome paint (WCP) for chromosome X, showing extra chromosome material not derived from the X chromosome. (b) Subtelomeric probe (subtel) for Xpter/Ypter (green), and the probes for Yq12 (blue) and AZFc (red), confirmed the X;Y translocation.

few patients (Kelly *et al.* 1984; Kuznetzova *et al.* 1994). Recently, Portnoi *et al.* (2012) described an unusual case of familial TS with mosaicism for a novel X;Y translocation involving Xp and Yp. TS patients with euchromatic Y-chromosome material have an increased risk of developing gonadoblastoma or dysgerminoma. In fact, the *TSPY* gene, which maps in the pericentromeric region of Yp chromosome, has recently been established to be the putative gene involved in the development of gonadoblastoma, acting as an oncogene in the dysgenetic gonads (Delbridge *et al.* 2004). In the case of our Patient 5, this Yp region was shown to be present on the derivative t(X;Y) chromosome, allowing us to include this case in the risk of developing gonadal malignancies.

In conclusion, based on our results and data from the literature, we recommend that meticulous search of hidden Y-chromosome mosaicism should be carried out by molecular techniques in all TS cases and must not be limited to virilised patients and carriers of a specific karyotype. Because of the high risk of gonadal tumour development, prophylactic gonadectomy should be offered to all TS patients with identified Y-chromosome material in order to prevent malignancy with absolute certainty.

Acknowledgements

The authors thank the patients, parents and clinicians for the data. Research supported by Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE – APQ-0335–2.02/06). The authors have no potential conflict of interest.

References

- Álvarez-Nava, F., Soto, M., Sánchez, M. A., Fernández, E., and Lanes, R. (2003). Molecular analysis in Turner syndrome. *J. Pediatr.* **142**, 336–340. doi:10.1067/MPD.2003.95
- Araújo, C., Galera, M. F., Galera, B. B., Silvestre, F. G., and Medeiros, S. F. (2008). Molecular identification of chromosome Y sequences in Brazilian patients with Turner syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **24**, 713–717. doi:10.1080/09513590802444142
- Barros, B. A., Moraes, S. G., Coeli, F. B., Assumpção, J. G., De Mello, M. P., Maciel-Guerra, A. T., Carvalho, A. B., Viguetti-Campos, N., Vieira, T. A., Amstalden, E. M., Andrade, J. G., Esquiveto-Aun, A. M., Marques-de-Faria, A. P., D'Souza-Li, L. F., Lemos-Marini, S. H., and Guerra, G., Jr (2011). OCT4 immunohistochemistry may be necessary to identify the real risk of gonadal tumours in patients with Turner syndrome and Y-chromosome sequences. *Hum. Reprod.* **26**, 3450–3455. doi:10.1093/HUMREP/DER310
- Bianco, B., Lipay, M. V. N., Melaragno, M. I., Guedes, A. D., and Verreschi, I. T. (2006). Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **19**, 1113–1117. doi:10.1515/JPEM.2006.19.9.1113
- Bianco, B., Lipay, M., Guedes, A., Oliveira, K., and Verreschi, I. T. (2009). *SRY* gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoural gonadal lesions in Turner syndrome. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **28**, 197–202. doi:10.1097/PGP.0B013E318186A825
- Binder, G., Koch, A., Wajs, E., and Ranke, M. B. (1995). Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 3532–3536. doi:10.1210/JC.80.12.3532
- Brant, W. O., Rajimwale, A., Lovell, M. A., Travers, S. H., Furness, P. D., III, Sorensen, M., Oottamasathien, S., and Koyle, M. A. (2006). Gonadoblastoma and Turner syndrome. *J. Urol.* **175**, 1858–1860. doi:10.1016/S0022-5347(05)00932-8
- Bukvic, N., Delli Carri, N. V., Di Cosola, M. L., Pustorinon, G., Cesarano, C., Chetta, M., Santacroce, R., Sarno, M., Sessa, F., Longo, V., Novelli, A., Gentile, M., and Margaglione, M. (2010). Familial X;Y translocation with distinct phenotypic consequences: characterization using FISH and array CGH. *Am. J. Med. Genet. Part A.* **152A**, 1730–1734. doi:10.1002/AJMG.A.33437
- Burégio-Frota, P., Valença, L., Leal, G. F., Duarte, A. R., Bispo-Brito, A. V., Soares-Ventura, E. M., Marques-Salles, T. J., Nogueira, M. T., Muniz, M. T., Silva, M. L., Hunstig, F., Liehr, T., and Santos, N. (2010). Identification of a *de novo* inv dup(X)(pter-> q22) by multicolour banding in a girl with Turner syndrome. *Genet. Mol. Res.* **9**, 780–784. doi:10.4238/VOL9-2GMR777
- Chu, C. (1999). Y-chromosome mosaicism in girls with Turner's syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **50**, 17–18. doi:10.1046/J.1365-2265.1999.00645.X
- Delbridge, M. L., Longepied, G., Depetris, D., Mattei, M. G., Disteché, C. M., Marshall Graves, J. A., and Mitchell, M. J. (2004). *TSPY*, the candidate gonadoblastoma gene on the human Y chromosome, has a widely expressed homologue on the X – implications for Y-chromosome evolution. *Chromosome Res.* **12**, 345–356. doi:10.1023/B:CHRO.0000034134.91243.1C
- Elleuch, M., Mnif Feki, M., Kammoun, M., Charfi, N., Rekik, N., Bouraoui, A., Kammoun, T., Belguith, N., Kammoun, H., Sfar, M. T., Hachicha, M., and Abid, M. (2010). Descriptive analyses of Turner syndrome: 49 cases in Tunisia. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **71**, 111–116. doi:10.1016/J.ANDO.2009.12.013
- Frias, J. L., and Davenport, M. L. (2003). Committee on Genetics and Section on Endocrinology. Health supervision for children with Turner syndrome. *Pediatrics* **111**, 692–702. doi:10.1542/PEDS.111.3.692
- Frints, S. G., Fryns, J., Lagae, L., Syrou, M., Marynen, P., and Devriendt, K. (2001). Xp22.3; Yq11.2 chromosome translocation and its clinical manifestations. *Ann. Genet.* **44**, 71–76. doi:10.1016/S0003-3995(01)01071-1
- Gravholt, C. H., Fedder, J., Naeraa, R. W., and Muller, J. (2000). Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y-chromosome material: a population study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3199–3202. doi:10.1210/JC.85.9.3199
- Horn, L. C., Limbach, A., Hoepffner, W., Tröbs, R. B., Keller, E., Froster, U. G., Richter, C. E., and Jakubiczka, S. (2005). Histologic analysis of gonadal tissue in patients with Ullrich–Turner syndrome and derivative Y chromosomes. *Pediatr. Dev. Pathol.* **8**, 197–203. doi:10.1007/S10024-004-1013-0
- Kelly, T. E., Wachtel, S. S., Cahill, L., Barnabei, V. M., Willson-Suddath, K., and Wyandt, H. E. (1984). X;Y translocation in a female with streak gonads, H-Y– phenotype and some features of Turner's syndrome. *Cytogenet. Cell Genet.* **38**, 122–126. doi:10.1159/000132043
- Kuznetsova, T., Baranov, A., Ivaschenko, T., Savitsky, G. A., Lanceva, O. E., Wang, M. R., Giollant, M., Malet, P., Kascheeva, T., and Vakharlovsky, V. (1994). X;Y translocation in a girl with short stature and some features of Turner's syndrome: cytogenetic and molecular studies. *J. Med. Genet.* **31**, 649–651. doi:10.1136/JMG.31.8.649
- Liehr, T., Mrasek, K., Hinreiner, S., Reich, D., Ewers, E., Bartels, I., Seidel, J., Emmanuil, N., Petesen, M., Polityko, A., Dufke, A., Iourov, I., Trifonov, V., Vermeesch, J., and Weise, A. (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. doi:10.1159/000111767
- Magtibay, P. M. (2004). Treatment, behaviour and prognosis of gonadoblastoma. *CME J. Gynecol. Oncol.* **9**, 26–27.
- Mancilla, E. E., Poggi, H., Repetto, G., Rumié, H., García, H., Ugarte, F., Hidalgo, S., Jara, A., Muzzo, S., Panteón, E., Torrealba, I., Foradori, A., and Cattani, A. (2003). Y-chromosome sequences in Turner's syndrome: association with virilisation and gonadoblastoma. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **16**, 1157–1163. doi:10.1515/JPEM.2003.16.8.1157
- Mazzanti, L., Cicognani, A., Baldazzi, L., and Bergamaschi, R. (2005). Gonadoblastoma in Turner syndrome and Y-chromosome-derived material. *Am. J. Med. Genet.* **135A**, 150–154. doi:10.1002/AJMG.A.30569
- Mendes, J. R. T., Strufaldi, M. W. L., Delcelo, R., Moisés, R. C. M. S., Vieira, J. G., Kasamatsu, T. S., Galera, M. F., Andrade, J. A. D., and Verreschi, I. T. N. (1999). Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y mosaicism. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **50**, 19–26. doi:10.1046/J.1365-2265.1999.00607.X
- Modi, D., and Bhartiya, D. (2007). Y-chromosome mosaicism and occurrence of gonadoblastoma in cases of Turner syndrome and amenorrhoea. *Reprod. Biomed. Online* **15**, 547–553. doi:10.1016/S1472-6483(10)60387-2
- Nishi, M. Y., Domenice, S., Medeiros, M. A., Mendonça, B. B., and Billerbeck, A. E. (2002). Detection of Y-specific sequences in 122 patients with Turner syndrome: nested PCR is not a reliable method. *Am. J. Med. Genet.* **107**, 299–305. doi:10.1002/AJMG.10168
- Page, D. C. (1994). Y-chromosome sequences in Turner's syndrome and risk of gonadoblastoma or virilisation. *Lancet* **343**, 240–247. doi:10.1016/S0140-6736(94)91028-6
- Palka-Bayard-de-Volo, C., De Marco, S., Chiavari, V., Alfonsi, M., Calabrese, G., Chiarelli, F., and Mohn, A. (2012). Array-CGH characterization of a *de novo* t(X;Y)(p22;q11) in a female with short stature and mental retardation. *Gene* **504**, 107–110. doi:10.1016/J.GENE.2012.05.009
- Paramayuda, C., Kartapradja, H., Ambarwati, D. D., Anggaratri, H. W., Suciati, L. P., Marzuki, N. S., and Harahap, A. (2012). Chromosome abnormalities in Indonesian patients with short stature. *Mol. Cytogenet.* **5**, 35. doi:10.1186/1755-8166-5-35
- Patsalis, P. C., Sismani, C., Hadjimarco, M. I., Kitsiou-Tzeli, S., Tzeou, A., Hadjiathanasiou, C. G., Velissariou, V., Lyberatou, E., Moschonas, N.

- K., and Skordis, N. (1998). Detection and incidence of cryptic Y-chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clin. Genet.* **53**, 249–257. doi:[10.1111/J.1399-0004.1998.TB02691.X](https://doi.org/10.1111/J.1399-0004.1998.TB02691.X)
- Peña-Alonso, R., Nieto, K., Alvarez, R., Palma, I., Nájera, N., Eraña, L., Dorantes, L. M., Kofman-Alfaro, S., and Queipo, G. (2005). Distribution of Y-chromosome-bearing cells in gonadoblastoma and dysgenetic testis in 45,X/46,XY infants. *Mod. Pathol.* **18**, 439–445. doi:[10.1038/MODPATHOL.3800293](https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.3800293)
- Portnoi, M. F., Chantot-Bastarud, S., Christin-Maitre, S., Carbonne, B., Beaujard, M. P., Keren, B., Lévy, J., Dommergues, M., Cabrol, S., Hyon, C., and Siffroi, J. P. (2012). Familial Turner syndrome with an X;Y translocation mosaicism: implications for genetic counselling. *Eur. J. Med. Genet.* **55**, 635–640. doi:[10.1016/J.EJMG.2012.07.001](https://doi.org/10.1016/J.EJMG.2012.07.001)
- Sallai, A., Sólyom, J., Dobos, M., Szabó, J., Halász, Z., Ságodi, L., Niederland, T., Kozári, A., Bertalan, R., Ugocsai, P., and Fekete, G. (2010). Y-chromosome markers in Turner syndrome: screening of 130 patients. *J. Endocrinol. Invest.* **33**, 222–227.
- Semerçi, C. N., Satioglu-Tufan, N. L., Turan, S., Bereket, A., Tuysuz, B., Yilmaz, E., Kayserili, H., Karaman, B., Semiz, S., Duzcan, F., and Bagci, H. (2007). Detection of Y-chromosomal material in patients with a 45,X karyotype by PCR method. *Tohoku J. Exp. Med.* **211**, 243–249. doi:[10.1620/TJEM.211.243](https://doi.org/10.1620/TJEM.211.243)
- Sheth, F., Ewers, E., Kosyakova, N., Weise, A., Sheth, J., Desai, M., Andrieux, J., Vermeesch, J., Hamid, A. B., Ziegler, M., and Liehr, T. (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**, 22. doi:[10.1186/1755-8166-2-22](https://doi.org/10.1186/1755-8166-2-22)
- Starke, H., Nietzel, A., Weise, A., Heller, A., Mrasek, K., Belitz, B., Kelbova, C., Volleth, M., Albrecht, B., Mitulla, B., Trappe, R., Bartels, I., Adolph, S., Dufke, A., Singer, S., Stumm, M., Wegner, R. D., Seidel, J., Schimidt, A., Kuechler, A., Schreyer, I., Claussen, U., von Eggeling, F., and Liehr, T. (2003). Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum. Genet.* **114**, 51–67. doi:[10.1007/S00439-003-1016-3](https://doi.org/10.1007/S00439-003-1016-3)
- Stochholm, K., Juul, S., Juel, K., Naeraa, R. W., and Gravholt, C. H. (2006). Prevalence, incidence, diagnostic delay and mortality in Turner syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 3897–3902. doi:[10.1210/JC.2006-0558](https://doi.org/10.1210/JC.2006-0558)
- Tsuchiya, K., Reijo, R., Page, D. C., and Distèche, C. M. (1995). Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1400–1407.
- Zhong, Q., and Layman, L. C. (2012). Genetic considerations in the patient with Turner syndrome – 45,X with or without mosaicism. *Fertil. Steril.* **98**, 775–779. doi:[10.1016/J.FERTNSTERT.2012.08.021](https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2012.08.021)

5. Capítulo II

Polymorphisms in Folate Pathway Genes are not Associated with Somatic Nondisjunction in Turner Syndrome

Adriana Valéria Sales Bispo¹, Luana Oliveira dos Santos¹, Juliana Vieira de Barros¹, Andrea Rezende Duarte², Jacqueline Araújo³, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{4,5}, Neide Santos¹.

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

²Unidade de Genética Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP).

³Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital das Clínicas HC/UFPE

⁴Centro de Oncohematologia Pediátrica de Pernambuco, Hospital Oswaldo Cruz/UPE.

⁵Instituto de Ciências Biológicas, UPE – Recife, PE, Brasil

Manuscrito publicado no Periódico **American Journal of Medical Genetics Part A**

Online ISSN: 552-4833

Fator de Impacto: 2,048 Qualis B1 – CB1 Capes

Polymorphisms in Folate Pathway Genes are not Associated With Somatic Nondisjunction in Turner Syndrome

Adriana Valéria Sales Bispo,^{1*} Luana Oliveira dos Santos,¹ Juliana Vieira de Barros,¹ Andrea Rezende Duarte,² Jacqueline Araújo,³ Maria Tereza Cartaxo Muniz,^{4,5} and Neide Santos¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, S/N, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

²Unidade de Genética Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)—Recife, PE, Brazil

³Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital das Clínicas HC/UFPE—Recife, PE, Brazil

⁴Centro de Oncohematologia Pediátrica de Pernambuco, Hospital Oswaldo Cruz/UPE—Recife, PE, Brazil

⁵Instituto de Ciências Biológicas, UPE—Recife, PE, Brazil

Manuscript Received: 24 June 2014; Manuscript Accepted: 23 February 2015

Folate metabolism dysfunction can lead to DNA hypomethylation and abnormal chromosomal segregation. Previous investigations of this association have produced controversial results. Here we performed a case-control study in patients with Turner syndrome (TS) to determine the effects of genetic polymorphisms of folate pathway genes as potential risk factors for somatic chromosomal nondisjunction. TS is a useful model for this investigation because patients with TS show a high frequency of chromosome mosaicism. Here we investigated the possible association of polymorphisms of the *MTHFR* gene with TS risk, which has been previously investigated with controversial results. We also examined the effects of *MTR*, *RFC1*, and *TYMS* gene polymorphisms in TS for the first time. The risk was evaluated according to allelic and genotype (independent and combined) frequencies among 70 patients with TS and 144 age-matched healthy control subjects. Polymorphism genotyping was performed by PCR, PCR-RFLP, and PCR-ASA. The polymorphisms *MTHFR* 677C>T and 1298A>C, *MTR* 2756A>G, *RFC1* 80G>A, and *TYMS* 2R/3R—alone or in combinations—were not associated with the risk of chromosomal aneuploidy in TS. In conclusion, our present findings did not support a link between impaired folate metabolism and abnormal chromosome segregation leading to somatic nondisjunction in TS patients. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: Aneuploidy; *MTHFR*; *MTR*; *RFC1*; *TYMS*; DNA hypomethylation

INTRODUCTION

Chromosomal aneuploidy is the most common genetic abnormality in humans, occurring in at least 5% of all clinically recognized pregnancies and in ~35% of spontaneous abortions. Among conceptuses that survive to term, aneuploidy is the leading cause of cognitive impairment and birth defects. Despite this clinical

How to Cite this Article:

Bispo AVS, dos Santos LO, de Barros JV, Duarte AR, Araújo J, Muniz MTC, Santos N. 2015. Polymorphisms in folate pathway genes are not associated with somatic nondisjunction in turner syndrome. *Am J Med Genet Part A* 9999A:1–8.

importance, relatively little is known about the molecular and cellular mechanisms underlying the nondisjunctional processes that yield aneuploidy [Hassold et al., 2007; Hassold and Hunt, 2009; Templado et al., 2013]. Maternal age is the only well-established risk factor for meiotic nondisjunction. Altered recombination patterns represent another important contributor to its etiology. Furthermore, some findings suggest that genomic DNA hypomethylation caused by impaired folate metabolism may be associated with abnormal chromosomal segregation and meiotic instability [Hobbs et al., 2000; Castro et al., 2004; Chango et al., 2005; Scala et al., 2006].

Folates are essential micronutrients required for one-carbon biosynthetic metabolism, DNA synthesis and repair, and methyla-

Conflict of interest: none.

Grant sponsor: Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco; Grant number: APQ-0638-2.02/12.

*Correspondence to:

Adriana Valéria Sales Bispo, M.Sc., Departamento de Genética/CCB/ Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, S/N, Cidade Universitária, 50740-600 Recife, PE, Brazil.

E-mail: bispo_adriana@hotmail.com

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 00 Month 2015

DOI 10.1002/ajmg.a.37055

tion processes. Disruption of cellular folate homeostasis results in aberrant DNA methylation, chromosome breakage, increased micronuclei frequency, point mutations, defective chromosome recombination, and aneuploidy [Jeanpierre et al., 1993; Leyton et al., 1995; Coppède et al., 2010]. A compromise in the one-carbon reactions caused by genetic and/or dietary factors could promote abnormal chromosome segregation by an indirect effect on oocyte DNA methylation patterns and higher-order chromatin structure. In 1999, James and colleagues postulated that folate pathway impairments caused by genetic polymorphism of metabolic enzymes may result in DNA hypomethylation of centromeric regions, increasing the risks of chromosomal nondisjunction and Down syndrome (DS). This potential association has been since investigated in several studies; however, the results are often contradictory or inconsistent [Hobbs et al., 2000; Bosco et al., 2003; Kokotas et al., 2009; Brandalize et al., 2010; Costa-Lima et al., 2013].

Post-fertilization aneuploid mosaics can reportedly arise due to mitotic non-disjunction. Anaphase lagging may be another factor responsible for chromosomal aneuploidy. Several studies using in vitro fertilization have demonstrated that anaphase lag is the major mechanism through which human embryos acquire a mosaic chromosome pattern during preimplantation development to the blastocyst stage [Coonen et al., 2004; Daphnis et al., 2005]. DNA methylation status could also contribute to chromosomal instability during anaphase lag. Gopalakrishnan et al. [2009] showed that loss of the DNA methyltransferase DNMT3B or of the constitutive centromere protein CENP-C, leads to significantly decreased DNA methylation in the centromeric and pericentromeric regions, causing anaphase lagging with elevated chromosome misalignment and segregation defects during mitosis in human cells. Together, these findings reinforce the idea that epigenetic determinants play a dominant role in establishing centromere function and position. Therefore, DNA methylation status is critical for proper chromosome segregation in oocyte meiosis as well as in post-zygotic mitosis.

Several systems are required to allow folate to enter the cell, but cellular uptake of the predominant plasma folate is primarily mediated by the reduced folate carrier (RFC1). The enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) plays a pivotal role in regulating DNA methylation by catalyzing the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methylenetetrahydrofolate. This product then acts as the methyl donor for the remethylation of homocysteine (Hcy) to methionine, which is mediated by methionine synthase (MTR). This reaction is important for synthesis of S-adenosylmethionine (SAM), the major intracellular methyl donor for methylation reactions of DNA, proteins, and lipids [Bailey and Gregory, 1999; Coppède, 2009; Nazki et al., 2014]. Tetrahydrofolate is also important in maintaining a balanced supply of the precursors required for DNA synthesis. Thymidylate synthase (TYMS) converts deoxyuridine monophosphate (dUMP) and 5,10-MTHF to deoxythymine monophosphate (dTMP) and dihydrofolate (DHF) in de novo pyrimidine synthesis [Skibola et al., 2002]. Genetic polymorphisms in genes of this folate enzymatic pathway could alter normal metabolism, inducing increased Hcy levels, decreased SAM synthesis, and abnormal DNA methylation [Coppède et al., 2010; Nazki et al., 2014].

Patients with Turner syndrome (TS) show a high frequency of chromosome mosaicism [Santos et al., 2006], and thus represent an interesting model in which to investigate the effects of folate pathway polymorphisms as possible risk factors for somatic chromosomal nondisjunction. TS is characterized by the absence or abnormality of one sex chromosome in either all or some cells. The presence of a second sex chromosome is essential for fetus survival, with an estimated ~99% of embryos with the pure 45,X karyotype perishing in utero. Therefore, virtually every live-born TS individual must comprise more than one cell line, thus constituting a mosaic [Oliveira et al., 2009; Hook and Warburton, 2014]. To date, two studies have evaluated the influence of two common *MTHFR* polymorphisms (677C>T and 1298A>C) and nondisjunction in Turner syndrome, and have reported conflicting results [Santos et al., 2006; Oliveira et al., 2008].

Here we performed a case-control study in patients with Turner syndrome. We investigated the effects of genetic polymorphisms of the *MTHFR*, *MTR*, *RFC1*, and *TYMS* genes as potential risk factors for aneuploidy, and performed genetic interaction analyses.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This was an analytical cross-sectional study with a control group and 70 patients with Turner syndrome diagnosed by clinical evaluation and karyotyping. All patients were seen in the Service of Medical Genetics at the Institute of Integral Medicine Professor Fernandes Figueira and in the Service of Pediatric Endocrinology at Clinics Hospital of the Federal University of Pernambuco. The control group consisted of 144 healthy women from unselected individuals from the same Brazilian regions as those of the cases. Controls were age-matched to the cases. The age of the studied group ranged from eight months to 33 years; the mean age was 15 years.

The present study was designed according to the guidelines and regulating norms of the National Health Council for research involving human subjects and its resolution N° 466 of December 12, 1996. Informed consent was obtained from all patients or their parents. The project has been approved by the Ethical Committee (Record: CEP/IMIP N° 802/06).

Cytogenetic Analyses

Cytogenetic studies were based on peripheral lymphocytes using standard procedures for their preparation and banding of the chromosomes. Twenty to fifty GTG-banded metaphases were analyzed for each patient.

Molecular Analysis

Genomic DNA was isolated from 200 µl of peripheral blood using a commercial DNA isolation kit (DNA Illustra™ Blood Genomic-Prep Mini Spin - GE Healthcare).

Polymorphisms were genotyped by the polymerase chain reaction (PCR) with upstream and downstream primers flanking the target sequence, followed by enzymatic digestion, except for *TYMS* and *MTHFR* 1298A>C. PCR amplification was performed in a volume of 25 ml containing: 20–50 ng of genomic DNA, 1× PCR

buffer with 1.5 mM MgCl₂, 200 mM each dNTP, 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), and 5 pmol of each primer.

MTHFR 677 Genotyping

The genotyping protocol of *MTHFR* 677C>T polymorphism was adapted from the study by Frosst et al. [1995]. The following primer sequences were used: forward primer: 5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA -3', reverse primer: 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'. The amplified and digested products were visualized in a 3% agarose gel with ethidium bromide. Wild types (677CC) produced a single band at 198 base pairs (bp) after *HinfI* enzyme digestions (1.5 units). Heterozygotes (677CT) produced 198-, 175-, and 23-bp bands, while the homozygous mutants (677TT) produced 175- and 23-bp bands.

MTHFR 1298 Genotyping

The detection of *MTHFR* 1298A>C polymorphism was determined by allele-specific polymerase chain reaction (PCR) according to the protocol described by Biselli et al. [2008]. The primers set were used to separately amplify wild-type and mutated alleles as follows: forward: 5'- GGA GCT GAC CAG TGA AGA -3', and reverse: 5'- TGT GAC CAT TCC GGT TTG -3', to amplify a 77-base pair (bp) fragment corresponding to allele A (wild type); forward: 5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA -3', and reverse: 5'- AAG ACT TCA AAG ACA CTT G -3', to amplify a 120-bp fragment corresponding to allele C (mutated). A pair of primers was used to amplify the CYP-46 gene (forward: 5'- 5'-TGA AAA CGA GTT TCC CGT CC-3' and reverse: 5'-GTG TGA CCA GGT AAC AGT CA-3') as an internal control of the reaction.

TYMS 2R3R Genotyping

The presence of tandem repeat sequences in the 5-terminal of the regulatory region of the *TYMS* gene was detected using a protocol adapted from the study by Hishida et al. [2003]. The amplified PCR products were visualized on a 3% agarose gel with ethidium bromide. Homozygotes for the double repeat (2R2R) produced a single 220-bp band, while the heterozygotes (2R3R) produced 220-bp and 250-bp bands. Furthermore, homozygotes for the triple repeat (3R3R) produced a 250-bp band.

RFC1 80 Genotyping

The *RFC1* 80G>A genotyping was carried out using a PCR restriction fragment length polymorphism method adapted from a previous publication by Chango et al. [2005]. Fragments obtained after *HhaI* enzyme digestion (2.0 units) were 125, 62, and 37 pb for allele G, and 162 and 62 pb for allele A. Heterozygotes produced bands for each allele. The amplified and digested fragments were analyzed in a 3% agarose gel.

MTR 2756 Genotyping

The genotyping protocol of *MTR* 2756A>G polymorphism was performed according to the study of Matsuo et al. [2001]. PCR

products were digested with *HaeIII* (1.5 units), resulting in a 211 bp band for the A allele and 131- and 80-bp bands for the G allele, after 4% agarose gel electrophoresis. Heterozygotes produced bands for each allele.

Statistical Analysis

The statistical analyses were carried out using the Biostat program (Version 5.0). Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each polymorphism by comparing observed with expected frequencies using the χ^2 test. The differences in alleles and genotypes from each polymorphic position between cases and controls were assessed by χ^2 or Fisher's exact. For each SNP, we did unconditional logistic regression to compute Odds Ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI). To explore the possible interactions between mutant genotypes, we used the "two-by-four" approach as described by Botto and Khoury [2001]. Additionally, to test the risk associated with the presence of more than two variants alleles we used Logistic Regression to compare the number of mutations observed per individual in cases and controls. These statistical analyses were performed with the use of the R statistical package (www.r-project.org).

After Bonferroni correction, a *P* value less than <0.00125 was considered to represent a statistically significant difference.

RESULTS

In both the case and control groups, the allelic and genotypic distributions of *MTHFR* 677C>T and 1298A>C, *MTR* 2756A>G, *RFC1* 80G>A, and *TYMS* variants were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. Table I presents the allelic frequencies of the studied polymorphisms. Allelic frequencies of *MTHFR* 1298 C, *MTR* 2756 G, *RFC1* 80G, and *TYMS* 2 R did not significantly differ between TS cases and controls. On the other hand, the allelic and genotype frequencies of *MTHFR* 677 T were borderline or significantly different between cases and controls (Tables I and II), which is attributed to a higher frequency of non-mutated alleles in the patient group.

With regard to genotype frequency, after Bonferroni correction, we found no significant association between folate polymorphism and occurrence of Turner syndrome (Table II). Analysis of the *RFC1* gene showed a higher frequency of homozygous *RFC1* 80AA among cases compared to controls. This higher frequency was associated with a 2.45-fold increase in the risk of nondisjunction (95% confidence interval (CI), 1.01–5.96), although this association did not reach statistical significance.

To determine the potential effects of combined genotypes, we further analyzed all possible combinations between mutant genotypes at one or two loci of the *MTHFR*, *MTR*, *RFC1*, and *TYMS* genes (versus the wild-type genotypes). This approach enabled evaluation of the associated risk in the presence of two distinct mutant genotypes. Although some *P*-values were significant (Tables II and III), no significant differences were associated with the risk of aneuploidy in TS, as indicated by the low odds ratio values. We also performed regression analysis to determine the risk associated with the simultaneous presence of more than two variants (Table IV). The number of uncommon alleles for the five

TABLE I. Allele Frequencies of *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G*, *RFC1 A80G*, and *TYMS 2R* Polymorphisms in Cases With Turner Syndrome [TS] and Controls

Polymorphism allele	TS cases N (%)	Control N (%)	P-value	Allele	Frequency	
					TS cases	Control
<i>MTHFR 677</i>						
C	107 (76.43)	192 (66.67)	0.0509*	677T	0.2357	0.3333
T	33 (23.57)	96 (33.33)				
<i>MTHFR 1298</i>						
A	111 (79.29)	223 (77.43)	0.6636*	1298C	0.2071	0.2257
C	29 (20.71)	65 (22.57)				
<i>MTR 2756</i>						
A	114 (81.43)	238 (82.64)	0.8630*	2756G	0.1857	0.1736
G	26 (18.57)	50 (17.36)				
<i>RFC1 80</i>						
G	57 (40.71)	146 (50.69)	0.0662*	80A	0.5929	0.4931
A	83 (59.29)	142 (49.31)				
<i>TYMS</i>						
3R	80 (57.14)	160 (55.56)	0.8363*	2R	0.4286	0.4444
2R	60 (42.86)	128 (44.44)				

P-values were obtained by χ^2 test after Yates correction.

TABLE II. Genotype Frequencies of *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G*, *RFC1 A80G*, and *TYMS 2R* Polymorphisms in Cases With Turner Syndrome [TS] and Controls

Genotype	TS cases N (%)	Controls N (%)	P-value	OR (95%CI)	P-value (OR)
<i>MTHFR 677</i>					
CC	42 (60.00)	59 (40.97)	0.0274	Reference	
CT	23 (32.86)	74 (51.39)		0.44 [0.24–0.81]	0.0115
TT	5 (7.14)	11 (7.64)		0.64 [0.21–1.97]	0.6108
CT+TT	28 (40.00)	85 (59.03)		0.46 [0.26–0.83]	0.0135
<i>MTHFR 1298</i>					
AA	44 (62.86)	85 (59.03)	0.8509	Reference	
AC	23 (32.86)	53 (36.81)		0.84 [0.46–1.54]	0.6798
CC	3 (4.29)	6 (4.17)		0.97 [0.23–4.05]	0.7518
AC+CC	26 (37.14)	59 (40.97)		0.85 [0.47–1.53]	0.6979
<i>MTR 2756</i>					
AA	47 (67.14)	100 (69.44)	0.9414	Reference	
AG	20 (28.57)	38 (26.39)		1.12 [0.59–2.13]	0.8573
GG	3 (4.29)	6 (4.17)		1.06 [0.25–4.44]	0.7772
AG+GG	23 (32.86)	44 (30.56)		1.11 [0.60–2.05]	0.8544
<i>RFC1 80</i>					
GG	10 (14.29)	33 (22.92)	0.1222	Reference	
GA	37 (52.86)	80 (55.56)		1.53 [0.68–3.42]	0.4040
AA	23 (32.86)	31 (21.53)		2.45 [1.01–5.96]	0.0749
GA + AA	60 (85.71)	111 (77.08)		1.78 [0.82–3.87]	0.1948
<i>TYMS</i>					
3R/3R	25 (35.71)	47 (32.64)	0.8933	Reference	
3R/2R	30 (42.86)	66 (45.83)		0.85 [0.45–1.64]	0.7577
2R/2R	15 (21.43)	31 (21.53)		0.91 [0.41–1.99]	0.9703
3R/2R+2R/2R	45 (64.29)	97 (67.36)		0.87 [0.48–1.59]	0.7699

P-values were obtained by χ^2 test and Odds ratio (OR), confidence interval (CI).

TABLE III. Combined Genotypes in Cases With Turner Syndrome (TS) and Controls

Genotype		TS cases N (%)	Controls N (%)	OR (95%CI)	P-value (OR)
<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C				
CC	AA	21 (30.00)	20 (13.89)	Reference	
CC	AC+CC	21 (30.00)	39 (27.08)	0.52 (0.23–1.15)	0.1560
CT + TT	AA	23 (32.86)	65 (45.14)	0.34 (0.15–0.73)	0.0094
CT + TT	AC+CC	6 (8.57)	20 (13.89)	0.28 (0.09–0.86)	0.0420
<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTR</i> A2756G				
CC	AA	26 (37.14)	38 (26.39)	Reference	
CC	AG+GG	14 (20.00)	21 (14.58)	0.97 (0.42–2.26)	0.8779
CT + TT	AA	19 (27.14)	62 (43.06)	0.45 (0.22–0.92)	0.0415
CT + TT	AG+GG	9 (12.86)	23 (15.97)	0.57 (0.23–1.43)	0.3297
<i>MTHFR</i> C677T	<i>RFC1</i> G80A				
CC	GG	5 (7.14)	11 (7.64)	Reference	
CC	GA+AA	20 (28.57)	48 (33.33)	0.92 (0.28–2.98)	0.8735
CT + TT	GG	3 (4.29)	22 (15.28)	0.3 (0.06–1.49)	0.2656
CT + TT	GA+AA	25 (35.71)	63 (43.75)	0.87 (0.27–2.77)	0.9448
<i>MTHFR</i> C677T	<i>TYMS</i> Repetitions				
CC	3R/3R	13 (18.57)	17 (11.81)	Reference	
CC	3R/2R+2R/2R	29 (41.43)	42 (29.17)	0.9 (0.38–2.14)	0.9913
CT + TT	3R/3R	12 (17.14)	30 (20.83)	0.52 (0.19–1.40)	0.2955
CT + TT	3R/2R+2R/2R	16 (22.86)	55 (38.19)	0.38 (0.15–0.95)	0.0614
<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTR</i> A2756G				
AA	AA	31 (44.29)	64 (44.44)	Reference	
AA	AG+GG	13 (18.57)	21 (14.58)	1.28 (0.57–2.88)	0.7034
AC + CC	AA	16 (22.86)	38 (26.39)	0.87 (0.42–1.80)	0.8449
AC + CC	AG+GG	10 (14.29)	23 (15.97)	0.90 (0.38–2.11)	0.9757
<i>MTHFR</i> A1298C	<i>RFC1</i> G80A				
AA	GG	6 (8.57)	17 (11.81)	Reference	
AA	GA+AA	38 (54.29)	68 (47.22)	1.58 (0.57–4.35)	0.5140
AC + CC	GG	4 (5.71)	16 (11.11)	0.71 (0.17–2.98)	0.9129
AC + CC	GA+AA	22 (31.43)	42 (29.17)	1.48 (0.51–4.30)	0.6387
<i>MTHFR</i> A1298C	<i>TYMS</i> Repetitions				
AA	3R/3R	14 (20.00)	30 (20.83)	Reference	
AA	3R/2R+2R/2R	30 (42.86)	55 (38.19)	1.17 (0.54–2.54)	0.8423
AC + CC	3R/3R	11 (15.71)	17 (11.81)	1.39 (0.51–3.73)	0.6929
AC + CC	3R/2R+2R/2R	15 (21.43)	42 (29.17)	0.76 (0.32–1.82)	0.7008
<i>MTR</i> A2756G	<i>RFC1</i> G80A				
AA	GG	7 (10.00)	21 (14.58)	Reference	
AA	GA+AA	32 (45.71)	79 (54.86)	1.21 (0.47–3.14)	0.8669
AG + GG	GG	3 (4.29)	12 (8.33)	0.75 (0.16–3.45)	0.9930
AG + GG	GA+AA	20 (28.57)	32 (22.22)	1.87 (0.67–5.21)	0.3337
<i>MTR</i> A2756G	<i>TYMS</i> Repetitions				
AA	3R/3R	14 (20.00)	33 (22.92)	Reference	
AA	3R/2R+2R/2R	33 (47.14)	67 (46.53)	1.16 (0.55–2.46)	0.8415
AG + GG	3R/3R	11 (15.71)	14 (9.72)	1.85 (0.68–5.07)	0.3441
AG + GG	3R/2R+2R/2R	12 (17.14)	30 (20.83)	0.94 (0.38–2.36)	0.9144
<i>RFC1</i> G80A	<i>TYMS</i> Repetitions				
GG	3R/3R	5 (7.14)	13 (9.03)	Reference	
GG	3R/2R+2R/2R	5 (7.14)	20 (13.89)	0.65 (0.16–2.70)	0.8183
GA+AA	3R/3R	20 (28.57)	25 (17.36)	2.08 (0.63–6.82)	0.3490
GA+AA	3R/2R+2R/2R	40 (57.14)	77 (53.47)	1.35 (0.45–4.06)	0.7883

P-values were obtained by Odds ratio (OR), confidence interval (CI).

TABLE IV. Comparison Between the Numbers of Mutated Alleles Studied Per Individuals in Cases With Turner Syndrome (TS) and Controls

Number of mutated alleles per individual	TS cases N (%)	Control N (%)	OR (95%CI)	P-value (OR)
1	9 (12.86)	27 (18.75)	Reference	
2	27 (38.57)	53 (36.81)	1.53 [−0.44–1.35]	0.3477
3	23 (32.86)	42 (29.17)	1.07 [−0.62–0.76]	0.8368
4	8 (11.43)	17 (11.81)	0.86 [−1.17–0.81]	0.7623
5	3 (4.29)	5 (3.47)	1.27 [−1.52–1.89]	0.7742

tested loci ranged from one to five per case or control individual. These results confirmed that no risk was associated with a higher number of mutated alleles.

DISCUSSION

In the present study, we investigated the potential roles of the *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C, *RFC-1* 80G>A, *MTR* 2756A>G, and *TYMS* 3R>2R genetic polymorphisms in modulating the risk of somatic chromosome nondisjunction in Turner syndrome. In contrast with previously reported results, here we did not observe a significantly increased frequency of mutant alleles in the TS group compared to the controls. In fact, the statistically significant differences that we found indicated a higher frequency of non-mutated alleles among the TS patients. These results reinforce that polymorphisms of genes involved in folate metabolism are not associated with genetic risk of TS. We hypothesized that these interesting results could be explained by a possible association between polymorphisms and fetal viability. Genetic variants of enzymes in the folate pathway may place TS embryos at a survival disadvantage, reflected by a low frequency of these variants in the live-born TS patients. Hobbs et al. [2002] previously reported preferential transmission of the *MTHFR* 677T allele and its implications for a survival advantage in infants with Down syndrome.

To date, only two Brazilian research groups have studied the *MTHFR* gene in TS patients with the same proposed objectives as the present study. Santos et al. [2006] evaluated the frequencies of the *MTHFR* 677T and 1298 C polymorphic mutations in 49 TS patients and 200 controls, and reported that the 677TT genotype was found significantly more frequently among Turner patients. Subsequently, Oliveira et al. [2008] studied the same *MTHFR* polymorphisms in 140 Turner patients, but detected no association between the *MTHFR* 677T allele and chromosomal aneuploidy. However, they reported that the genotype 1298CC occurred significantly more frequently in TS cases than controls. Overall, both studies suggested that different *MTHFR* gene mutations could be related to chromosome imbalances. In contrast, our present results did not support such an association.

Recently, Oliveira et al. [2012] determined the frequencies of the *MTHFR* gene polymorphisms 677 C>T and 1298 A>C, and investigated their correlations with serum homocysteine levels in 78 Brazilian patients with TS. They hypothesized that a high plasma homocysteine level could be related to the genesis of cardiovascular disease, which is the leading cause of death among Turner patients [Kim et al., 2011]. In contrast to the results of the present study, they identified a differential distribution of the mutate allele 1298 C in

the patient group. However, this difference was not related to homocysteine levels, and they concluded that further studies are needed to investigate the possible genetic interaction with homocysteine levels in TS. Unfortunately, we were unable to measure this marker in our present patients.

Over the last decade, despite some conflicting results, most study findings have supported a role for polymorphisms of the *MTR*, *TYMS* and *RFC1* genes, alone or in combinations, as risk factors for Down syndrome [Bosco et al., 2003; Scala et al., 2006; Coppèdè et al., 2009]. To the best of our knowledge, the potential influences of these genetic variants have never previously been investigated in patients with Turner syndrome. Our present findings showed no independent contribution of these genes acting as risk factors for somatic nondisjunction.

The *RFC1* gene encodes an enzyme that participates in folate absorption, and the polymorphic allele 80 G is associated with reduced protein affinity for substrates and reduced transport efficiency [Zhao et al., 2009]. The present results concerning the *RFC1* 80G>A polymorphism are in accordance with those of previous studies of Down syndrome conducted among Brazilian populations [Biselli et al., 2008; Fintelman-Rodrigues et al., 2009; Brandalize et al., 2010; Zampiere et al., 2012]. In contrast, a recent meta-analysis of nine independent case-control studies concluded that the maternal *RFC1* 80G>A polymorphism might be associated with increased risk of giving birth to a child with DS, especially among carriers of the GG genotype [Coppèdè et al., 2013].

TYMS activity is essential to maintain an adequate supply of nucleotides, and *TYMS* competes with *MTHFR* for the same substrate. The *TYMS* gene reportedly has a polymorphic 28-bp tandem repeat in its promoter region, which includes a double repeat allele (2R) that is associated with lower gene expression and enzyme activity when compared with the 3 R allele [Hishida et al., 2003]. Coppèdè [2009] reported that when cells have a high precursor demand due to high division rates, interactions between *MTHFR* and *TYMS* enzyme activities could potentially impair DNA methylation, having consequences on chromosome segregation. Furthermore, due to the linkage between cell division and DNA replication, it is plausible that any DNA damage or inadequate nucleotide supply caused by folate deficiency could also result in chromosome delay and aneuploidy [Wang et al., 2004]. An Italian study investigated both the *TYMS* 28-bp repeat and 1494del6 polymorphisms as possible risk factors for having a child with DS, and neither was found to be associated with aneuploidy risk [Coppèdè et al., 2009]. Here we only evaluated the *TYMS* 28-bp repeat, and our results were in accordance with the previous finding.

In 2003, Bosco et al. studied mothers of children with DS from Sicily, and provided the first evidence of a possible contribution of the *MTR* 2756A>G polymorphism to aneuploidy etiology. However, subsequent studies performed in different countries—including France [Chango et al., 2005], Italy [Scala et al., 2006], and Brazil [da Silva et al., 2005; Biselli et al., 2008; Fintelman-Rodrigues et al., 2009; Brandalize et al., 2010]—have failed to confirm this association of the *MTR* 2756A>G polymorphism with chromosome nondisjunction. The present findings also showed no such association. In 2005, da Silva et al. evaluated the genes *MTR*, *MTRR*, *MTHFR*, and *CBS* together, and suggested that mothers of children with DS tend to have a higher number of uncommon alleles compared to controls. However, in our present study, we performed logistic regression to determine whether multiple uncommon alleles interact to influence folate metabolism and, contrary to da Silva's [2005] findings, we found no significant associations.

Several studies in mothers of children with DS have aimed to evaluate the possible contribution of impaired folate metabolism to chromosomal aneuploidy risk, and most of them concluded that the combined presence of two or more mutant alleles in the genome might affect chromosome segregation [Hobbs et al., 2000; Rai et al., 2006; Biselli et al., 2008; Brandalize et al., 2009]. The present work is the first genetic association study in TS to evaluate whether interactions between folate gene polymorphisms appear to modify the risk of somatic chromosome nondisjunction, and our results do not reveal any significant associations. Brandalize et al. [2010] conducted a case-control study in Southern Brazil among 239 mothers of children with DS, with the aim of investigating the role of maternal polymorphism, and the risks of DS associated with the genotype combinations of *MTR* 2756A>G, *MTRR* 66A>G, *CBS* 844ins68, and *RFC* 80A>G. Their results showed that individual polymorphisms were not associated with DS, while the combined risk genotypes among genes involved in folate pathways resulted in maternal risk for DS offspring.

The literature includes many studies of different genes related to folate metabolism that have reported contrasting results, including some performed in patients with Turner syndrome. The discrepancies may be explained by interactions between genetic and environmental factors (e.g., the use of folic acid, which may be crucial for the maintenance of the polymorphism effects), differences in study design and sample sizes, and variable allele frequency due to ethnic and geographic population origin [James, 2004; Coppèdè et al., 2009].

Our study had some limitations. The major limitation—which is shared by most hospital-based studies to date—is the small sample size of the case group that reduces the statistical power of testing for genetic associations and for gene–gene interactions. Given the discordant conclusions reported by studies of genetic risk factors in different geographic regions, it is possible that our present findings may not be generalizable to other populations. This study could not analyze specific metabolic biomarkers, such as conceptional folic acid status, plasma homocysteine, or B₁₂ levels. Finally, different chromosome abnormalities are present in TS karyotypes; therefore, it may be possible that this syndrome arises due to multiple mechanisms.

In conclusion, our present results do not support a link between impaired folate metabolism and abnormal chromosome segregation leading to somatic nondisjunction in TS patients. However, these findings warrant additional discussion and confirmation in

subsequent well-designed studies. The mechanisms responsible for aneuploidy seem to be influenced by multiple factors—including genetic, environmental, epigenetic, and stochastic factors—which would make it difficult to measure the results of an individual effect.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the patients, parents, and clinicians for participating in our study. This research was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE–APQ-0638-2.02/12).

REFERENCES

- Bailey LB, Gregory JF. 1999. Folate metabolism and requirements. *J Nutr* 129:779–782.
- Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. 2008. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: Maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 7:33–42.
- Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Roman A, Romano C, Gueant JL. 2003. Methionine synthase (*MTR*) 2756 (A>G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/ methionine synthase reductase (*MTRR*) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet Part A* 121A:219–224.
- Botto LD, Khoury MJ. 2001. Commentary: facing the challenge of gene–environment interaction: The two-by-four table and beyond. *Am J Epidemiol* 153:1016–1020.
- Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Shuler-Faccini L. 2009. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet Part A* 149A:2080–2087.
- Brandalize AP, Bandinelli E, Dos Santos PA, Schuler-Faccini L. 2010. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism as risk factors for Down syndrome offspring in Southern Brazil. *Dis Markers* 95:101.
- Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, de Almeida IT. 2004. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C–T and 1298A–C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 41:454–458.
- Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H, Lambert D, Herbeth B, James SJ, Réthoré MO, Nicolas JP. 2005. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr* 94:166–169.
- Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, van Wissen LC, Bras M, Janssen M, Evers JL, Geraedts JP. 2004. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 19:316–324.
- Coppèdè F. 2009. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. *Mutat Res* 682:54–70.
- Coppèdè F, Migheli F, Bargagna S, Siciliano G, Antonucci I, Stuppia L, Palka G, Migliore L. 2009. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci Lett* 449:15–19.
- Coppèdè F, Grossi E, Migheli F, Migliore L. 2010. Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: Identification of key factors using artificial neural networks. *BMC Med Genomics* 24:42.

- Coppedè F, Lorenzoni V, Migliore L. 2013. The reduced folate carrier (RFC-1) 80A>G polymorphism and maternal risk of having a child with Down syndrome: A meta-analysis. *Nutrients* 5:2551–2563.
- Costa-Lima MA, Amorim MR, Orioli IM. 2013. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C>T polymorphism and Down syndrome. *Mol Biol Rep* 40:2115–2125.
- Daphnis DD, Delhanty JD, Jerkovic S, Geyner J, Craft I, Harper JC. 2005. Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Hum Reprod* 20:129–137.
- da Silva LR, Vergani N, Galdieri C Lde, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brusoni D, D'Almeida V, Alvarez AB. 2005. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet Part A* 135A:263–267.
- Fintelman-Rodrigues N, Corrêa JC, Santos JM, Pimentel MM, Santos-Rebouças CB. 2009. Investigation of CBS, MTR, RFC-1 and TC polymorphisms as maternal risk factors for Down syndrome. *Dis Markers* 26:155–161.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111–113.
- Gopalakrishnan S, Sullivan BA, Trazzi S, Della Valle G, Robertson KD. 2009. DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet* 18:3178–3193.
- Hassold T, Hunt P. 2009. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: What we know and what we wish we knew. *Curr Opin Pediatr* 21:703–708.
- Hassold T, Hall H, Hunt P. 2007. The origin of human aneuploidy: Where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 2:R203–R208.
- Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Morishima Y, Emi N, Tajima K. 2003. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica* 88:159–166.
- Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. 2000. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 67:623–630.
- Hobbs CA, Cleves MA, Lauer RM, Burns TL, James SJ. 2002. Preferential transmission of the MTHFR 677T allele to infants with Down syndrome: Implications for a survival advantage. *Am J Med Genet* 113:9–14.
- Hook EB, Warburton D. 2014. Turner syndrome revisited: Review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. *Hum Genet* 133:417–424.
- James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. 1999. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 70:495–501.
- James SJ. 2004. Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: Beyond genetics. *Am J Med Genet Part A* 127A:1–4.
- Jeanpierre M, Turleau C, Aurias A, Prieur M, Ledeist F, Fischer A, Viegas-Pequignot E. 1993. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 2:731–735.
- Kim HK, Gottliebson W, Hor K, Backeljauw P, Gutmark-Little I, Salisbury SR, Racadio JM, Helton-Skally K, Fleck R. 2011. Cardiovascular anomalies in Turner syndrome: Spectrum, prevalence, and cardiac MRI findings in a pediatric and young adult population. *AJR Am J Roentgenol* 196:454–460.
- Kokotas H, Grigoriadou M, Mikkelsen M, Giannoulia-Karantana A, Petersen MB. 2009. Investigating the impact of the Down syndrome related common MTHFR 677C>T polymorphism in the Danish population. *Dis Markers* 27:279–285.
- Leyton C, Mergudich D, de la Torre C, Sans J. 1995. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. *Cell Prolif* 28:481–496.
- Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Kondoh E, Maeda S, Asakura S, Kaba S, Nakamura S, Seto M, Morishima Y, Tajima K. 2001. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood* 97:3205–3209.
- Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. 2014. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 533:11–20.
- Oliveira RM, Verreschi IT, Lipay MV, Eça LP, Guedes AD, Bianco B. 2009. Y chromosome in Turner syndrome: Review of the literature. *Sao Paulo Med J* 127:373–378.
- Oliveira KC, Bianco B, Verreschi IT, Guedes AD, Galera MF, Barbosa CP, Lipay MV. 2008. Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52:1374–1381.
- Oliveira KC, Verreschi IT, Sugawara EK, Silva VC, Galera BB, Galera MF, Bianco B, Lipay MV. 2012. C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR gene and their relation to homocysteine levels in Turner syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers* 16:396–400.
- Rai AK, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK, Raman R. 2006. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *J Hum Genet* 51:278–283.
- Santos K, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Bonadia LC, Pinto W, Jr, Bertuzzo CS. 2006. Frequency of 677(C>T) and 1298(A>C) polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Turner syndrome individuals. *Genet Mol Biol* 29:41–44.
- Scala I, Granese B, Sellitto M, Salome S, Sammartino A, Pepe A, Mastroiacovo P, Sebastio G, Andria G. 2006. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. *Genet Med* 8:409–416.
- Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. 2002. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 99:3786–3791.
- Templado C, Uroz L, Estop A. 2013. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 19:634–643.
- Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M. 2004. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res* 551:167–180.
- Zampiere BL, Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Vannucchi H, Carvalho VM, Cordeiro JA, Pavarino EC. 2012. Maternal risk for Down syndrome is modulated by genes involved in folate metabolism. *Dis Markers* 32:73–81.
- Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. 2009. Membrane transporters and folate homeostasis: Intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 11:e4.

6. Discussão geral

No presente estudo foi observado uma frequência relativamente baixa (2,7%) de mosaicismo críptico para o cromossomo Y na ST. Este trabalho descreve o primeiro estudo em pacientes com ST do estado de Pernambuco e, mesmo apresentando a menor incidência, os resultados são consistentes com outros estudos brasileiros, os quais reportaram a presença de material críptico do cromossomo Y em 5,5%, 3%, 4,8% e 3,8% das pacientes ST (Nishi *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2011).

Estudos anteriores relataram uma incidência amplamente variável de mosaicismo críptico para o cromossomo Y na ST, dependendo principalmente da metodologia aplicada (FISH, PCR, RT-PCR, *Southern blot*) (Modi e Bhartiya, 2007; Freriks *et al.*, 2013; Knauer-Fischer *et al.*, 2015). Detectamos sequências ocultas do cromossomo Y em dois casos, um 45,X e outro com cariótipo prévio 46,X,i(Xq). Resultados semelhantes foram relatados anteriormente em pacientes com ST (Alvarez-Nara *et al.*, 2003; Mazzanti *et al.*, 2005).

Sallai *et al.* (2010) investigaram quatro regiões do cromossomo Y em 130 pacientes húngaras por RT-PCR e encontraram mosaicismo críptico em seis delas, com a seguinte constituição cromossômica: 45,X (3 casos), 45,X/46,X,+mar (2 casos) e 45,X/46,X,del(Xq) (1 caso). A meta-análise de 541 pacientes com cariótipos 45,X aparentemente homogêneos, revelou que 5% dos casos apresentavam mosaicismo oculto para o cromossomo Y quando o ensaio por PCR foi realizado (Colls *et al.*, 2006). Em conjunto com os nossos achados, esses resultados suportam uma busca sistemática de sequências do cromossomo Y em pacientes com ST, independente de suas constituições cariotípicas.

Em 2013, Freriks *et al.* combinaram as análises de PCR e FISH em DNA de linfócitos do sangue periférico e em células da mucosa bucal para determinar a importância da inclusão de técnicas moleculares adicionais na busca do cromossomo Y oculto em 63 pacientes com ST. Esses autores identificaram 30,2% de mosaicismo para o cromossomo investigado, e enfatizaram a relevância do uso de técnicas mais sensíveis para este fim. Em outro estudo mais recente, Zelaya *et al.* (2014) utilizaram diferentes abordagens moleculares para investigar 217 pacientes com ST e encontraram material derivado do cromossomo Y em 9,2% dos casos. Entre os casos Y-positivos, 17 foram submetidos a gonadectomia e apresentaram uma incidência de 35,3% do GB. Adicionalmente, foi encontrado disgerminoma puro e disgerminoma mixto com carcinoma embrionário em duas pacientes. Esses dados reforçam a importância da investigação de material do Y em cariótipos aparentemente não mosaicos bem como a indicação da gonadectomia preventiva para eliminar o alto risco de malignidades.

Apesar de muitos trabalhos na literatura, ainda é controverso exatamente quais pacientes com ST devem ser avaliadas ao nível do DNA. Um guia clínico da ST recomenda o uso de técnicas moleculares apenas em pacientes com evidências de virilização, clitoromegalia ou quando um cromossomo marcador não pode ser caracterizado pela citogenética clássica (Bondy, 2007). Outro guia posterior (Wolff *et al.*, 2010) indica que esta recomendação deve ser estendida a todas as pacientes que apresentem o cariótipo 45,X no sangue periférico. Contrário a estas propostas, identificamos material críptico do cromossomo Y em um caso com cariótipo prévio 46,X,i(Xq) sem mosaicismo e em pacientes ST que não tinham nem sinal de virilização nem cromossomos marcadores. De fato, não houve associação entre positividade do cromossomo Y com os sinais clínicos das pacientes. Adicionalmente, em nossa série três pacientes apresentaram uma

linhagem com um marcador ou um cromossomo em anel e nenhuma delas revelou a presença de material do Y em seu genoma.

As análises obtidas a partir da citogenética molecular permitiram a descrição de uma alteração incomum na ST com o cariótipo 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.23). Tais translocações desbalanceadas X;Y são rearranjos cromossômicos estruturais raros em mulheres, com cerca de apenas 70 casos relatados previamente. Homens portadores de t(X;Y) podem ter distúrbios ligados ao X como síndromes de genes contíguos, dependendo da extensão da deleção Xp, enquanto a maioria das fêmeas é fenotipicamente normal, exceto por baixa estatura (Bukvic *et al.*, 2010; de Volo *et al.*, 2012). No entanto, nossa paciente apresentou um fenótipo clássico da ST, como observado somente em alguns casos relatados (Kelly *et al.*, 1984; Kuznetzova *et al.*, 1994).

Potnoi *et al.* (2012) descreveram um caso incomum de ST familiar com mosaicismo para uma nova translocação X;Y envolvendo Xp e Yp. Pacientes ST com material eucromático do cromossomo Y têm um risco aumentado de desenvolvimento de gonadoblastoma e / ou disgerminoma. De facto, o gene *TSPY*, mapeado na região pericentromérica do cromossomo Yp, foi estabelecido como o gene putativo envolvido no desenvolvimento de gonadoblastoma, agindo como um oncogene nas gônadas disgenéticas (Delbridge *et al.*, 2004). No caso da nossa paciente, esta região Yp mostrou estar presente no cromossomo derivativo t(X;Y), o que nos permite incluir este caso em risco de desenvolvimento de doenças gonadais malignas.

Neste trabalho também investigamos o papel dos polimorfismos dos genes *MTHFR 677C>T*, *MTHFR 1298A>C*, *RFC-1 80G>A*, *MTR 2756A>G* e *TYMS 3R>2R* modulando o risco de não disjunção cromossômica somática na síndrome

de Turner. Até o momento, apenas dois estudos brasileiros avaliaram o gene *MTHFR* em pacientes com ST com os mesmos objetivos propostos. Contrário aos resultados anteriormente reportados, não foi observado no presente estudo um aumento significativo na frequência de alelos polimórficos no grupo com ST em relação aos controles.

Santos *et al.* (2006) avaliaram as frequências dos polimorfismos *MTHFR* (677T e 1298C) em 49 pacientes com ST e 200 controles e encontraram uma maior frequência estatisticamente significativa do genótipo 677TT entre os indivíduos ST. Em um trabalho posterior, Oliveira *et al.* (2008) estudaram os mesmos polimorfismos do gene *MTHFR* em 140 pacientes com ST e não mostraram associação entre o alelo *MTHFR* 677T e aneuploidia cromossômica. No entanto, o genótipo 1298CC foi significativamente mais frequente nos casos com ST quando comparados com os controles. De maneira geral, ambos estudos sugeriram que diferentes polimorfismos no gene *MTHFR* podem estar relacionadas com desequilíbrios cromossômicos. Entretanto, os nossos resultados não suportam esta associação.

Apesar de muitos resultados conflitantes, a maioria dos estudos têm apoiado um papel para polimorfismos dos genes *MTR*, *TYMS* e *RFC1*, isolados ou combinados, como fatores de risco para a síndrome de Down (Bosco *et al.*, 2003; Scala *et al.*, 2006; Coppedè *et al.*, 2009; Rai *et al.*, 2014; Jaiswal *et al.*, 2015). Por outro lado, a influência destas variantes genéticas nunca foi investigada na síndrome de Turner e nenhuma contribuição independente desses genes atuando como fatores de risco para não disjunção somática foi observado no presente trabalho.

Em relação à ausência de associação do polimorfismo *RFC1* 80G>A, o

presente trabalho está de acordo com estudos anteriores realizados na população brasileira para SD (Biselli *et al.*, 2008; Fintelman-Rodrigues *et al.*, 2009; Brandalize *et al.*, 2010; Zampiere *et al.*, 2012). No entanto, estudando uma população chinesa, Wang *et al.* (2013) concluíram que polimorfismos nos genes *RFC-1* e *CBS* estão relacionados com a SD. Adicionalmente, uma meta-análise incluindo nove estudos de caso-controle independentes sugeriu que o polimorfismo maternal *RFC1 80G>A* pode estar associado a um risco aumentado de ter um filho com SD, especialmente entre as portadoras do genótipo GG (Coppedè *et al.*, 2013a).

Corroborando com a pesquisa atual, estudos realizados em diferentes países, incluindo a França (Chango *et al.*, 2005), Itália (Scala *et al.*, 2006; Coppedè *et al.*, 2013b) e Brasil (da Silva *et al.*, 2005; Biselli *et al.*, 2008; Fintelman-Rodrigues *et al.*, 2009; Brandalize *et al.*, 2010; Victorino *et al.*, 2014) não conseguiram demonstrar associação do polimorfismo *MTR 2756A>G* com a não disjunção cromossômica. Coppedè *et al.* (2013b) investigaram a função de *MTR 2756A>G* como fator de risco em 286 mães de portadores da SD em adição a dados prévios de oito estudos anteriores, totalizando 1171 mães, e postularam que o peso do referido polimorfismo seria menor que o *MTHFR 677C>T* e o *MTRR 66A>G*. Assim, seria bastante improvável que o polimorfismo no gene *MTR* atuaria como fator de risco independente para não disjunção cromossômica.

A atividade da *TYMS* é essencial para um suprimento adequado de nucleotídeos, assim, quando as células têm uma alta demanda de precursores devido a altas taxas de divisões é possível que as interações entre as atividades enzimáticas de *MTHFR* e *TYMS* possam prejudicar a metilação do DNA, com consequências sobre a segregação cromossômica (Coppedè, 2009). Além disso,

uma vez que a divisão celular e a replicação do DNA estão ligadas entre si, é plausível que qualquer dano no DNA ou fornecimento inadequado de nucleotídeos causados por deficiência de folato podem resultar em atraso cromossômico e aneuploidia (Wang *et al.*, 2004). Um estudo italiano investigou os polimorfismos 1494del6 e repetição 28 bp de *TYMS* como possíveis fatores de risco para ter um filho com SD e nenhum deles resultou estar associado com este risco (Coppedè *et al.*, 2009). Apesar do presente estudo ter avaliado apenas as repetições *TYMS* 2R/3R, nossos resultados estão de acordo com os dados anteriormente relatados.

A opinião geral da maioria dos estudos é que a presença combinada de dois ou mais alelos mutantes do metabolismo do folato no genoma pode afetar a segregação cromossômica (Hobbs *et al.*, 2000; Rai *et al.*, 2006; Biseli *et al.*, 2008; Brandalize *et al.*, 2009; Coppdè *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2014). O presente trabalho é o primeiro estudo de associação genética na ST que avalia se possíveis interações entre polimorfismos dos genes do folato podem modificar o risco de não disjunção cromossômica somática, contudo não foi encontrada nenhuma associação significativa. Brandalize *et al.* (2010) conduziram um estudo caso-controle em 239 mães de SD para investigar o papel dos polimorfismos maternos, bem como as combinações genóticas de risco entre *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *CBS* 844ins68 e *RFC* A80G no Sul do Brasil. Os resultados mostraram que os polimorfismos individuais não foram associados com a SD, no entanto, os efeitos combinados dos genótipos de risco foram considerados fatores de risco nessa população.

A literatura relata vários trabalhos sobre diferentes genes relacionados ao metabolismo do folato com resultados contrastantes, incluindo aqueles realizados

em pacientes com síndrome de Turner. Estas discrepâncias podem ser explicadas por interações entre fatores genéticos e ambientais, tais como o uso de ácido fólico, que pode ser crucial para a manutenção dos efeitos dos polimorfismos, diferenças no desenho do estudo, tamanho das amostras e frequências variáveis dos alelos devido a origem étnica e geográfica.

Em conclusão, nosso estudo não suporta uma ligação entre alterações no metabolismo do folato e segregação cromossômica anormal provocando não disjunção somática em pacientes com ST. Os mecanismos responsáveis pelas aneuploidias cromossômicas parecem ser influenciados por fatores multivariados, incluindo genéticos, ambientais, epigenéticos e estocásticos. Dessa forma, pode ser difícil de mensurar o resultado de um efeito individual.

Adicionalmente, com base em nossos resultados e nos dados da literatura, recomendamos que a busca meticulosa de mosaicismo oculto para o cromossomo Y deve ser realizada por meio de técnicas moleculares em todos os casos ST, não sendo portanto limitado a pacientes virilizadas e / ou portadoras de um cariótipo específico. Devido ao alto risco de desenvolvimento de tumores gonadais, a gonadectomia profilática deve ser oferecida a todas as pacientes com ST e material de cromossomo Y identificado, a fim de evitar o desenvolvimento de malignidades com absoluta certeza.

7. Conclusões

1. O exame citogenético permitiu a confirmação dignóstica da ST, bem como a identificação das alterações cromossômicas específicas da síndrome, as quais se assemelham com a frequência descrita na literatura;
2. A presença de mosaicismo oculto para o cromossomo Y (2,7%) ocorreu em uma frequência baixa neste estudo;
3. A presença de sequências do Y em cariótipos não sugestivos bem como a falta de associação clínica indicam que a busca de mosaicismo oculto para o cromossomo Y deve ser realizada por meio de técnicas moleculares em todos os casos ST e não limitado a pacientes virilizadas e / ou portadoras de um cariótipo específico;
4. O uso da técnica de FISH permitiu uma descrição cariotípica detalhada bem como a identificação de uma alteração cromossômica rara;
5. Através da combinação da análise citogenética e molecular foi possível oferecer um diagnóstico complementar para as pacientes com ST com a identificação de potenciais fatores de risco a malignidade, e por conseguinte direcionar a conduta terapêutica como a indicação de gonadectomia profilática;
6. Não foi possível estabelecer uma associação entre os polimorfismos *MTHFR 677C>T*, *MTHFR 1298A>C*, *RFC-1 80G>A*, *MTR 2756A>G* e *TYMS 3R>2R* independentes ou combinados e o risco na não disjunção somática na ST.

8. Referências Bibliográficas

- Alvarez-Nava F, Soto, M and Sanchez MA (2003) Molecular analysis in Turner syndrome. *J Pediatr* 89:336–339.
- Amorim MR and Lima MA (2013) MTRR 66A>G polymorphism as maternal risk factor for Down syndrome: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomark* 17:69–73.
- Araujo C, Galera MF, Galera BB, Silvestre FG and Medeiros SF (2008) Molecular identification of chromosome Y sequences in Brazilian patients with Turner syndrome. *Gynecological endocrinology* 24:713-717.
- Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM and Costa FF (1998) Prevalence of the mutation C677—T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 78:332-335.
- Assaraf YG (2007) Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis* 26:153–181.
- Badalotti M, Arent A, Polanczick A, Petracco R and Petracco A (2006) Falência ovariana precoce associada a deleção no braço longo do cromossomo: relato de dois casos e revisão da literatura. *Rev Bras Ginecol Obstet* 28:551-556.
- Barra V, Lentini L, Costa G and Di Leonardo A (2012) Bypass of cell cycle arrest induced by transiente DNMT1 post-transcriptional silencing triggers aneuploidy in human cells. *Cell Div* Feb 3;7(1):2.
- Barros BA, Moraes SG, Coeli FB, Assumpção JG, de Mello MP, Maciel-Guerra AT, Carvalho AB, Viguetti-Campos N, Vieira TA, Amstalden EM, Andrade JG, Esquiaveto-Aun AM, Marques-de-Faria AP, D'Souza-Li LF, Lemos-Marini SH and Guerra G Jr (2011) OCT4 immunohistochemistry may be necessary to identify the real risk of gonadal tumors in patients with Turner syndrome and Y chromosome sequences. *Hum Reprod* 26:3450-3455.
- Bianco B, Lipay MVN, Melaragno MI, Guedes AD and Verreschi IT (2006) Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. *J Pediatr Endocrinol Metab* 19:1113–1117.
- Bianco B, Lipay M, Guedes A, Oliveira K and Verreschi IT (2009) SRY gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoral gonadal lesions in Turner syndrome. *Int J Gynecol Pathol* 28:197–202.

- Binder G, Koch A, Wajs E and Ranke MB (1995) Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J Clin Endocrinol Metab* 80:3532-3536.
- Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN and Pavarino-Bertelli EC (2008) Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 7:33-42.
- Bispo AVS, dos Santos LO, Burégio-Frota P, Galdino MD, Duarte AR, Leal GF, Araújo J, Gomes B, Soares-Ventura E, Muniz MT and Santos N (2013) Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype. *Genet Mol Res* 12:4243-50.
- Bondy CA (2007) A Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner syndrome study group. *J Clin Endocrinol Metab* Jan;92(1):10-25.
- Bondy CA (2008) Turner syndrome. *Horm Res* 1:52-56.
- Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C and Guéant JL (2003) Methionine synthase (MTR) 2756 (A>G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/ methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 121:219-224.
- Botto LD and Yang Q (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 15:862-872.
- Brandalize AP, Bandinelli E, Dos Santos PA, Roisenberg I and Schuler-Faccini L (2009) Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A* 149:2080-2087.
- Brandalize AP, Bandinelli E, Dos Santos PA and Schuler-Faccini L (2010) Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism as risk factors for Down syndrome offspring in Southern Brazil, *Dis Markers* 29:95-101.
- Brant WO, Rajimwale A, Lovell MA, Travers SH, Furness PD 3rd, Sorensen M, Oottamasathien S and Koyle MA (2006) Gonadoblastoma and Turner syndrome. *J Urol*, 175:1858-1860.

- Bronshtein M, Zimmer EZ and Blazer S (2003) A characteristic cluster of fetal sonographic markers that are predictive of fetal Turner syndrome in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 188:1016-1020.
- Bukvic N, Delli Carri NV, Di Cosola ML, Pustorino G, Cesarano C, Chetta M, Santacroce R, Sarno M, Sessa F, Longo V, Novelli A, Gentile M and Margaglione M (2010) Familial X;Y translocation with distinct phenotypic consequences: characterization using FISH and array CGH. *Am J Med Genet Part A* 152A:1730-1734.
- Burégio-Frota P, Valença L, Leal GF, Duarte AR, Bispo-Brito AV, Soares-Ventura EM, Marques-Salles TJ, Nogueira MT, Muniz MT, Silva ML, Hunstig F, Liehr T and Santos N (2010) Identification of a de novo inv dup(X)(pter-> q22) by multicolor banding in a girl with Turner syndrome. *Genet Mol Res* 9 :780-784.
- Candelaria M, Taja-Chayeb L, Arce-Salinas C, Vidal-Millan S, Serrano-Olvera A and Dueñas-Gonzalez A (2005) Genetic determinants of cancer drug efficacy and toxicity: practical considerations and perspectives. *Anti-Cancer Drugs* 16:923–933.
- Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ and de Almeida IT (2004) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and 1298A>C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 41:454–458.
- Chakhtoura Z and Touraine P (2013) Fertility on women with Turner syndrome. *Presse Med* 42:1508-1152.
- Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H, Lambert D, Herbeth B, James SJ, Réthoré MO and Nicolas JP (2005) No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr* 94:166–169.
- Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J and Shane B (1997) Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization and expression. *J Biol Chem* 272:3628-3634.
- Chu CE, Donaldson MD, Kelnar CJ, Smail PJ, Greene SA, Paterson WF and Connor JM (1994) Possible role of imprinting in the Turnerphenotype. *J Med Genet* 31:840–842.
- Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW and Looijenga LH (2006) Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr Rev* 27:468e-484.
- Coppedè, F (2009) The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. *Mutat Res* 682:54-70.

- Coppedè F, Bosco P, Lorenzoni V, Denaro M, Anello G, Antonucci I, Barone C, Stuppia L, Romano C and Migliore L. (2013b) The MTRR 66A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome in Caucasian women: a case–control study and a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 41:5571-5583.
- Coppedè F, Colognato R, Bonelli A, Astrea G, Bargagna S, Siciliano G and Migliore L (2007) Polymorphisms in folate and homocysteine metabolizing genes and chromosome damage in mothers of Down syndrome children. *Am J Med Genet A* 143A:2006-2015.
- Coppedè F, Grossi E, Migheli F and Migliore L (2010) Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: identification of key factors using artificial neural networks. *BMC Med Genomics* 449:15-19.
- Coppedè F, Marini G, Bargagna S, Stuppia L, Minichilli F, Fontana I, Colognato R, Astrea G, Palka G and Migliore L (2006) Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. *Am J Med Genet A* 140:1083-1091.
- Coppedè F, Migheli F, Bargagna S, Siciliano G, Antonucci I, Stuppia L, Palka G and Migliore L (2009) Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci Lett* 449:15-19.
- Coppedè F, Lorenzoni V and Migliore L (2013a) The reduced folate carrier (RFC-1) 80A>G polymorphism and maternal risk of having a child with Down syndrome: a meta-analysis. *Nutrients* 5:2551-2563.
- Costa-Lima MA, Amorim MR and Orioli IM (2013) Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C > T polymorphism and Down syndrome. *Mol Biol Rep* 40:2115-2125.
- Cutter WJ1, Daly EM, Robertson DM, Chitnis XA, van Amelsvoort TA, Simmons A, Ng VW, Williams BS, Shaw P, Conway GS, Skuse DH, Collier DA, Craig M and Murphy DG (2006) Influence of X chromosome and hormones on human brain development: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study of Turner syndrome. *Biol Psychiatry*. 59:273-283.
- da Silva LR, Vergani N, Galdieri Lde C, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brunoni D, D'Almeida V and Alvarez Perez AB (2005) Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil, *Am J Med Genet A* 135:263–267.

- de Volo C, De Marco S, Chiavaroli V, Alfonsi M, Calabrese G, Chiarelli F and Mohn A (2012) Array-CGH characterization of a de novo t(X;Y)(p22;q11) in a female with short stature and mental retardation. *Gene* 504:107-110.
- Davenport ML (2010) Approach to the patient with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1487-1495.
- Davison RM, Fox M and Conway GS (2000) Mapping of the POF1 locus and identification of putative genes for premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 6:314–318.
- Delbridge ML, Longepied G, Depetris D, Mattei MG, Disteche CM, Marshall Graves JA and Mitchell M (2004) TSPY, the candidate gonadoblastoma gene on the human Y chromosome, has a widely expressed homologue on the X - implications for Ychromosome evolution. *Chromosome Res* 12:345-356.
- Denes AM, Landin-Wilhelmsen K, Wettergren Y, Bryman I and Hanson C (2015) 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* 19:82-87.
- Devernay M, Bolca D, Kerdjana L, Aboura A, Gérard B, Tabet AC, Benzacken B, Ecosse E, Coste J and Carel JC. (2012) Parental Origin of the X-Chromosome Does Not Influence Growth Hormone Treatment Effect in Turner Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 97:1241-1248.
- Ergür AT, Ocal G, Berberoglu M, Tekin M, Kiliç BG, Aycan Z, Kutlu A, Adiyaman P, Siklar Z, Akar N, Sahin A and Akçayöz D (2008) Paternal X could relate to arithmetic function; study of cognitive function and parental origin of X chromosome in Turner syndrome. *Pediatr Int* 50:172-174.
- Fintelman-Rodrigues N, Corrêa JC, Santos JM, Pimentel MM and Santos-Rebouças CB (2009) Investigation of CBS, MTR, RFC-1 and TC polymorphisms as maternal risk factors for Down syndrome. *Dis Markers* 26:155–161.
- Freriks K, Timmers HJ, Netea-Maier RT, Beerendonk CC, Otten BJ, van Alfen-van der Velden JA, Traas MA, Mieloo H, van de Zande GW, Hoefsloot LH, Hermus AR and Smeets DF (2013) Buccal cell fish and blood pcr-y detect high rates of x chromosomal mosaicism and y chromosome derivatives in patients with turner syndrome. *Eur J Med Genet* 56:497-501.
- Gardner RJM and Sutherland GR (2004) Chromossome Abnormalities and Genetic Counseling Ed. Oxford University Press.

- Gisselsson D, Shao C and Tuck-Muller CM (2005) Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. *Chromosoma* 114:118-126.
- Goldacre MJ and Seminog OO (2014) Turner syndrome and autoimmune diseases: record-linkage study. *Arch Dis Child* 99:71-73.
- Gonzalez L and Witchel SF (2012) The patient with Turner syndrome: puberty and medical management concerns. *Fertil Steril* 98:780-786.
- Gopalakrishnan S, Sullivan BA, Trazzi S, Della Valle G and Robertson KD (2009) DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet* 18:3178-3193.
- Gos M and Szpecht-Potocka A (2002) Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet* 43:511-524.
- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M and Rozen R (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9:652-656.
- Gravaholt CH (2004) Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol* 151:657-867.
- Gravholt CH (2005) Clinical practice in Turner syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 1:41-52.
- Grillo LB, Acácio GL, Barini R, Pinto W Jr and Bertuzzo CS (2002) Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome. *Cad Saude Publica* 18:1795–1797.
- Hamelin CE¹, Anglin G, Quigley CA and Deal CL (2006) Genomic imprinting in Turner syndrome: effects on response to growth hormone and on risk of sensorineural hearing loss. *J Clin Endocrinol Metab* 8:3002-3010.
- Hassold T, Hall H and Hunt P (2007) The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*, 2:203-208.
- Hassold T and Hunt P (2009) Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Curr Opin Pediatr* 21:703-708.
- Herrera LA, Prada D, Andonegui MA and Dueñas-González A (2008) The epigenetic origin of aneuploidy. *Curr Genomics* 91:43-50.
- Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, Tajiri H, Morishima Y, Emi

- N and Tajima K (2003) Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica*, 88:159–166.
- Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R and James SJ (2000) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 67:623–630.
- Hook EB and Warburton D (2014) Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. *Hum Genet* 33:417-424.
- Izci Ay O1, Ay ME, Erdal ME, Cayan F, Tekin S, Soylemez F, Sungur MA and Derici Yıldırım D (2015) Folate metabolism gene polymorphisms and risk for down syndrome offspring in Turkish women. *Genet Test Mol Biomarkers*. 19:191-197.
- Izmirli M1 (2013) A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. *Mol Biol Rep* 40:625-637.
- Jaiswal SK, Sukla KK, Kumari N, Lakhotia AR, Kumar A and Rai AK (2015) Maternal risk for down syndrome and polymorphisms in the promoter region of the DNMT3B gene: A case-control study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 103:299-305.
- James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL and Gaylor DW (1999) Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 70:495–501.
- Kanaan N, Martí S, Moliner V and Kohen A (2009) QM/MM Study of Thymidylate Synthase: Enzymatic Motions and the Temperature Dependence of the Rate Limiting Step. *J Phys Chem* 113:2176-182.
- Kanagal DV, Prasad K, Rajesh A, Kumar RG, Cherian S, Shetty H and Shetty PK (2013) Ovarian Gonadoblastoma and Dysgerminoma in a Young Girl with 46, XX Karyotype: A Case Report. *J Clin Diagn Res* 7:2021-2022.
- Kawakami K, Omura K, Kanehira E and Watanabe Y (1999) Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 19: 3249–3252.
- Knauer-Fischer S, Besikoglu B, Inta I, Kneppo C, Vogt PH and Bettendorf M (2015) Analyses of Gonadoblastoma Y (GBY)-locus and of Y centromere in Turner syndrome patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 123:61-55.

- Kelly TE, Wachtel SS, Cahill L, Barnabei VM, Willson-Suddath K and Wyandt HE (1984) X;Y translocation in a female with streak gonads, H-Y- phenotype, and some features of Turner's syndrome. *Cytogenet Cell Genet*, 38:122-126.
- Kido T, Schubert S, Hatakeyama S, Ohyama C, Schmidtke J and Lau YF (2014) Expression of a Y-located human proto oncogene TSPY in a transgenic mouse model of prostate cancer. *Cell Biosci*, 17;4(1):9.
- Kokotas H, Grigoriadou M, Mikkelsen M, Giannoulia-Karantana A and Petersen MB (2009) Investigating the impact of the Down syndrome related common MTHFR 677C>T polymorphism in the Danish population. *Dis Markers* 27:279-285.
- Koppen IJ, Hermans FJ and Kaspers GJ (2010) Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 148:3-14.
- Kuznetsova T, Baranov A, Ivaschenko T, Savitsky GA, Lanceva OE, Wang MR, Giollant M, Malet P, Kascheeva T and Vakharlovsky V (1994) X;Y translocation in a girl with short stature and some features of Turner's syndrome: cytogenetic and molecular studies. *J Med Genet* 31:649-651.
- Lau YF, Lau HW and Komuves LG (2003) Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res* 101:250-260.
- Lau YF, Li Y and Kido T (2009) Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87:114-122.
- Layman LC, Cohen DP, Xie J and Smith GD (2002) Clinical phenotype and infertility treatment in a male with hypogonadotropic hypogonadism due to mutations Ala129Asp/Arg262Gln of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Fertil Steril* 78:1317-1320.
- Lee HJ, Jung HW, Lee GM, Kim HY, Kim JH, Lee SH, Kim JH, Lee YA, Shin CH and Yang SW (2014) No influence of parental origin of intact X chromosome and/or Y chromosome sequences on three-year height response to growth hormone therapy in Turner syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 19:127-134.
- Lepage JF, Hong DS, Hallmayer J and Reiss AL (2012) Genomic Imprinting Effects on Cognitive and Social Abilities in Prepubertal Girls with Turner Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97:460-464.

- Leyton C, Mergudich D, de la Torre C and Sans J (1995) Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. *Cell Prolif* 28:481–96.
- Li W, Wang X, Fan W, Zhao P, Chan YC, Chen S, Zhang S, Guo X, Zhang Y, Li Y, Cai J, Qin D, Li X, Yang J, Peng T, Zychlinski D, Hoffmann D, Zhang R, Deng K, Ng KM, Menten B, Zhong M, Wu J, Li Z, Chen Y, Schambach A, Tse HF, Pei D and Esteban MA (2012) Modeling abnormal early development with induced pluripotent stem cells from aneuploid syndromes. *Hum Mol Genet.* 21:32-45.
- Liehr T, Mrasek K, Hinreiner S, Reich D, Ewers E, Bartels I, Seidel J, Emmanuil N, Petesen M, Polityko A, Dufke A, Iourov I, Trifonov V, Vermeesch J and Weise A (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.
- Liew SC and Gupta ED (2015) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet* 58:1-10.
- Lima CSP, Ortega MM, Ozelo MC, Araujo RC, Souza A De, Lorand-metze I, Annichino-Bizzacchi JM and Costa FF (2008) Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), methionine synthase reductase (MTRR), and thymidylate synthase (TYMS) in multiple myeloma risk. *Leuk Res* 32:401–405.
- Lipay MVN, Bianco B and Verreschi ITN (2005) Disgenesias Gonadais e Tumores: Aspectos Genéticos e Clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 49:60-70.
- Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G and Oosterhuis JW (2003) POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 63:2244-2250.
- Mandaviya PR, Stolk L and Heil SG (2014) Homocysteine and DNA methylation: a review of animal and human literature. *Mol Genet Metab* 113:243-252.
- Marsh S (2005) Thymidylate synthase pharmacogenetics. *Invest New Drugs*, 23:533–537.

- Martínez-Pasarell O, Templado C, Vicens-Calvet E, Egozcue J and Nogués C (1999) Paternal sex chromosome aneuploidy as a possible origin of Turner syndrome in monozygotic twins: case report. *Hum Reprod* 14:2735-2738.
- Mazzanti L, Cicognani A, Baldazzi L and Bergamaschi R (2005) Gonadoblastoma in Turner syndrome and Y-chromosome derived material. *Am J Med Genet* 135:150–154.
- Mazzaschi RL, Taylor J, Robertson SP, Love DR and George AM (2014) A turner syndrome patient carrying a mosaic distal x chromosome marker. *Case Rep Genet* 2014:597314.
- Modi D and Bhartiya D (2007) Y chromosome mosaicism and occurrence of gonadoblastoma in cases of Turner syndrome and amenorrhoea. *Reprod Biomed Online* 15:547-553.
- Modi DN, Sane S and Bhartiya D (2003) Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Mol Hum Reprod* 9:219–225.
- Morgan T (2007) Turner syndrome: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 76: 405-140.
- Mortensen KH, Andersen NH and Gravholt CH (2012) Cardiovascular phenotype in Turner syndrome--integrating cardiology, genetics, and endocrinology. *Endocr Rev* 33:677-714.
- Mosiółek M, Pasierbek P, Malarz J, Moś M and Joachimiak AJ (2005) Rumex acetosa Y chromosomes: constitutive or facultative heterochromatin? *Folia Histochem Cytobiol* 43:161-167.
- Nazki FH, Sameer AS and Ganaie BA (2014) Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 533:11-20.
- Niclot S1, Pruvot Q, Besson C, Savoy D, Macintyre E, Salles G, Brousse N, Varet B, Landais P, Taupin P, Junien C and Baudry-Bluteau D (2006) Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas. *Blood* 108: 278-285.
- Nishi MY, Domenice S, Medeiros MA, Mendonca BB and Billerbeck AE (2002) Detection of Y-specific sequences in 122 patients with Turner syndrome: nested PCR is not a reliable method. *Am J Med Genet* 15:113–117.
- Ogata T, Muroya K, Sasaki G, Nishimura G, Kitoh H and Hattori T (2002) *SHOX* nullizygosity and haploinsufficiency in a Japanese Family: implication for the

- development of Turner skeletal features. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1390-1394.
- O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM and Mills JL (2002) MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome *Am J Med Genet* 107:151-155.
- Oliveira KC, Bianco B, Verreschi IT, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, Barbosa CP and Lipay MV (2008) Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52:1374-1381.
- Oliveira RM, Verreschi IT, Lipay MV, Eça LP, Guedes AD and Bianco B (2009) Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J* 127:373–378.
- Page DC (1987) Hypothesis: a Y chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* 101(Suppl):151-155.
- Peña-Alonso R1, Nieto K, Alvarez R, Palma I, Nájera N, Eraña L, Dorantes LM, Kofman-Alfaro S and Queipo G (2005) Distribution of Y-chromosome-bearing cells in gonadoblastoma and dysgenetic testis in 45,X/46,XY infants. *Mod Pathol* 18:439-445.
- Peng F, Labelle LA, Rainey BJ and Tsongalis GJ (2001) Single nucleotide polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med*. 8:509-511.
- Portnoi MF1, Chantot-Bastaraud S, Christin-Maitre S, Carbonne B, Beaujard MP, Keren B, Lévy J, Dommergues M, Cabrol S, Hyon C and Siffroi JP (2012) Familial Turner syndrome with an X;Y translocation mosaicism: Implications for genetic counseling. *Eur J Med Genet* 55:635-640.
- Rai AK, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK and Raman R (2006) MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *J Hum Genet* 51:278–283.
- Rai V, Yadav U, Kumar P and Yadav SK (2014) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism is not risk factor for Down syndrome in North India. *Indian J Hum Genet* 20:142-147.
- Rajpathak SN, Vellarikkal SK, Patowary A, Scaria V, Sivasubbu S and Deobagkar DD (2014) Human 45,X fibroblast transcriptome reveals distinct differentially expressed genes including long noncoding RNAs potentially associated with the pathophysiology of Turner syndrome. *PLoS One* 9:e100076.

- Ranke MB and Saenger P (2001) Turner's syndrome. *Lancet* 358:309-314.
- Rodenhiser D and Mann M (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 174:341-348.
- Ross J, Roeltgen D and Zinn A (2008) Cognition and the sex chromosomes: studies in Turner syndrome *Horm Res* 65:47-56.
- Rovet J (2004) Turner syndrome: a review of genetic and hormonal influences on neuropsychological functioning. *Child Neuropsychology* 10:262-279.
- Sagi L, Zuckerman-Levin N, Gawlik A, Ghizzoni L, Buyukgebiz A, Rakover Y, Bistrizter T, Admoni O, Vottero A, Baruch O, Fares F, Malecka-Tendera E and Hochberg Z (2007) Clinical significance of the parental origin of the X chromosome in turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 3:846-852.
- Sallai A, Sólyom J, Dobos M, Szabó J, Halász Z, Ságodi L, Niederland T, Kozári A, Bertalan R, Ugocsai P and Fekete G (2010) Y-chromosome markers in Turner syndrome: Screening of 130 patients. *J Endocrinol Invest* 33:222-227.
- Santos K, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Bonadia LC, Pinto Júnior W and Bertuzzo CS (2006) Frequency of 677(C>T) and 1298(A>C) polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Turner syndrome individuals. *Genet Mol Biol* 29:41-44.
- Scala I, Granese B, Sellitto M, Salomè S, Sammartino A, Pepe A, Mastroiacovo P, Sebastio G and Andria G (2006) Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. *Genet Med* 8:409-416.
- Sharp L and Little J (2004) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 159:423-443.
- Shi M, Caprau D, Romitti P, Christensen K and Murray JC (2003) Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes MTHFR, MTHFD, MTRR, RFC1, and GCP2. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 67:545-549.
- Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA and Morgan GJ (2002) Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 99:3786-3791.
- Stimpson KM and Sullivan BA (2010) Epigenomics of centromere assembly and function. *Curr Opin Cell Biol* 22:772-780.

- Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW and Gravholt CH (2006) Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3897-3902.
- Stover PJ (2011) Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4:293-305.
- Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G and Palka G (2002) C677T mutation in the 5.10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet* 10:388–390.
- Su MT, Lee I and Kuo PL (2006) Presence of TSPY transcript and absence of transcripts of other Y chromosomal genes in a case of microscopic gonadoblastoma. *Gynecologic Oncology*. 103:357-360.
- Suzigan LZC, Silva RBP and Guerra AT (2005) Aspectos Psicossociais da Síndrome de Turner. *Arq Brás Endocrinol Metab* 49:157-164.
- Sybert VP and McCauley E (2004) Turner's syndrome. *N Engl J Med* 351:1227-1238.
- Takamura N, Kondoh T, Ohgi S, Arisawa K, Mine M, Yamashita S and Aoyagi K (2004) Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan. *Eur J Nutr* 43:285–287.
- Templado C, Uroz L and Estop A (2013) New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 19:634-643.
- Uematsu A1, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Kaji M, Yamanaka C, Momoi T and Nakahata T (2002) Parental origin of normal x chromosomes in Turner syndrome patients with various karyotypes: implications for the mechanism leading to generation of a 45,X karyotype. *Am J Med Genet* 111:134-139.
- Ulrich CM, Curtin K, Potter JD, Bigler J, Caan B and Slattery ML (2005) Polymorphisms in the Reduced Folate Carrier, Thymidylate Synthase, or Methionine Synthase and Risk of Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2509-2516.
- Ulrich CM, Robien K and Mcleod HL (2003) Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond. *Nat Rev Cancer* 3:912-920.
- Urbach A and Benvenitsy B (2009) Studying Early Lethality of 45,XO (Turner's Syndrome) Embryos Using Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 4:e4175.
- Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A and Sowers LC (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32:4100-4108.

- Victorino DB, Godoy MF, Goloni-Bertollo EM and Pavarino EC (2014) Meta-analysis of Methylenetetrahydrofolate reductase maternal gene in Down syndrome: increased susceptibility in women carriers of the MTHFR 677T allele. *Mol Biol Rep* 41:5491-504.
- Vogel F and Motulsky A (1996) *Human genetics: problems and approaches*. 3rd ed. London: Springer-Verlag.
- Wang X, Thomas P, Xue J and Fenech M (2004) Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res* 551:167–180.
- Wang W, Hou Z, Wang C, Wei C, Li Y and Jiang L (2013) Association between 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and congenital heart disease: A meta-analysis. *Meta Gene* 1:109-125.
- Wang SS, Qiao FY, Feng L and Lv JJ (2008) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. *J Zhejiang Univ Sci B* 9:93-99.
- Watkins D1, Ru M, Hwang HY, Kim CD, Murray A, Philip NS, Kim W, Legakis H, Wai T, Hilton JF, Ge B, Doré C, Hosack A, Wilson A, Gravel RA, Shane B, Hudson TJ, Rosenblatt DS (2002) Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. *Am J Hum Genet* 71:143-153.
- Wolff DJ, Van Dyke DL (2010) Powell, C.M Laboratory guideline for Turner syndrome, *Genet. Med.* 12:52e55.
- Zampieri BL, Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Vannucchi H, Carvalho VM, Cordeiro JA and Pavarino EC (2012) Maternal risk for Down syndrome is modulated by genes involved in folate metabolism. *Dis Markers* 32:73-81.
- Zelaya G, López Martí JM, Marino R, Garcia de Dávila MT and Gallego MS (2014) Gonadoblastoma in patients with Ullrich-Turner syndrome. *Pediatr Dev Pathol* 18:117-121.
- Zhao R, Matherly LH and Goldman ID (2009) Membrane transporters and folate homeostasis: Intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 28:11:e4.
- Zhong Q and Layman LC (2012) Genetic considerations in the patient with Turner syndrome—45,X with or without mosaicism. *Fertil and Steril* 98:775-779.

Zhuang W1, Wu XT, Zhou Y, Liu GJ, Wu TX, Yao X, Du L and Wei ML (2009)
Polymorphisms of Thymidylate Synthase in the 5'- and 3'-Untranslated Regions and
Gastric Cancer. *Dig Dis Sci*, 54:1379–1385.

9. Produção científica associada a tese

Correlation of chromosome constitution variations on the expression of Turner's phenotype.

Adriana Valéria Sales Bispo¹, Luana Oliveira dos Santos¹, Pollyanna Burégio-Frota², Myrella Barros Galdino¹, Andrea Rezende Duarte³, Gabriela Ferraz Leal³, Jacqueline Araújo⁴, Bárbara Gomes⁴, Eliane Maria Soares-Ventura⁵, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{5,6}, Neide Santos¹.

¹Departamento de Genética/CCB/UFPE

²Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

³Unidade de Genética Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

⁴Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital das Clínicas HC/UFPE

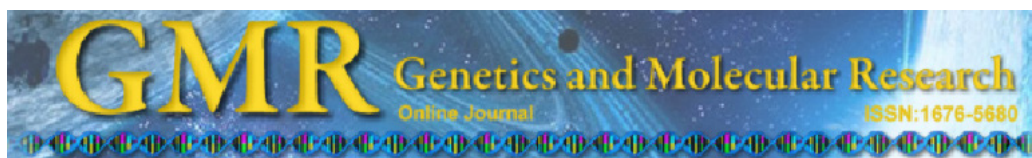
⁵Centro de Oncohematologia Pediátrica de Pernambuco, Hospital Oswaldo Cruz/UPE

⁶Instituto de Ciências Biológicas, UPE

Manuscrito publicado no Periódico **Genetics and Molecular Research**

Online ISSN: 1676-5680

Fator de Impacto: 0.85 Qualis B2 – CB1 Capes



Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype

A.V.S. Bispo¹, L.O. dos Santos¹, P. Burégio-Frota², M.B. Galdino¹,
A.R. Duarte³, G.F. Leal³, J. Araújo⁴, B. Gomes⁴, E.M. Soares-Ventura⁵,
M.T.C. Muniz^{5,6} and N. Santos¹

¹Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Laboratório de Pesquisa Translacional Prof. C. Anthony Hart,
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil

³Unidade de Genética Pediátrica,
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil

⁴Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital das Clínicas,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁵Centro de Oncohematologia Pediátrica de Pernambuco,
Hospital Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁶Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco,
Recife, PE, Brasil

Corresponding author: N. Santos
E-mail: santos_neide@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. (2013) **Ahead of Print**

Received August 6, 2012

Accepted November 24, 2012

Published March 13, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.March.13.13>

ABSTRACT. Turner syndrome (TS) is a chronic disease related to haploinsufficiency of genes that are normally expressed in both X chromosomes in patients with female phenotype that is associated with a wide range of somatic malformations. We made detailed cytogenetic and clinical analysis of 65 patients with TS from the region of Recife, Brazil, to determine the effects of different chromosome constitutions on expression of the TS phenotype. Overall, patients with X-monosomy exhibited a tendency to have more severe phenotypes with higher

A.V.S. Bispo et al.

morbidity, showing its importance in TS prognosis. Additionally, we found rare genetic and phenotypic abnormalities associated with this syndrome. To the best of our knowledge, this is the first case of 45,X,t(11;12)(q22;q22) described as a TS karyotype. Turner patients usually have normal intelligence; however, moderate to severe mental retardation were found in 5 TS cases, which is considerate a very uncommon feature in this syndrome.

Key words: Mosaicism; Chromosomal abnormality; X-monosomy; Balanced translocation

INTRODUCTION

Turner syndrome (TS) is one of the most common chromosomal disorders, characterized by the absence or abnormality of one sex chromosome either in all or some cells. This genetic disorder is caused by haploinsufficiency of genes normally expressed in both X chromosomes, which are involved in the physical development and maintenance of ovarian function in patients with female phenotype, affecting approximately 1/2500 live-born girls (Stochholm et al., 2006).

According to cytogenetic reports, chromosome monosomy (45,X) is found in 50-60% of cases. Other karyotypes with structural changes in the X chromosome are present in approximately 30% of cases, including isochromosome of the long arm, deletion of the short arm or ring chromosomes, either in homogeneous karyotypes or in mosaics with a 45,X cell line (Oliveira et al., 2009; Djordjević et al., 2010; Elleuch et al., 2010). Patients with TS may also have a second cell line with a normal or abnormal Y chromosome in 5 to 6% of cases (Gravholt, 2005). On the other hand, few cases exhibit complex karyotypes, which may include the formation of derivatives of the X chromosome (Binkert et al., 2010; Burégio-Frota et al., 2010).

The clinical profile of TS is evidenced by short stature and gonadal dysgenesis, leading to delayed pubertal development, primary amenorrhea and sterility. Furthermore, a variety of dysmorphic features may be present, such as lymphedema of hands and feet, short and/or webbed neck, cubitus valgus, low posterior hairline, low-set ears, widely spaced nipples, ogival palate, ptosis, epicanthal folds, and hypoplasia of the fourth or fifth metacarpal and metatarsal bones (Sybert and McCauley, 2004; Hjerrild et al., 2008). In addition, this syndrome may involve various malformations, especially in the heart (most commonly coarctation of the aorta) and the kidneys, besides hearing impairment, hypertension, thyroid disease, and obesity (Bondy, 2009; Davenport, 2010).

In view of the importance of establishing genotypic and phenotypic correlations for appropriate management of TS patients, this study reports a detailed cytogenetic and clinical analysis of patients with Turner syndrome to provide new information on the developmental effects of different chromosome constitutions and their role in the expression of TS phenotype. Additionally, this study reports on the rare genetic and phenotypic abnormalities associated with this syndrome.

MATERIAL AND METHODS

From May 2006 to December 2011, cytogenetic analyses were performed in 65 pa-

Phenotype correlation in Turner's syndrome

tients with clinical indication of TS, who were seen in the Service of Medical Genetics at the Institute of Integral Medicine Professor Fernandes Figueira and in the Service of Pediatric Endocrinology at Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco. The cytogenetic study was based on cell culture from phytohemagglutinin-stimulated peripheral lymphocytes using standard procedures. Detailed clinical data for patients were obtained by either physical examination or review of medical records. Once the syndrome was confirmed, most patients underwent ultrasound and cardiologic evaluation. Statistical analyses were performed by the Fisher test, comparing the patients with 45,X and those with other non-normal karyotypes. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

This study was designed according to the guidelines and regulatory norms of Brazil's National Health Council for research involving human subjects and Resolution No. 196 of October 10, 1996. Informed consent was obtained from all patients or their parents. The project was approved by the Ethics Committee (Record: CEP/IMIP No. 802/06).

RESULTS

The karyotype distribution of 65 TS patients is shown in Table 1. The most common was the monosomic karyotype (61.5%). Structural changes in the X chromosome together with mosaicism were observed in 24.5% and mosaic karyotypes without structural anomalies, which also included the Y chromosome, were found in 7.5% of the patients. Isochromosome Xq was the most frequent structural change observed in 23.1% in either mosaics (45,X cell line) or in homogeneous karyotypes.

Table 1. Distribution of karyotypes associated with Turner syndrome.

Karyotype	No. of patients	Frequency (%)
45,X	40	61.5
Mosaics without structural changes		
45,X/46,XX	1	1.5
45,X/47,XXX	1	1.5
Mosaics with structural changes		
46,X,i(Xq)/45,X	11	16.9
46,X,r(X)/45,X	2	3.1
46,X,del(Xp)/45,X	1	1.5
46,X,inv dup(Xq)/45,X	1	1.5
45,X/46,X,+mar	1	1.5
Mosaics with Y chromosome		
45,X/46,XY	3	4.6
Structural change without mosaicism		
46,X,i(Xq)	4	6.2
Total	65	100

The age of TS patients at the moment of diagnosis ranged from newborn to 35 years old, but in most cases TS was diagnosed at the age of puberty or beyond (9-18 years old). In general, TS was confirmed early in patients with X-monosomy, where in almost 40% of these cases, the karyotype was established before the age of two (Table 2). However, in most patients with mosaicism and/or X structural changes (77.3%), cytogenetic analyses were not done until the age of puberty.

A.V.S. Bispo et al.

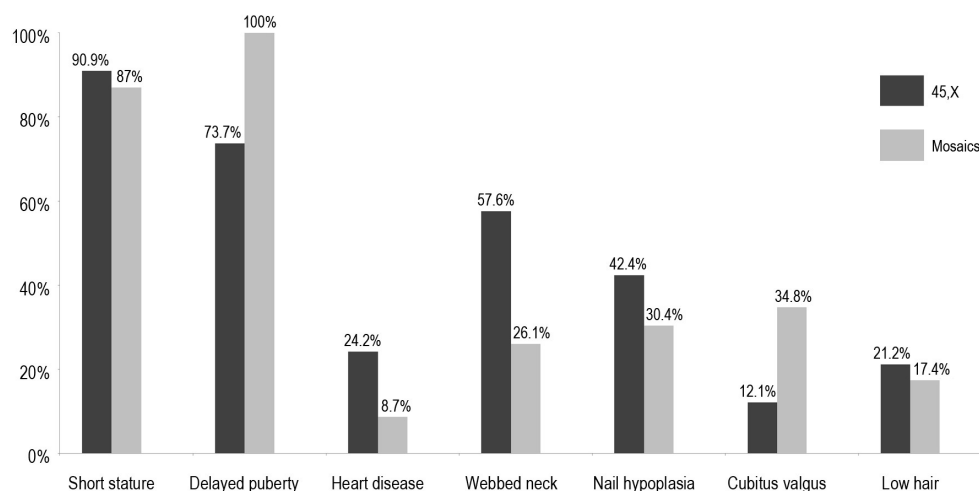
Table 2. Frequency distribution of age at the moment of chromosome analysis.

Age	45,X	Other karyotypes	All TS cases
0-2 years	39.5%	-	25%
3-8 years	2.7%	22.7%	10%
9-13 years	21%	18.2%	20%
14-17 years	21%	31.8%	25%
≥18 years	15.8%	27.3%	20%

TS = Turner syndrome.

Webbed neck (92.31%), lymphedema of hands and feet (84.62%), congenital heart disease (61.53%) and nail hypoplasia (53.85%) were the main clinical features that led to cytogenetic analyses before the age of two in 45,X patients. Our results demonstrated that at birth these were the predominant phenotypic determinants of this syndrome.

In 89.3% of all cases, short stature was the most frequent phenotypic characteristic. This growth failure was more frequent among patients with monosomy as compared to those who showed mosaicism (Figure 1), but this difference was not statistically significant ($P = 0.486$). Another important clinical feature was gonadal dysgenesis with delayed pubertal and primary amenorrhea, which was observed in 84.8% of TS patients at pubertal age. This clinical disorder was observed in all patients with mosaicism in contrast to carriers of X-monosomy (Figure 1), with the difference being statistically significant ($P < 0.001$).

**Figure 1.** Distribution of the most prevalent clinical features according to karyotype constitution.

Congenital heart disease, another important TS-related clinical factor, was found in 17.9% of cases, where it was significantly more frequent in monosomic karyotypes (Figure 1) ($P = 0.007$). Autoimmune diseases such as Hashimoto's thyroiditis (12.5%) and renal malformations (8.93%) were also observed in the subjects.

Although TS patients may have nonverbal learning disabilities, average intellectual per-

Phenotype correlation in Turner's syndrome

formance is usually normal. Nevertheless, we found moderate and severe mental retardation in 2 and 3 of 65 TS patients (7.7%), respectively. The karyotypes associated with this rare stigma included 45,X (three cases), 45,X,t(11;12)(q22;q22) (one case) and 46,X,i(Xq)/45,X (one case).

Several dysmorphic features were observed, such as widely spaced nipples, epicanthal folds, shortening of the metacarpal bones and high arched palate. The most common phenotype of all TS patients was short and webbed neck (44.6%), hypoplastic nails (37.5%), low posterior hairline (19.6%), and cubitus valgus (21.4%), with the latter being more common in patients with mosaicism (Figure 1). However, only short and webbed neck ($P < 0.001$) and cubitus valgus ($P = 0.0002$) showed statistically significant differences between mosaics and 45,X cases.

We also found one TS patient with unusual cytogenetic constitution displaying the following karyotype: 45,X,t(11;12)(q22;q22)[20]. Clinical examination at the age of 33 showed short stature, short and webbed neck, low posterior hairline, primary amenorrhea and mental retardation; she neither knew her age nor recognized colors. Karyotype analysis of the parents was not possible.

DISCUSSION

Turner syndrome is a chronic disease associated with a wide range of malformations with varying frequencies, which are mainly related to the type of X chromosome rearrangement. Our cytogenetic analyses of 65 TS patients corroborated, in general, previously reported data (Held et al., 1992; Schoemaker et al., 2008; Djordjević et al., 2010; Elleuch et al., 2010). However, our patient sample had only one case (1.5%) of mosaicism with a normal cell line (46,XX), which is significantly lower than frequencies described in the literature (8 to 17%). Although reports of TS patients with X duplications and balanced translocation are very rare, we found two of these karyotypes displaying these uncommon chromosomal rearrangements.

The case of X-duplication (Table 1) previously reported by our research group (Burrégio-Frota et al., 2010) showed classical TS stigmata associated with the karyotype 46,X,inv dup(X)(pter→q22::q22→pter)/45,X. Partial X-chromosome duplications are relatively infrequent and occur predominantly in men, where they are associated with multiple congenital abnormalities (Cheng et al., 2005). Few cases of dup(Xq) have been described in females, and the abnormal phenotype usually includes short stature, developmental delay, hypogonadism and other dysmorphic anomalies. As a consequence of selection against cells with abnormal X in carrier females, most dup(Xq) are inactivated, and females appear phenotypically normal (Armstrong et al., 2003; Stankiewicz et al., 2005). In our dup(Xq) case, we believe that the clinical data observed in this patient were probably due to the 45,X cell line.

Balanced translocations are rare chromosome rearrangements and seldom found in TS. To the best of our knowledge, this is the first case of TS describing a balanced translocation involving chromosomes 11 and 12, karyotype 45,X,t(11;12)(q22;q22). To date, only seven cases of balanced translocations in 45,X cell line have been reported. Using high resolution banding, Ozkul et al. (2002) found a TS infant with the karyotype 45X,t(1;2)(q41;p16), and one case of TS with familial balanced translocation t(1;2)(q32;q21)mat was described by Kondo et al. (1979). Four other studies reported an association of X-monosomy with balanced Robertsonian translocation t(13;14) (Laszlo et al., 1984; Salamanca et al., 1985; Krajinovic et al., 1994; Silva et al., 2006). Recently, Djordjević et al. (2010) showed a case of 45,X,t(1;9)(cen;cen) in combination with a r(X) mosaic karyotype.

A.V.S. Bispo et al.

Usually, balanced chromosomal translocations do not exhibit any phenotypic abnormalities. However, their carriers may have increased reproductive risk, with spontaneous abortions. In our case, the patient had a typical 45,X lineage TS phenotype. Since the X-monosomy is related to normal intelligence, we suggest that the t(11;12) could be responsible for the mental disability in this patient. Mutations in several genes have been associated with mental retardation (Kalscheuer et al., 2009; Vandeweyer and Kooy, 2009), but in our case it may have been the loss of genetic information by the translocation process that may have caused mental disability.

Short stature is considered the most common feature, which affects over 90% of recognized patients (Bondy, 2009; Oliveira et al., 2009; Davenport, 2010). This growth failure was indeed the most consistent phenotypic characteristic in our study, regardless of their karyotype. In two patients, only this phenotype led us to test for TS, pointing to the importance of correlating age with anomalous height and confirming TS in girls with growth failure. Short stature and other skeletal abnormalities seen in TS occur due to haploinsufficiency of the *SHOX* gene, which is located at Xp22 and Yp11.3, in the pseudoautosomal region of the sex chromosomes (Ogata et al., 2002).

Gonadal dysgenesis was the second most important TS stigma found in this study. This occurs in most TS individuals and is mainly caused by the haploinsufficiency of genes located on the long arm of the X chromosome, Xq26 (POF1) and Xq13-21 (POF2), which are involved in the maintenance of the ovaries. In contrast, a deletion of the distal short arm is usually compatible with normal ovarian function (Davison et al., 2000; Pienkowski et al., 2008). Even though most genes of ovarian function remain active in the i(Xq), all patients with this chromosome rearrangement exhibited gonadal disorders, which might have been attributed to hidden or gonad-confined mosaicism.

Congenital cardiovascular defects are the most life-threatening medical problem faced by TS patients and are found in 25 to 50% of them (Morgan, 2007; Bondy, 2009). Adults with TS have a 4- to 5-fold increased rate of premature mortality, which is attributed mainly to complications of congenital heart disease (Stochholm et al., 2006; Schoemaker et al., 2008). There was a significantly higher incidence of congenital heart disease in monosomic karyotypes (24.2%) compared with mosaics (8.7%), showing the association of the more severe phenotype with a 45,X cell line. In contrast, Tan and Yeo (2009) examined the frequency of congenital cardiac defects in TS patients from Singapore and found no statistical difference between monosomic and different structural mosaics.

Turner patients usually have normal intelligence, but may have difficulty with nonverbal, social, and psychomotor skills (Morgan, 2007). However, in few cases there may be mental retardation with severe congenital malformations associated with tiny ring X chromosome. This unusual clinical presentation is related to the deficiency in inactivating this tiny r(X) due to the absence of the X-inactivation center, causing the disomy of several genes, which alters the dosage compensation mechanism. The preferably inactivated r(X) is therefore associated with normal intelligence (El Abd et al., 1999; Suzigan et al., 2005). Thus, the mental retardation observed in 5 TS cases in our study was a very uncommon feature, since their karyotype did not show the tiny r(X). Mental retardation could be related to this additional rearrangement only in one of the 5 patients who had an additional chromosomal change t(11q;12q). The other 4 cases remain unexplained.

The genetic and phenotypic correlation of dysmorphic features, autoimmune diseases and renal malformations proved to be inconsistent, since most of these clinical data did not

Phenotype correlation in Turner's syndrome

show statistical differences between monosomic and mosaic TS patients. The TS phenotype is attributed to haploinsufficiency of genes that are normally expressed in both the active and inactive X-chromosomes. However, some reports indicate that other factors, not yet fully elucidated, may influence phenotypic expression, including hidden mosaicism, genomic imprinting or anomalous X inactivation, leading to difficulties in diagnosis and genetic counseling (Araújo and Ramos, 2008; Oliveira et al., 2009).

In conclusion, the patients with 45,X karyotype exhibited a tendency to have more severe phenotypes than those with mosaicism. Thus, our study confirms the association of higher morbidity with X-monosomy, showing that this karyotype plays an important role in the prognosis of Turner syndrome. Additionally, the presence of mental retardation in five of our patients associated with classical TS phenotype indicates that this mental disability could be an additional rare feature associated with TS and should be considered more carefully by physicians.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE - APQ-0335-2.02/06). The authors thank the patients, parents and clinicians for the data.

REFERENCES

- Araújo A and Ramos ES (2008). Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41: 368-372.
- Armstrong L, McGowan-Jordan J, Brierley K and Allanson JE (2003). *De novo* dup(X)(q22.3q26) in a girl with evidence that functional disomy of X material is the cause of her abnormal phenotype. *Am. J. Med. Genet. A* 116A: 71-76.
- Binkert F, Spreiz A, Höckner M, Miny P, et al. (2010). Parental origin and mechanism of formation of a 46,X,der(X)(pter→q21.1::p11.4→pter)/45,X karyotype in a woman with mild Turner syndrome. *Fertil. Steril.* 94: 350-355.
- Bondy CA (2009). Turner syndrome 2008. *Horm. Res.* 71 (Suppl 1): 52-56.
- Burégio-Frota P, Valença L, Leal GF, Duarte AR, et al. (2010). Identification of a *de novo* inv dup(X)(pter→ q22) by multicolor banding in a girl with Turner syndrome. *Genet. Mol. Res.* 9: 780-784.
- Cheng SF, Rauen KA, Pinkel D, Albertson DG, et al. (2005). Xq chromosome duplication in males: clinical, cytogenetic and array CGH characterization of a new case and review. *Am. J. Med. Genet. A* 135: 308-313.
- Davenport ML (2010). Approach to the patient with Turner syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 1487-1495.
- Davison RM, Fox M and Conway GS (2000). Mapping of the POF1 locus and identification of putative genes for premature ovarian failure. *Mol. Hum. Reprod.* 6: 314-318.
- Djordjević VA, Jovanović JV, Pavković-Lučić SB, Drakulić DD, et al. (2010). Cytogenetic findings in Serbian patients with Turner's syndrome stigmata. *Genet. Mol. Res.* 9: 2213-2221.
- El Abd S, Patton MA, Turk J, Hoey H, et al. (1999). Social, communicational, and behavioral deficits associated with ring X turner syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 88: 510-516.
- Elleuch M, Mnif FM, Kammoun M, Charfi N, et al. (2010). Descriptive analyses of Turner syndrome: 49 cases in Tunisia. *Ann. Endocrinol.* 71: 111-116.
- Gravholt CH (2005). Clinical practice in Turner syndrome. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 1: 41-52.
- Held KR, Kerber S, Kaminsky E, Singh S, et al. (1992). Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum. Genet.* 88: 288-294.
- Hjerrild BE, Mortensen KH and Gravholt CH (2008). Turner syndrome and clinical treatment. *Br. Med. Bull.* 86: 77-93.
- Kalscheuer VM, Musante L, Fang C, Hoffmann K, et al. (2009). A balanced chromosomal translocation disrupting ARHGEF9 is associated with epilepsy, anxiety, aggression, and mental retardation. *Hum. Mutat.* 30: 61-68.
- Kondo I, Hamaguchi H, Matsuura A, Nakajima H, et al. (1979). A case of Turner's syndrome with familial balanced translocation t(1;2)(q32;q21)mat. *J. Med. Genet.* 16: 321-323.
- Krajinovic M, Ivanovic K, Mestroni L, Diklic V, et al. (1994). Parental origin of the X chromosome in a patient with a Robertsonian translocation and Turner's syndrome. *J. Med. Genet.* 31: 255-256.

A.V.S. Bispo et al.

- Laszlo J, Bosze P, Gaal M and Toth A (1984). A case of 44,X streak gonad syndrome combined with familial balanced 13/14 translocation. *Acta Med. Hung.* 41: 223-227.
- Morgan T (2007). Turner syndrome: diagnosis and management. *Am. Fam. Physician* 76: 405-410.
- Ogata T, Muroya K, Sasaki G, Nishimura G, et al. (2002). SHOX nullizygosity and haploinsufficiency in a Japanese family: implication for the development of Turner skeletal features. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 1390-1394.
- Oliveira RM, Verreschi IT, Lipay MV, Eca LP, et al. (2009). Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med. J.* 127: 373-378.
- Ozkul Y, Atabek ME, Dunder M, Kurtoglu S, et al. (2002). A Turner patient with a 45,X,t(1;2) (q41;p11.2) karyotype. *Ann. Genet.* 45: 181-183.
- Pienkowski C, Menendez M and Cartault A (2008). Syndrome de Turner et procréation. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 36: 1030-1034.
- Salamanca F, Buentello L, Sanchez J and Armendaris S (1985). A patient with 44 chromosomes. *Ann. Genet.* 28: 130-132.
- Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Higgins CD, Wright AF, et al. (2008). Mortality in women with turner syndrome in Great Britain: a national cohort study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 4735-4742.
- Silva AL, Lima RLLF, Ribeiro LA and Moretti-Ferreira D (2006). X monosomy and balanced Robertsonian translocation in a girl with Turner Syndrome. *Genet. Mol. Biol.* 29: 47-48.
- Stankiewicz P, Thiele H, Schlicker M, Cseke-Friedrich A, et al. (2005). Duplication of Xq26.2-q27.1, including SOX3, in a mother and daughter with short stature and dyslalia. *Am. J. Med. Genet. A* 138: 11-17.
- Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW, et al. (2006). Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 3897-3902.
- Suzigan LZC, Silva RBP and Guerra AT (2005). Aspectos psicossociais da síndrome de Turner. *Arq. Brás. Endocrinol. Metab.* 49: 157-164.
- Sybert VP and McCauley E (2004). Turner's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 351: 1227-1238.
- Tan KB and Yeo GS (2009). Pattern of Turner syndrome in Singapore (1999-2004). *Singapore Med. J.* 50: 587-590.
- Vandeweyer G and Kooy RF (2009). Balanced translocations in mental retardation. *Hum. Genet.* 126: 133-147.

10. Anexos

10.1 Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE.
Tel/fax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/ccs; e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. Nº. 253/2012 - CEP/CCS

Recife, 26 de abril de 2012

A

Profa. Neide Santos

Departamento de Genética – CCB/UFPE

Registro do SISNEP FR - 476794

CAAE –0485.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 493/11

Titulo: Polimorfismos genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não-disjunção cromossômica na síndrome de Turner

Pesquisador Responsável: Neide Santos

Senhor (a) Pesquisador (a):

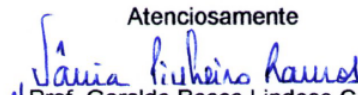
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 25 de abril 2012.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

11. Curriculum vitae (Lattes)

Adriana Valéria Sales Bispo
Curriculum Vitae

Junho/2015

Adriana Valéria Sales Bispo

Curriculum Vitae

Dados pessoais**Nome** Adriana Valéria Sales Bispo**Nome em citações bibliográficas** BISPO, A. V. S.; BISPO-BRITO, A.V.S; BISPO-BRITO, A.S.; Adriana Valéria Sales Bispo; BISPO, ADRIANA VAL'RIA SALES; BISPO, ADRIANA VALÉRIA SALES**Sexo** Feminino**Cor ou Raça** Branca**Filiação** Lourival de Sales Bispo e Valéria Maria Mattos**Nascimento** 15/12/1982 - Recife/PE - Brasil**Carteira de Identidade** 6351685 SSP - PE - 05/01/2000**CPF** 044.899.614-64**Endereço residencial** Rua Des. Tomáz Cirilo Wanderley n 119
Ibura - Recife
51320-130, PE - Brasil
Telefone: 81 34787089**Endereço profissional** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas,
Departamento de Genética
Rua Professor Moraes Rêgo S/Nº
Cidade Universitária - Recife
50732-970, PE - Brasil
Telefone: 81 21268521**Endereço eletrônico**E-mail para contato : bispo_adriana@hotmail.com
e-mail alternativo : adriana.bispo@ifsertao-pe.edu.br**Formação acadêmica/titulação****2011** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Orientador: Neide Santos
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco**2009 - 2011** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: SÍNDROME DE TURNER: ESTUDO CROMOSSÔMICO E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO FATORES DE RISCO NA NÃO-DISJUNÇÃO, Ano de obtenção: 2011
Orientador: Neide Santos
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
*Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica***2004 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Análise Cariotípica e Molecular em Pacientes com Síndrome de Turner
 Orientador: Neide Santos
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

2011 - 2011	Extensão universitária em Curso Básico de Imunologia. Faculdade Pernambucana de Saúde, FPS, Recife, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Organização Molecular e Diferenciação Longitudinal. Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
2008 - 2008	Curso de curta duração em Utilização de SNPs em genética forense. Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Genética Humana Básica. Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Instituto Federal do Sertão Pernambucano - IFSertão-PE

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Professor Ensino Básico Técnico e Tecnológico, Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: BFT-Bolsista de fixação técnico, Enquadramento funcional: Técnico geneticista, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
2011 - Atual Vínculo: Estudante Doutorado, Enquadramento funcional: Estudante Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
2009 - 2011 Vínculo: Mestrando, Enquadramento funcional: Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Integral
2007 - 2009 Vínculo: Estágio Bolsista, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

01/2007 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética

*Linhas de pesquisa:
 Citogenética e Genética Humana*

3. Escola Quitéria Rosa da Silva - Curso Técnico de Enfermagem - EQRS

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Professor, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Linhas de pesquisa

1. Citogenética e Genética Humana

Objetivos: Análise Citogenética e Biologia Molecular. Identificar e caracterizar as alterações cromossômicas em com alterações constitucionais através da Citogenética convencional e molecular (FISH). Além da detecção de polimorfismos genético e marcadores moleculares.

Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica

Áreas de atuação

1. Genética
2. Zoologia
3. Biologia Geral
4. Microbiologia

Projetos

Projetos de pesquisa **2007 - 2009** Análise Caritípica e Molecular em Pacientes com Síndrome de Turner

Descrição: A síndrome de Turner (ST) é relativamente comum, ocorrendo em uma proporção de 1/2500 nascimentos, está geralmente associada a baixa estatura, infantilismo genital, disgenesia gonadal, pescoço curto, implantação baixa dos cabelos na parte posterior, tórax largo com mamilos amplamente afastados e hipoplásicos, linfedema, malformações cardíacas congênitas e estigmas diversos. Estudos citogenéticos têm mostrado que aproximadamente 40-60% das pacientes com ST possuem cariótipo 45,X e o restante possuem anormalidades estruturais do X ou mosaicismos. Pacientes com mosaicismos ou com uma linhagem do cromossomo Y, ou quando fragmentos deste estejam presentes, exibem um risco de 7-10% de desenvolver gonadoblastoma. Dessa forma, esse projeto visa realizar uma análise citogenética convencional, de biologia molecular (PCR) e citogenética molecular (FISH) nas pacientes diagnosticadas clinicamente com a síndrome de Turner atendidas no Serviço de Genética Médica do Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira. Inicialmente todas as pacientes serão cariotipadas e aquelas exclusivamente 45,X, serão analisadas por PCR, utilizando primers de seqüências do cromossomo Y, que poderá identificar segmentos desse cromossomo no genoma, sendo muito importante clinicamente, pelo fato da presença de seqüências do Y em células das pacientes ser um fator de risco para o desenvolvimento de gonadoblastoma e outros tumores. A aplicação da FISH com sonda específica para o cromossomo Y permitirá o mapeamento físico deste no cariótipo das pacientes. Os achados de biologia molecular e citogenética molecular permitirão um diagnóstico complementar para as pacientes com síndrome de Turner, permitindo uma ampla avaliação clínica.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Adriana Valéria Sales Bispo; Neide Santos (Responsável); Pollyanna Burégio de Siqueira Cavalcanti

Projetos de desenvolvimento tecnológico **2009 - 2015** Análise de polimorfismos genéticos como fatores de risco para doenças autoimunes e não-disjunção na síndrome de Turner

Descrição: O objetivo geral deste projeto é avaliar polimorfismos de genes da imunidade como possíveis fatores de predisposição ao risco de doenças autoimunes na ST, bem como investigar a possível associação de polimorfismos do metabolismo do folato como fatores de risco na não-disjunção cromossômica. A determinação dos polimorfismos será realizada pelos métodos de PCR-RFLP, PCR-ASA,

PCR em tempo real baseada em HP ou sondas Taqman alelo específicas e através de sequenciamento direto. A análise das variações genéticas poderá contribuir para o entendimento do papel que polimorfismos funcionais possam desempenhar na susceptibilidade do organismo a doenças autoimunes. Por outro lado, a associação dos genes do metabolismo do folato como fator de risco na não-disjunção representará uma importante evidência de um componente genético associado às aneuploidias cromossômicas.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de desenvolvimento tecnológico

Alunos envolvidos: Graduação (0); Mestrado acadêmico (0); Doutorado (1);

Integrantes: Adriana Valéria Sales Bispo; Neide Santos (Responsável); Maria Tereza Cartaxo Muniz; Gabriela Ferraz Leal; Andrea Rezende Duarte; Sergio Crovela

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem
Espanhol	Compreende Bem , Fala Pouco , Escreve Razoavelmente , Lê Bem
Português	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2008	PREMIAÇÃO NO CONIC (Congresso de Iniciação Científica), UFPE
-------------	--

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **BISPO, A. V. S.**, SANTOS, L.O., BURÉGIO-FROTA, P., GALDINO, M. B., DUARTE, A. R., LEAL, G.F., ARAUJO, J., GOMES, B., SOARES-VENTURA, EM, CARTAXO-MUNIZ, MT, SANTOS, N.

Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype. Genetics and Molecular Research. , v.12, p.ahead for print - , 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [<http://www.geneticsmr.com/year2013/vol12-1/pdf/gmr2376.pdf>]

2. BURÉGIO-FROTA, P., VALENÇA, LB, LEAL, G.F., DUARTE, AR, **BISPO, A. V. S.**, SOARES-VENTURA, EM, MARQUES-SALLES, TJ, NOGUEIRA, M. T.M. C., CARTAXO-MUNIZ, M.T, SILVA, MLM, HUNSTIG, F., LIEHR, T., SANTOS, N.

Case Report Identification of a de novo inv dup(X)(pter?q22) by multicolor banding in a girl with Turner syndrome. Genetics and Molecular Research. , v.9, p.780 - , 2010.

Referências adicionais : Inglês. . Home page: [[doi:10.4238/vol9-2gmr777](https://doi.org/10.4238/vol9-2gmr777)]

3. **BISPO, ADRIANA VALÉRIA SALES**, DOS SANTOS, LUANA OLIVEIRA, DE BARROS, JULIANA VIEIRA, DUARTE, ANDREA REZENDE, ARAÚJO, JACQUELINE, MUNIZ, MARIA TEREZA CARTAXO, SANTOS, NEIDE

Polymorphisms in folate pathway genes are not associated with somatic nondisjunction in Turner syndrome. American Journal of Medical Genetics. Part A. , v.1, p.n/a - n/a, 2015.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [[doi:10.1002/ajmg.a.37055](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37055)]

4. **BISPO, ADRIANA VAL'RIA SALES**, BUR'GIO-FROTA, POLLYANNA, OLIVEIRA DOS SANTOS, LUANA, LEAL, GABRIELA FERRAZ, DUARTE, ANDREA REZENDE, ARA'JO, JACQUELINE, CAVALCANTE DA SILVA, VANESSA, MUNIZ, MARIA TEREZA CARTAXO, LIEHR, THOMAS, SANTOS, NEIDE

Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case. *Reproduction, Fertility and Development*. , v.01, p.01 - 03, 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1071/rd13207]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LARANJEIRA, R. S. M., PINTO, R. N., BARROS, J. V., ALENCAR-FILHO, A. V., SANTOS, L.O., **BISPO, A. V. S.**, SANTOS, N., CALIXTO, M. S.

Adição de heterocromatina constitutiva no cromossomo 16 em duas pacientes portadoras de fissura labiopalatal, não sindrômicas. In: 4 Reunião Brasileira de Citogenética, 2015, Atibaia-SP.

4 Reunião Brasileira de Citogenética. , 2015.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. **BISPO, A. V. S.**, SANTOS, L.O., BARROS, J. V., SILVA, I. K. L., ANGELIM-NETO, M. C., DUARTE, A. R., ARAUJO, J., SANTOS, N.

Cromossomos Marcadores na síndrome de Turner: relato de três casos In: 4 Reunião Brasileira de Citogenética, 2015, Atibaia - SP.

4 Reunião Brasileira de Citogenética. , 2015.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

3. SANTOS, L.O., **BISPO, A. V. S.**, BARROS, J. V., LARANJEIRA, R. S. M., LEAL, G.F., DUARTE, A. R., ARAUJO, J., JACQUELINE, SANTOS, N.

Heteromorfismos do cromossomo 9 em pacientes com indicação clínica da síndrome de Turner: avaliação citogenética e clínica In: 4 Reunião Brasileira de Citogenética, 2015, Atibaia-SP.

4 Reunião Brasileira de Citogenética. , 2015.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

4. SANTOS, L.O., LIBERAL, A. T. S., BARROS, J. V., **BISPO, A. V. S.**, LEAL, G.F., DUARTE, A. R., MUNIZ, M. T. C., SANTOS, N.

INVESTIGAÇÃO DE DELEÇÕES DO GENE SHOX EM PACIENTES COM BAIXA ESTATURA ASSOCIADA OU NÃO A MALFORMAÇÕES ESQUELÉTICAS In: Encontro de Genética do Nordeste - ENGGENE, 2014, Campina Grande -PB.

Encontro de Genética do Nordeste - ENGGENE. , 2014.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

5. BARROS, J. V., SANTOS, L.O., **BISPO, A. V. S.**, SILVA, I. K. L., LARANJEIRAS, R. S. M., DUARTE, A. R., ARAUJO, J., SANTOS, N.

POLIMORFISMO DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA NO CROMOSSOMO 16: TRÊS RELATOS DE CASOS In: Encontro de Genética do Nordeste - ENGGENE, 2014, Campina Grande -PB.

Encontro de Genética do Nordeste - ENGGENE. , 2014.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

6. **BISPO, A. V. S.**, SANTOS, L.O., DUARTE, A. R., ARAUJO, J., MUNIZ, M. T. C., SANTOS, N.

RFC1 80G>A genetic polymorphism and the risk of somatic non-disjunction in Turner syndrome In: Encontro de Genética do Nordeste - ENGGENE, 2014, Campina Grande -PB.

RFC1 80G>A genetic polymorphism and the risk of somatic non-disjunction in Turner syndrome. , 2014.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

7. OLIVEIRA DOS SANTOS, LUANA, **BISPO, A. V. S.**, BARROS, J. V., MELO, J. M., SILVA, I. K. L., BURÉGIO-FROTA, P., LEAL, G.F., DUARTE, A. R., ARAUJO, J., GOMES, B., MUNIZ, M. T. C., LIEHR, T., SANTOS, NEIDE

Isochromosome Xq in patients with Turner syndrome: cytogenetic and molecular findings and clinical features. In: 3 Reunião Brasileira de Citogenética e IV Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução, 2013, Guarujá- SP.

3 Reunião Brasileira de Citogenética e IV Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução. , 2013.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8. SANTOS, L.O., **BISPO, A. V. S.**, DUARTE, A. R., ARAUJO, J., SANTOS, N.

Estudo citogenético em pacientes portadores de distúrbios da diferenciação sexual In: XIX Encontro de

Genética do Nordeste, 2012, Juazeiro - Ba.

XIX Encontro de Genética do Nordeste. SBG, 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

9. **BISPO, A. V. S., SANTOS, L.O., ARAUJO, J., GOMES, B., SANTOS, N.**

Inversão pericêntrica do cromossomo 9 associada ao distúrbio do desenvolvimento sexual - relato de caso
In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Juazeiro - Ba.

XIX Encontro de Genética do Nordeste. SBG, 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

10. **BISPO, A. V. S.,** Silva, H.A., SANTOS, L.O., BURÉGIO-FROTA, P., LEAL, G.F., DUARTE, A. R., ARAUJO, J., CARTAXO-MUNIZ, M.T, SANTOS, N.

Genetic Polymorphisms in Folate Metabolism May not Represent An Important Risk Factor for Chromosome Nondisjunction in Turner syndrome In: XL Congresso Argentino de Genética e III Simpósio Latinoamericano de Citogenética Y Evolución, 2011, Corrientes.

XL Congresso Argentino de Genética e III Simpósio Latinoamericano de Citogenética Y Evolución., 2011.

Referências adicionais : Argentina/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

11. **BISPO, A. V. S., SANTOS, N.**

Polimorfismos Genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não disjunção na síndrome de Turner In: I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2011, Recife.

I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE., 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

12. Vasconcelos S, BISPO, A. V. S., Benko-Iseppon AM

Inferência filogenética in silico na tribo Cocoseae (Arecaceae) baseada nas sequências dos genes plastidiais *rbcl* e *matK* In: Encontro de Genética do Nordeste, 2010, Jequié- Ba.

Inferência filogenética in silico na tribo Cocoseae (Arecaceae) baseada nas sequências dos genes plastidiais *rbcl* e *matK*., 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

13. BISPO, A. V. S., Silva, H.A., SANTOS, L.O., BURÉGIO-FROTA, P., LOURENCO, S. F. G., LEAL, G.F., DUARTE, A.R., CARTAXO-MUNIZ, M.T, SANTOS, N.

Investigação do polimorfismo C677T do gene MTHFR em portadoras da Síndrome de Turner como fator de risco a não-disjunção In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá.

56º Congresso Brasileiro de Genética., 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

14. SANTOS, L.O., BISPO, A. V. S., BURÉGIO-FROTA, P., LOURENCO, S. F. G., LEAL, G.F., DUARTE, A.R., SOARES-VENTURA, E.M, CARTAXO-MUNIZ, M.T, SANTOS, N.

Sequências do cromossomo Y na síndrome de Turner e o risco de gonadoblastoma In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá.

56º Congresso Brasileiro de Genética., 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português.

15. GALDINO, M. B., BISPO, A. V. S., SANTOS, L.O., LOURENCO, S. F. G., BURÉGIO-FROTA, P., LEAL, G.F., DUARTE, A.R., ARAUJO, J., SOARES-VENTURA, E.M, SANTOS, N.

INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER NO ESTADO DE PERNAMBUCO. In: 55 Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

55 Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: SBG, 2009.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

16. BISPO, A. V. S., GALDINO, M. B., SANTOS, L.O., LOURENCO, S. F. G., BURÉGIO-FROTA, P., LEAL, G.F., DUARTE, A.R., ARAUJO, J., BEZERRA, I. H., SOARES-VENTURA, E.M, CARTAXO-MUNIZ, M.T, SANTOS, N.

INVERSÃO DO CROMOSSOMO 9 ASSOCIADA AO ATRASO PUBERAL E ESTIGMAS DE SÍNDROME DE TURNER In: 55 Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

55 Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: SBG, 2009.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

17. BURÉGIO-FROTA, P., BISPO, A. V. S., LEAL, G.F., DUARTE, A.R., SOARES-VENTURA, E.M, CARTAXO-MUNIZ, M.T, RAMOS, F. J. C., ARAUJO, J., GOMES, B., MENDES, A. C., CARMELIO, J, SANTOS, N.

Identificação de seqüências do cromossomo Y em pacientes com síndrome de Turner e disgenesia gonadal In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

54 Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: SBG, 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

18. BISPO, A. V. S., BURÉGIO-FROTA, P., VALENÇA, LB, LEAL, GF, DUARTE, AR, SOARES-VENTURA, EM, MARQUES-SALLES, TJ, NOGUEIRA, M. T. M. C., CARTAXO-MUNIZ, M. T., SANTOS, N. Prevalência Cariotípica em Pacientes Com Síndrome de Turner no Estado de Pernambuco In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, Salvador.

54 Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão preto: SBG, 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Apresentação de trabalho e palestra

1. BISPO, A. V. S.

CITOGENÉTICA CLÍNICA: AS ALTERAÇÕES NOS CROMOSSOMOS HUMANOS, 2010. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Alagoas; Cidade: Maceio; Evento: Semana de Biologia na IF-AL; Inst.promotora/financiadora: Instituto Federal de Alagoas

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIX Encontro de Genética do Nordeste - ENGINE**, 2012. (Congresso)

Inversão pericêntrica do cromossomo 9 associada ao distúrbio do desenvolvimento sexual - relato de caso.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XL Congresso Argentino de Genética e III Simpósio Latinoamericano de Citogenética Y Evolución**, 2011. (Congresso)

Genetic Polymorphisms in Folate Metabolism May not Represent An Important Risk Factor for Chromosome Nondisjunction in Turner syndrome.

3. Conferencista no(a) **V Semana de Biologia do IF/AL**, 2010. (Encontro)

Citogenética Clínica: As alterações dos cromossomos humanos.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **55 Congresso Brasileiro de Genética**, 2009. (Congresso)

Inversão do Cromossomo 9 Associada ao Atraso Puberal e Estigmas de Síndrome de Turner.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **54 Congresso Brasileiro de Genética**, 2008. (Congresso)

Prevalência Cariotípica em pacientes com Síndrome de Turner no Estado de Pernambuco.

6. **I Workshop Internacional em Biotecnologia**, 2008. (Outra)

Organização de evento

1. Balbino V, **BISPO, A. V. S.**

I Jornada da Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2011. (Congresso, Organização de evento)

Áreas do conhecimento : Genética

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	4
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	18
Apresentações de trabalhos (Outra).....	1

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	4
Participações em eventos (encontro).....	1
Participações em eventos (outra).....	1
Organização de evento (congresso).....	1
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	1

Outras informações relevantes

1 Monitoria em citogenética na Universidade Federal de Pernambuco no período de novembro de 2006 e término em fevereiro de 2008.

Estagio à docência na disciplina Citogenética Humana oferecida ao curso de Biomedicina na Universidade Federal de Pernambuco 2009.2

Aprovada em 2º lugar concurso da Fiocruz 2010 - Tecnologista em saúde/ Citogenética Laboratorial